



Sistemes bicel·lars com a nova estratègia d'aplicació tòpica

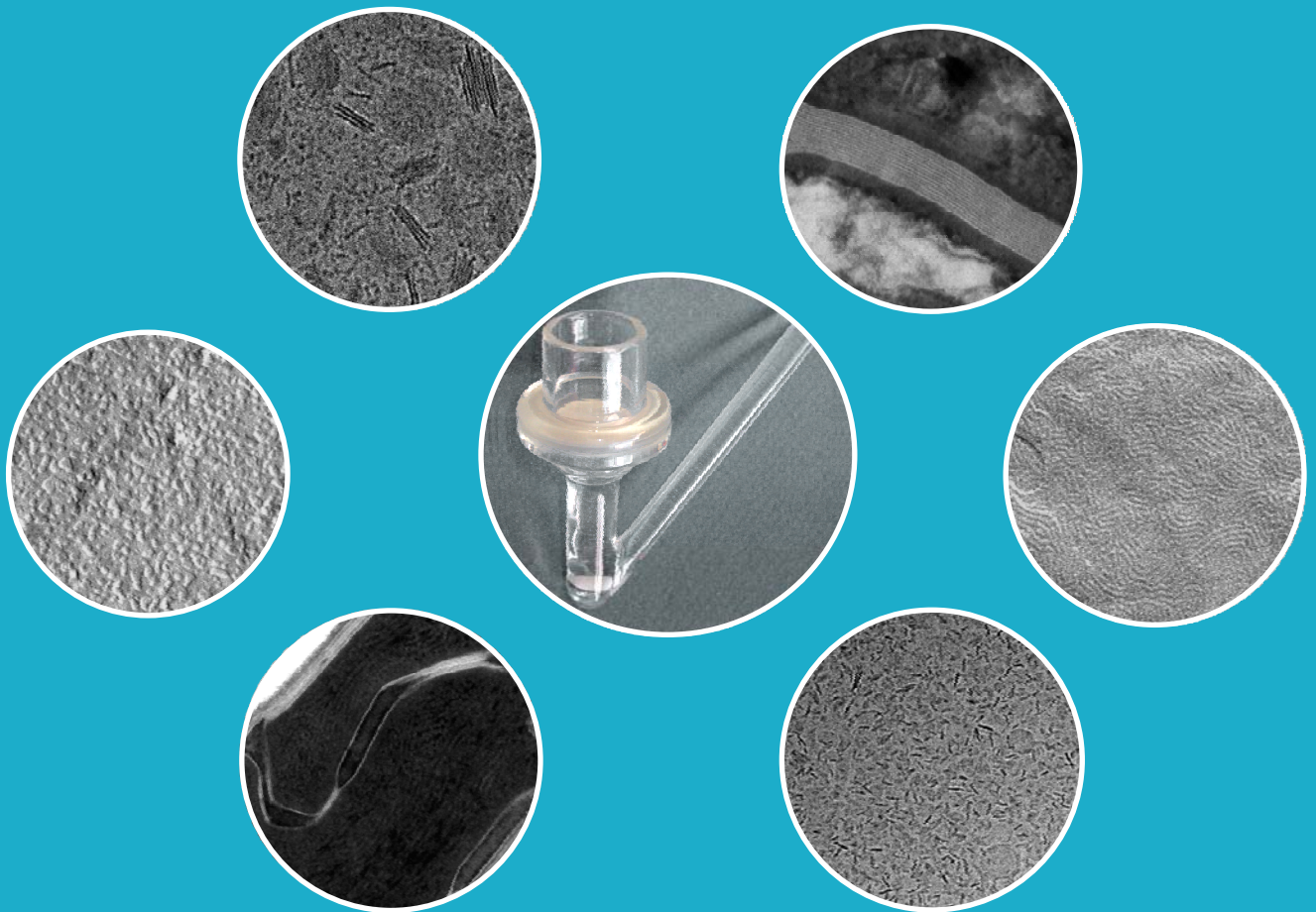
Laia Rubio Toledano

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Sistemes bicel·lars com a nova estratègia d'aplicació tòpica



Laia Rubio Toledano

Barcelona, 2012

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

INSTITUT DE QUÍMICA AVANÇADA DE CATALUNYA (IQAC)

Departament de Tecnologia Química i de Tensioactius



**SISTEMES BICEL·LARS COM A NOVA ESTRATÈGIA
D'APLICACIÓ TÒPICA**

LAIA RUBIO TOLEDANO

Barcelona, 2012

PROGRAMA DE DOCTORAT:

Recerca, Desenvolupament i Control de Medicaments

BIENNI 2005 -2007

**SISTEMES BICEL·LARS COM A NOVA ESTRATÈGIA D'APLICACIÓ
TÒPICA**

Memòria presentada per LAIA RUBIO TOLEDANO per a optar al títol de Doctor per la Universitat de Barcelona

Laia Rubio Toledano

La present Tesi Doctoral ha estat realitzada en el Departament de Tecnologia Química i de Tensioactius de l'Institut de Química Avançada de Catalunya del Consell Superior d'Investigacions Científiques. (IQAC-CSIC) sota la direcció de la Dra. Olga López Serrano i el Prof. José Luís Parra Juez, i de la tutoria de la Prof. María José García Celma del Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica de la Universitat de Barcelona, els quals autoritzen la seva presentació.

Dra. Olga López Serrano

Prof. José Luís Parra Juez

Prof. María José García Celma

Barcelona, 2012

ÍNDEX

ÍNDIX	I
ABREVIATURES	V
PLANTEJAMENT GENERAL	VII
1. INTRODUCCIÓ	1
1.1-Fosfolípids	3
1.1.1-Agregats fosfolipídics en solució	4
1.1.1.1-Comportament fàsic de les bicapes fosfolipídiques	5
1.1.1.2-Sistemes bicel·lars	7
1.2-Principis actius	8
1.2.1- Quantificació cromatogràfica per HPLC	10
1.3-Tècniques de caracterització dels sistemes bicel·lars	11
1.3.1-Tècnica de dispersió dinàmica de llum (DLS)	11
1.3.2-Calorimetria diferencial d'escombrat (DSC)	12
1.3.3-Microscopia electrònica de transmissió (TEM)	14
1.3.3.1-Microscòpia electrònica de criofractura (FFEM)	15
1.3.3.2- Criomicroscòpia electrònica de transmissió (Cryo-TEM)	16
1.3.4 Tècniques de dispersió de raigs X	17
1.4-La pell com a via d'administració de principis actius	18
1.4.1-Característiques de la pell	18
1.4.1.1- L'estrat corni	20
1.4.2-Patologies de la pell: disfunció de la barrera cutània	22
1.4.2.1- Simulació <i>in vitro</i> de pell amb disfunció de la barrera cutània	23
1.4.2.2- Avaluació de l'alteració de la funció barrera de la pell	24
1.5- La pell i els sistemes lipídics	25
1.6-Absorció percutània	27
1.6.1- Vies d'absorció percutània	27
1.6.2-Metodologia de l'absorció percutània <i>in vitro</i>	29

1.7-Tècniques de caracterització de la pell	30
1.7.1- Espectroscòpia infraroja per transformada de Fourier per reflectància total atenuada (ATR-FTIR)	31
1.7.2-SAXS sincrotró	33
1.7.3-Criosubstitució aplicada a la microscòpia electrònica de transmissió (FSTEM).	34
2. OBJECTIUS	37
3. RESULTATS	41
Article 1. Bicellar systems for in vitro percutaneous absorption of diclofenac	45
Article 2. Structural effects of flufenamic acid in DPPC/DHPC bicellar Systems	53
Article 3. Bicellar systems as new delivery strategy for topical application of flufenamic acid	65
Article 4. Bicellar systems as a new colloidal delivery strategy for skin	105
Article 5. Barrier function of intact and impaired skin: Percutaneous penetration of caffeine and salicylic acid	113
Article 6. Bicellar systems as vehicle for treatment of impaired skin	125
4. DISCUSSIÓ	145
4.1 Caracterització físico-química dels sistemes bicel·lars	147
4.1.1 Canvis estructurals i morfològics provocats en els sistemes bicel·lars per la inclusió d'un fàrmac	147
4.1.1.1 Incorporació del DDEA	147
4.1.1.2 Incorporació del FFA	150
4.1.1.3 Comparativa dels canvis provocats per la inclusió del DDEA i del FFA en sistemes bicel·lars de DPPC/DHPC	154
4.1.2 Capacitat encapsuladora dels sistemes bicel·lars	154
4.2 Estudis <i>in vitro</i> de l'aplicació tòpica dels sistemes bicel·lars en pell sana	155
4.2.1 Sistemes bicel·lars com a vehicle de DDEA: influència de la composició lipídica dels sistemes	155
4.2.2 Sistemes bicel·lars com a vehicle de FFA	156
4.2.2.1 Influència del vehicle en l'absorció percutània del FFA	156

4.2.2.2 Interacció dels sistemes bicel·lars de FFA amb els lípids de l'EC	158
4.2.3 Els sistemes bicel·lars com a potenciadors de la permeabilitat de la pell	160
4.3 Disseny d'una metodologia de simulació <i>in vitro</i> de pell amb la funció barrera deteriorada	160
4.4 Ús dels sistemes bicel·lars com a vehicle en l'aplicació de DDEA sobre pell <i>in vitro</i> simulant una condició patològica	163
5. CONCLUSIONS	167
6. BIBLIOGRAFIA	171

ABREVIATURES

ABREVIATURES

A.P.	Absorció percutània
AFS	<i>"Automatic Freeze Substitution"</i> , Sistema automatitzat de substitució
AINEs	Antiinflamatoris no esteroides
ATR	<i>"Attenuated Total Reflection"</i> , Reflectància total atenuada
Cryo-TEM	Criomicroscòpia electrònica de transmissió
D	Coefficient de difusió
d	Distància de repetició
d_c	Distància entre molècules veïnes
DDEA	Diclofenac de dietilamina
DHPC	Dihexanoil fosfatidilcolina
DLS	<i>"Dynamic Light Scattering"</i> , Dispersió dinàmica de llum
DMPC	Dimiristoil fosfatidilcolina
DPPC	Dipalmitoil fosfatidilcolina
DSC	<i>"Differential Scanning Calorimetry"</i> , Calorimetria diferencial d'escombrat
EC	Estrat corni
FFA	Àcid flufenàmic
FFEM	<i>"Freeze-Fracture Electron Microscopy"</i> , Microscòpia electrònica de criofractura
FSTEM	<i>"Freeze Substitution Transmission Electron Microscopy"</i> , Criosubstitució aplicada a la microscòpia electrònica de transmissió
FTIR	<i>"Fourier Transform Infrared"</i> , Espectroscòpia infraroja per transformada de Fourier
H	Fase hexagonal
HEX	Empaquetament hexagonal
H_I	Fase hexagonal normal
H_{II}	Fase hexagonal inversa
HPLC	Cromatografia líquida d'alta resolució
I	Intensitat de dispersió
k_B	Constant de Boltzman
L	Fase laminar
L_c	Fase cristal·lina
$\log P_{ow}$	Logaritme del coeficient de partició octanol-aigua
L_α	Fase cristall-líquid

L_{β}	Fase gel inclinada
NIBS	" <i>Non Invasive Back Scatter</i> ", Tecnologia no invasiva de retrodispersió
OCDE	Organització per a la Cooperació i el Desenvolupament Econòmic
OR	Empaquetament ortoròmbic
P_{β}	Fase "Ripple"
q	Vector de dispersió
q	Relació molar entre el fosfolípid de cadena alquílica llarga i el fosfolípid de cadena curta
R_h	Radi hidrodinàmic
RMN	Ressonància magnètica nuclear
SAXS	" <i>Small Angle X-ray Scattering</i> ", Dispersió de raig X a angles petits
SPP	" <i>Short Periodicity Phase</i> ", Fase de periodicitat curta
T	Temperatura
TEM	" <i>Transmission Electron Microscopy</i> ", Microscòpia electrònica de transmissió
TEWL	" <i>Transepidermal Water Loss</i> ", Pèrdua transepidèrmica d'aigua
T_m	Temperatura de transició de fase gel a cristall-líquid
t_R	Temps de relaxació
UV	Ultraviolat
WAXS	" <i>Wide Angle X-ray Scattering</i> ", Dispersió de raig X a angles grans
η	Viscositat
θ	Angle de dispersió
λ	Longitud d'ona

PLANTEJAMENT GENERAL

PLANTEJAMENT GENERAL

La pell és una zona cada vegada més utilitzada per a aplicar principis actius amb una acció local (cosmètics), regional (productes dermatològics) o sistèmica (alliberament de fàrmacs a nivell transdèrmic). Degut a la importància que progressivament va adquirint la pell com a via tòpica d'aplicació de compostos, l'absorció percutània ha adquirit una rellevància especial.

En el fenomen de l'absorció percutània s'han de contemplar tres aspectes clau: El principi actiu, el vehicle i la pell. Cadascun d'ells té el seu propi protagonisme però, al seu torn, existeix una estreta interacció entre ells. De fet, els mecanismes implicats en l'absorció percutània no són pas simples donada la complexitat estructural, morfològica i molecular de la pell, les característiques químiques i físico-químiques dels principis actius i les modificacions que es puguin introduir degudes als vehicles. Tot això pot aconseguir retardar o facilitar la difusió d'actius a través dels diferents estrats de la pell.

Aquesta tesi s'ha dissenyat tenint en compte aquest plantejament encara que s'ha aprofundit en el coneixement més detallat sobre les característiques físico-químiques i el comportament estructural del vehicle bicel·lar utilitzat.

Les bicel·les són nanoestructures caracteritzades per la seva especial composició lipídica i estructura bilaminar, així com per les seves dimensions nanomètriques. Degut a aquestes característiques i a les investigacions anteriors realitzades pel nostre grup s'ha pensat que poden tenir un gran potencial en el seu ús com a vehicles per aplicació tòpica

En aquesta tesi s'han vehiculitzat dos principis actius amb acció antiinflamatòria en sistemes bicel·lars. Aquestes sistemes s'han caracteritzat utilitzant una sèrie de tècniques instrumentals molt potents i d'ampli espectre.

Els principis actius vehiculitzats en els sistemes bicel·lars s'han aplicat sobre la pell amb la finalitat de conèixer el seu comportament en l'absorció percutània. Per a això, s'ha utilitzat una metodologia *in vitro* oficialment reconeguda per la OCDE que utilitza biòpsies de pell amb una adequada condició fisiològica. Així mateix, s'ha dissenyat una metodologia *in vitro* per a simular de manera predictiva el comportament d'una pell patològica amb la seva funció barrera disminuïda, i s'ha investigat el potencial d'utilitzar els sistemes bicel·lars en aquests tipus de pell. Els articles publicats i els que estan en procés de publicació que s'han inclòs en la tesi contenen els resultats obtinguts en aquesta investigació que poden contribuir a la vehiculització més efectiva i segura de diferents principis actius que s'apliquin tòpicament.

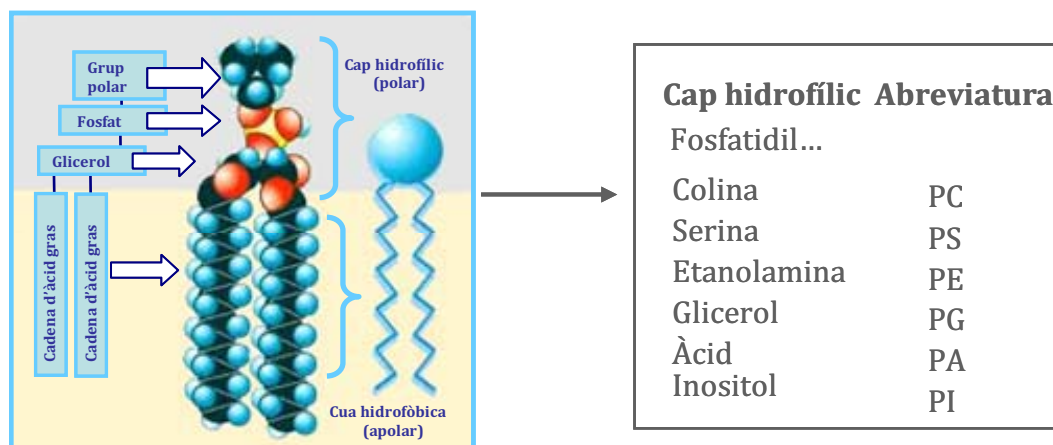
1. INTRODUCCIÓ

1. INTRODUCCIÓ

1.1-Fosfolípids

Els fosfolípids són els lípids més abundants de les membranes cel·lulars. Aquests compostos tenen una estructura amfifílica que conté un cap polar i una regió apolar hidrocarbonada. Un fosfolípid està format per un grup glicerol al que s'enllacen un grup fosfat i dues cadenes d'àcids grassos (lípids) que constitueixen la regió apolar hidrofòbica. Al grup fosfat se li uneix un altre grup d'àtoms com la colina, serina o etanolamina, i d'altres que de vegades tenen càrrega elèctrica, formant el cap polar hidrofílic. Els fosfolípids es classifiquen principalment segons els seus diferents caps polars. La Figura 1 mostra l'estructura típica d'un fosfolípid i la nomenclatura dels més representatius. El grup de les **fosfatidilcolines** ha estat l'utilitzat en aquesta tesi.

FIGURA 1: Estructura i nomenclatura dels fosfolípids més representatius



Els àcids grassos de les cues apolars es diferencien pel nombre d'àtoms de carboni, així com pel nombre de dobles enllaços o insaturacions de la molècula. En aquesta tesi els fosfolípids utilitzats han estat la **dipalmitoil fosfatidilcolina** (DPPC), la **dimiristoil fosfatidilcolina** (DMPC) i la **dihexanoil fosfatidilcolina** (DHPC) que tenen les estructures moleculars indicades en la Figura 2.

FIGURA 2: Estructura dels fosfolípids utilitzats en aquesta tesi.



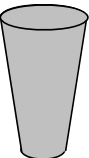
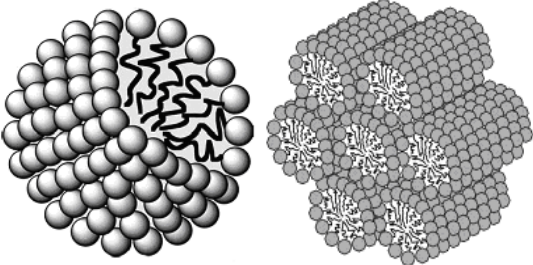
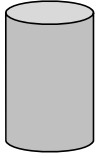
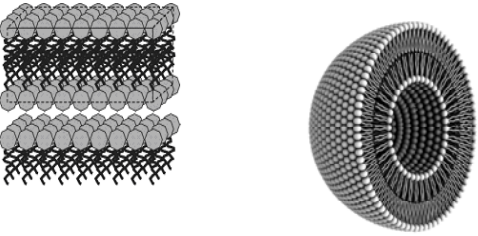
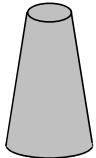
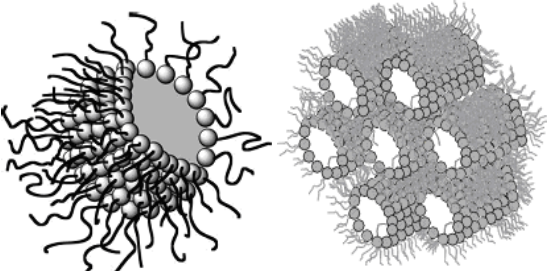
Quan aquestes molècules es posen en contacte amb l'aigua es produeix un efecte hidrofòbic, generant-se agregats de lípids amb els caps polars en contacte amb l'aigua i les cues hidrocarbonades orientades cap a l'interior.

1.1.1- Agregats fosfolipídics en solució

L'agregació espontània dels fosfolípids no només està determinada per l'efecte hidrofòbic esmentat anteriorment, també s'ha de tenir en compte la geometria dels fosfolípids. Aquesta geometria depèn del volum del grup hidrofòbic, l'àrea efectiva del cap polar i la longitud de les cadenes hidrocarbonades. Sabent aquests paràmetres es pot considerar la geometria de les molècules amfifíliques i predir la seva agregació més favorable.

En la Taula 1 s'indiquen les diferents formes geomètriques de les molècules amfifíliques i la seva agregació més favorable en solució.

TAULA 1. Relació entre la forma geomètrica de diferents molècules amfifíliques i la seva agregació més favorable

Lípids	Forma	Agregació
Lisofosfolípids		
Fosfatidilcolines Fosfatidilserines Fosfatidilglicerols		
Fosfatidiletanolamines		

Els lípids d'una sola cua hidrofòbica, tenen el cap polar relativament gran comparat amb la cua i s'agreguen en forma de micel·les esfèriques o micel·les tubulars. Els lípids de doble cadena, al tenir una estructura geomètrica semblant a un tub cilíndric, s'agreguen en forma de bicapes planes o tancades formant vesícules i liposomes. Existeixen alguns lípids de doble cadena que a causa de la seva estructura tenen una àrea del cap polar petita comparada amb la secció de la cua; aquests lípids solen formar estructures de micel·les inverses.

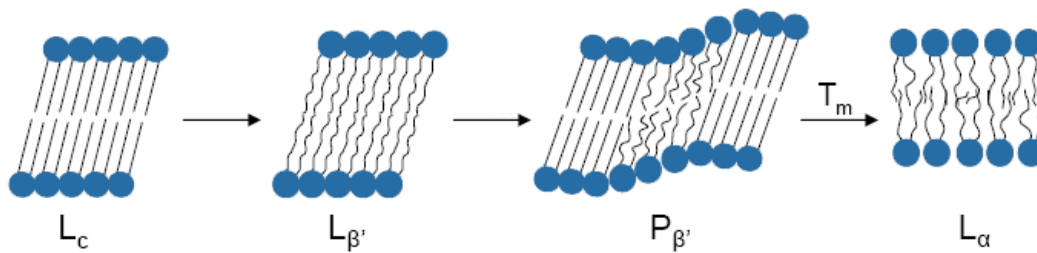
El grup de les **fosfatidilcolines** tenen una forma de tub cilíndric i, per tant, s'autoagreguen formant **bicapes**.

1.1.1.1-Comportament fàsic de les bicapes fosfolipídiques

En una solució concentrada els agregats lipídics formen una varietat de fases cristal·lines. Les més comunes són les fases hexagonal i laminar. La fase hexagonal (H) és una estructura periòdica en dues dimensions que consisteix en micel·les cilíndriques paral·leles empaquetades hexagonalment i amb una longitud infinita. Pot tenir dues tipologies, normal (H_I) o inversa (H_{II}). La fase laminar (L) consta de piles de bicapes separades per molècules d'aigua.

Les bicapes fosfolipídiques formen fases laminars en medi aquós. Aquestes fases es poden trobar, en funció de la temperatura, en dos estats diferents: estat gel (les cadenes hidrocarbonades del lípid estan rígides i ordenades), i estat líquid cristal·lí o fluid (les cadenes hidrocarbonades dels lípids estan mòbils). La temperatura a la qual es produeix el canvi d'estat de gel a cristall-líquid s'anomena temperatura de transició de fase (T_m). A valors de temperatura inferiors a la T_m , el lípid es troba en fase gel i a valors superiors, es troba en fase de cristall-líquid (Keough i Davis, 1979).

Dins de la fase gel existeixen diferents subfases que dependran del tipus de fosfolípids considerats. Per exemple, en el cas dels sistemes de DPPC en medi aquós, a baixes temperatures les bicapes estan en fase cristal·lina (L_C), amb una densa estructura cristal·lina. Augmentant la temperatura, les bicapes adopten una fase gel inclinada ($L_{\beta'}$), en aquesta fase els lípids no estan tan atapeïts com en la fase cristal·lina, però la membrana encara té un alt grau d'ordenament. Degut a que el DPPC té el cap polar molt voluminós, abans d'experimentar la transició principal a fase cristall-líquid (L_{α}), presenta una pretransició de $L_{\beta'}$ a "ripple" fase ($P_{\beta'}$), on les bicapes presenten unes ondulacions (Huang i Li, 1999; Koynova i Caffrey, 1998; Pedersen i cols, 2001). En la Figura 3 es pot veure una representació de les transicions dins de la fase gel i entre la fase gel i la de cristall-líquid.

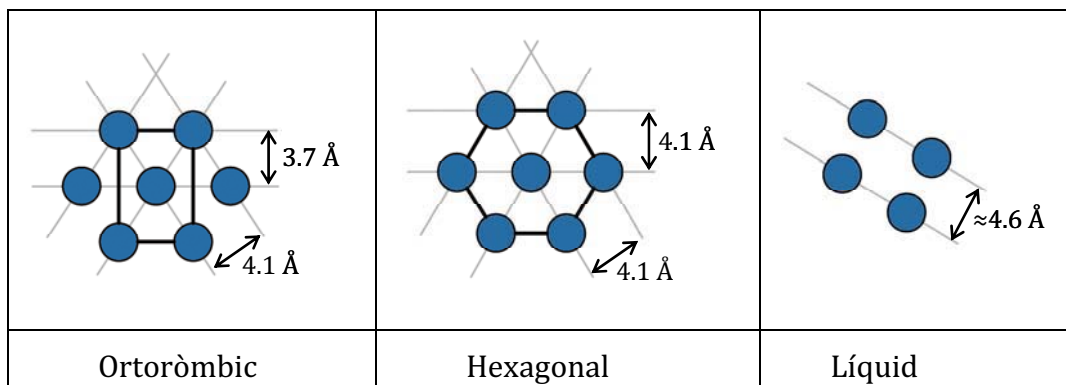
FIGURA 3. Transicions de fase dels sistemes de DPPC en medi aquós.

La T_m depèn de les propietats dels lípids que constitueixen la bicapa. La presència de fosfolípids de cadena curta o amb insaturacions en les seves cadenes hidrocarbonades produeix un descens de la T_m ; una menor longitud de les cadenes redueix la tendència de les cues a interaccionar entre elles, i la presència de dobles enllaços produeix torsions a les cues apolars que poden facilitar la seva mobilitat. D'altra banda, la presència de fosfolípids saturats en la bicapa, augmenta la seva T_m pel fet que aquests fosfolípids presenten una elevada capacitat d'agrupació i baixa mobilitat (Alberts i cols, 2002). La introducció de noves molècules en les bicapes lipídiques també farà variar la seva T_m , tal i com es podrà veure en aquesta tesi.

La mesura d'aquestes temperatures de transició i altres propietats termodinàmiques s'han dut a terme mitjançant la tècnica de calorimetria diferencial d'escombrat (DSC).

En les fases laminars, les bicapes lipídiques es caracteritzen pel seu gruix. En la fase gel, el gruix és major que en la fase de cristall-líquid. Aquest gruix també pot variar quan s'introdueixen noves molècules dins de les bicapes o quan varia el contingut d'aigua de la mostra entre d'altres factors. Una tècnica que s'usa per a calcular aquest gruix és la dispersió de raig X a angles petits (*"Small Angle X-ray Scattering"*, SAXS). Aquesta tècnica dona un valor d'espaiat entre bicapes que es pot relacionar amb l'espessor. Un altre paràmetre que caracteritza les bicapes lipídiques és l'empaquetament lateral de les cadenes alquíliques dels fosfolípids. Les distàncies associades a la simetria entre les cadenes es mesuren per dispersió de raig X a angles grans (*"Wide Angle X-ray Scattering"*, WAXS). Depenent d'aquestes distàncies es pot parlar d'empaquetament ortoròmbic, hexagonal o líquid cristal·lí, com s'indica en la Figura 4.

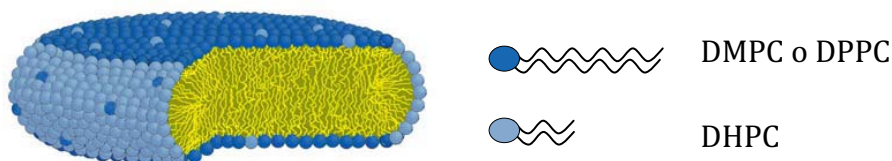
FIGURA 4. Empaquetament lateral de les cadenes alquíliques dels fosfolípids.



1.1.1.2-Sistemes bicel·lars

Els sistemes bicel·lars són nanoagregats constituïts per fosfolípids de cadena alquílica llarga i fosfolípids de cadena curta en medi aquós que adopten una sèrie de morfologies des de petits discs a bicapes planes o bicapes perforades. Els nanoagregats més comuns són les bicel·les. Aquestes s'han descrit com nanoestructures discoïdals d'aproximadament 15-50 nm de diàmetre (Barbosa-Barros i cols, 2012), on les molècules de fosfolípids de cadena llarga estan ordenats com una bicapa plana i els fosfolípids de cadena curta s'organitzen en les vores, tancant l'estructura (Figura 5). Els lípids de cadena llarga més usats són la dimiristoil i la dipalmitoil fosfatidilcolina (DMPC i DPPC) i el lípid de cadena curta d'ús més freqüent és la dihexanoil fosfatidilcolina (DHPC) (Visscher i cols, 2006; Vold i Prosser, 1996). En aquesta tesi s'usarà el terme de sistemes bicel·lars per a tots els nanoagregats formats per fosfolípids de cadena curta i fosfolípids de cadena llarga, i bicel·les s'anomenaran a les agregacions en forma discoïdal.

FIGURA 5: Estructura organitzada d'una bicel·la.

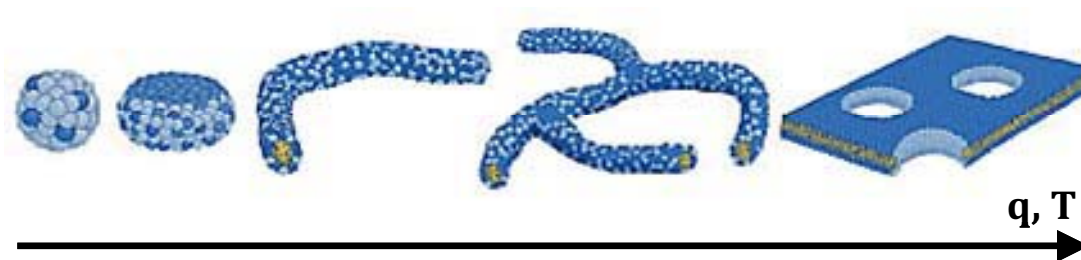


L'estructura bicel·lar va ser desenvolupada per Sanders i Schwonek (Sanders i Schwonek, 1992) per resoldre els problemes experimentals relacionats amb l'ús

de vesícules lipídiques i micel·les com a models de membrana per a estudis de les característiques de proteïnes per ressonància magnètica nuclear (RMN). Les bicel·les exhibeixen una morfologia intermèdia entre vesícules lipídiques i micel·les, que combina algunes de les propietats més atractives de tots dos sistemes. Similar a les micel·les, les bicel·les no estan compartimentades i són òpticament transparents. Com les vesícules lipídiques, les bicel·les estan formades per una bicapa, que permet l'encapsulació de molècules lipòfiles en la seva estructura.

Depenent de la composició i de la temperatura aquests sistemes poden tenir diferents geometries (Sternin i cols, 2001; Struppe i Vold, 1998; van Dam i cols, 2006). Totes les teories proposades per a les diferents geometries que presenten els sistemes bicel·lars coincideixen en que les dimensions dels agregats augmenten amb l'augment de la temperatura, i la relació molar entre el fosfolípid de cadena alquílica llarga i el fosfolípid de cadena curta (q). Una de les últimes teories és la proposada per van Dam i cols (Figura 6), la qual descriu les micel·les mixtes esfèriques com a l'estructura més petita i les làmines perforades com la major estructura. Entre aquestes dues estructures proposa les bicel·les, les micel·les mixtes cilíndriques i les micel·les mixtes cilíndriques ramificades.

FIGURA 6. Esquema representatiu de les diferents estructures proposades per van Dam i cols en funció de la temperatura i el paràmetre q .

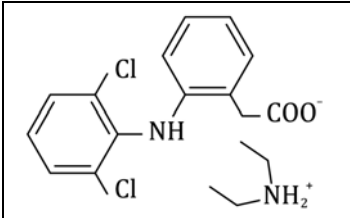
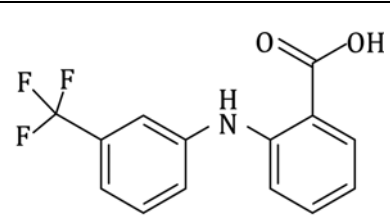


1.2-Principis actius

En aquesta tesi s'han utilitzat els següents principis actius: cafeïna, àcid salicílic, diclofenac de dietilamina (DDEA) i àcid flufenàmic (FFA). La cafeïna i l'àcid salicílic han estat usats, en particular, per a investigar l'absorció percutània en pell quan la seva funció barrera està deteriorada. En canvi el diclofenac i l'àcid flufenàmic s'han inclòs en sistemes bicel·lars i s'ha realitzat una investigació més sistemàtica donada la seva importància com a antiinflamatoris d'acció tòpica. Es per això que s'aprofundirà més en aquests dos últims principis actius.

Ambdós antiinflamatoris pertanyen al grup dels antiinflamatoris no esteroides (AINEs). El DDEA és un derivat de l'àcid fenilacètic i el FFA de l'àcid antranílic. En la Figura 7 es pot veure l'estructura química i alguna propietat físico-química com el logaritme del coeficient de partició octanol-aigua ($\log P_{ow}$), el qual és indicatiu de la lipofilitat d'un compost.

FIGURA 7. Estructura i propietats físico-químiques del DDEA i el FFA.

	 <p>DDEA</p>	 <p>FFA</p>
	Diclofenac - dietilamina	Àcid flufenàmic
Pes Molecular	369,28 D	281,23 D
$\log P_{ow}$	0,85	4,4

Tant el DDEA com el FFA poden causar efectes secundaris associats a desordres gastrointestinals quan són administrats per via oral i lesions cutànies quan s'administren per injecció intramuscular (Galer i cols, 2000). Atès que la via cutània normalment redueix els efectes secundaris gastrointestinals com ulceracions i hemorràgies (Warner i cols, 1999) i evita les injeccions, s'ha reconegut com una alternativa útil a l'administració oral i intramuscular de fàrmacs. A més, en comparació amb la via d'administració oral tradicional, l'administració transdèrmica mostra avantatges addicionals com evitar la degradació del fàrmac per l'acidesa extrema de l'estómac, la prevenció del lliurament erràtic a causa de les interaccions d'aliments, i el lliurament més controlat del fàrmac (Cleary, 2003). Per tant, la inclusió del DDEA i del FFA en sistemes bicel·lars per la seva aplicació tòpica que la present tesi proposa en els seus articles 1,2,3,4 i 6 podria ser molt avantatjós.

1.2.1- Quantificació cromatogràfica per HPLC

Els principis actius utilitzats en aquesta tesi han estat quantificats per cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) amb detector d'ultraviolat (UV). Aquests compostos han estat analitzats tant de les mostres preparades per l'aplicació tòpica com de les extraccions dels estudis d'absorció percutània.

L'HPLC és una tècnica de separació basada en la diferent distribució dels components d'una mescla entre una fase mòbil i una fase estacionària (columna). Les fases són escollides de tal manera que els soluts es distribueixen de diferent manera entre elles. És a dir, o tenen més tendència a quedar retinguts a la fase estacionària, o tenen més tendència a ser eluïts per la fase mòbil. A conseqüència de la seva diferent mobilitat, els components de la mescla es separen en bandes (pics cromatogràfics). Les àrees d'aquests pics cromatogràfics es poden quantificar i relacionar amb concentracions mitjançant les corresponents rectes de calibratge. En la Figura 8 es mostra l'equip cromatogràfic utilitzat en aquesta tesi (Hitachi Elite LaChrom).

FIGURA 8. Equip d'HPLC utilitzat en aquesta tesi.



1.3-Tècniques de caracterització dels sistemes bicel·lars

1.3.1-Tècnica de dispersió dinàmica de llum (DLS)

La dispersió dinàmica de llum ("*Dynamic Light Scattering*", DLS), és una de les tècniques més usades per a determinar alguns paràmetres físics com el coeficient de difusió, radi hidrodinàmic, radi de gir i polidispersió de partícules o agregats en suspensió (Merkus, 2009). Aquesta tècnica consisteix a fer incidir un feix de radiació amb longitud d'ona λ i vector d'ona $q = 2\pi/\lambda$ en una suspensió amb partícules que tenen un moviment brownià. En interactuar la radiació amb les partícules, una part de l'energia és absorbida, una altra és transmesa sense modificació del vector d'ona incident i una altra és dispersada en tot l'espai. La llum dispersada a un cert angle θ és col·lectada per un detector (fotomultiplicador). Estudiant la dispersió de la mostra en funció del vector d'ona de difusió $q = (4\pi/\lambda)\sin(\theta/2)$ (suposant que l'energia incident és igual a l'energia transmesa) i correlacionant les intensitats de dispersió a diferents temps es pot obtenir una funció d'autocorrelació.

Per partícules esfèriques monodisperses, la funció d'autocorrelació pot ser ajustada a la següent funció exponencial depenent del temps, t :

$$g(t) = A \exp(-2t/t_R) + B$$

On A és una constant instrumental, B és la línia base i t_R és el temps de relaxació. Aquest t_R està relacionat amb un coeficient de difusió (D) per l'equació:

$$t_R = 1/Dq^2$$

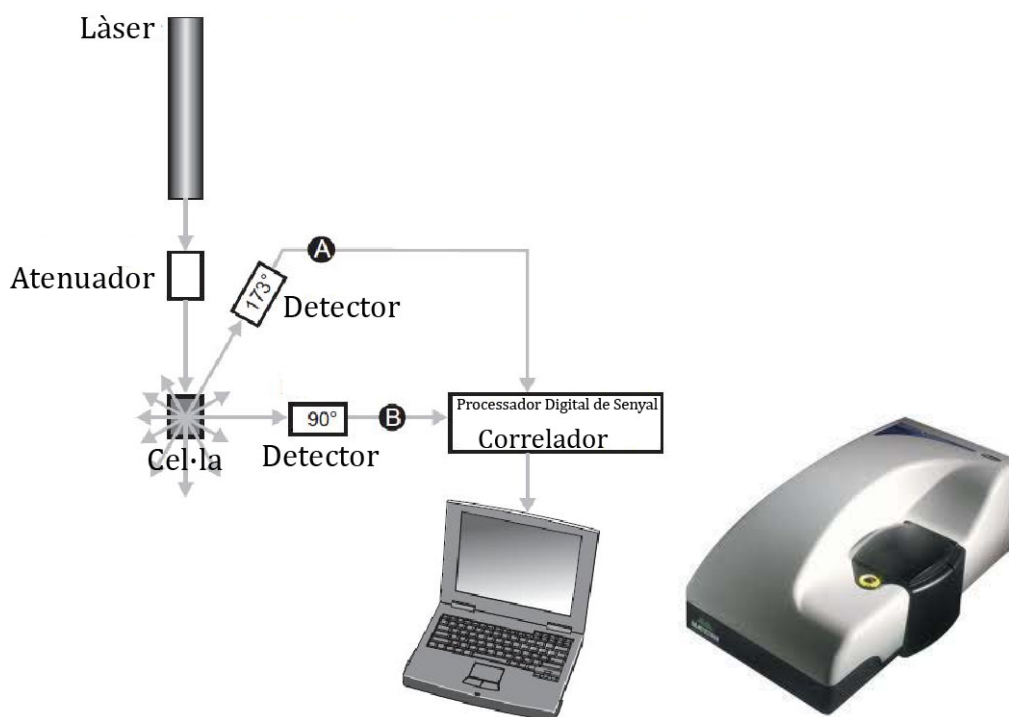
Aplicant l'equació d'Stokes-Einstein, es pot associar un radi hidrodinàmic característic R_h a cada D :

$$D = k_B T / 6\pi\eta R_h$$

On k_B és la constant de Boltzman, T és la temperatura absoluta i η és la viscositat del sistema.

En termes generals tots els equips de dispersió de llum contenen els mateixos components com són: una font de radiació, un atenuador de la llum, un detector situat a l'angle de dispersió i un correlador (Figura 9).

FIGURA 9. Esquema de l'equip de dispersió dinàmica de llum i fotografia de l'equip utilitzat (Zetasizer nano ZS, Malvern Instruments, UK)



Per tal de minimitzar la dispersió múltiple, la tecnologia no invasiva de retrodispersió (“*Non Invasive Back Scatter*”, NIBS) va ser utilitzada en els treballs 1,2 i 4 que han donat lloc a aquesta tesi. Amb aquesta tecnologia, la detecció de la dispersió es realitza en un angle de 173° i, per tant, el feix de llum no ha de viatjar per tota la mostra. Així s’elimina o es pot reduir un efecte anomenat dispersió múltiple, on la llum dispersada per una partícula és alhora dispersada per altres partícules donant un error en la mesura. Aquesta estratègia permet la mesura de mostres concentrades com és el cas dels sistemes bicel·lars investigats en aquesta tesi.

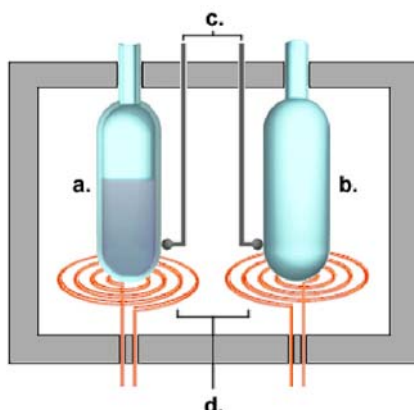
1.3.2-Calorimetria diferencial d’escombrat (DSC)

La calorimetria diferencial d’escombrat (“*Differential Scanning Calorimetry*”, DSC) és una eina fonamental per a l’avaluació sistemàtica de les propietats termodinàmiques dels sistemes lipídics i, permet conèixer les corresponents transicions de fase (Huang i Li, 1999). Aquesta tècnica és útil per investigar les interaccions de determinats compostos amb els lípids que formen, en el nostre cas, els sistemes bicel·lars.

DSC és una tècnica d’anàlisi tèrmic que mesura l’energia absorbida o emesa per una mostra en funció de la temperatura en comparació amb un estàndard quan

les dues mostres s'escalfen o refreden uniformement amb un gradient controlat de temperatures. La mostra de referència i la mostra a avaluar es posen en dues cel·les que s'escalfen mantenint una temperatura idèntica en les dues mostres (Figura 10). Quan la mostra es sotmet a una transformació física, com és el cas de les transicions de fase, el calor ha de fluir per a mantenir la mostra de referència a la mateixa temperatura. La mostra emetrà o absorbirà calor en funció de si el procés és exotèrmic o endotèrmic. Les dades obtingudes es visualitzen en forma de termogrames a través d'un *software* (en aquest cas s'ha utilitzat el STAR 9.2 de Mettler Toledo). Les temperatures on es visualitzen els màxims (o mínims segons si es tracta de processos exotèrmics o endotèrmics) dels pics termogràfics es defineixen com les temperatures de transició. La temperatura associada al màxim (o mínim) del pic més gran (deixant de banda el pic de congelació de l'aigua) és l'anomenada T_m o temperatura de transició de fase dels sistemes fosfolipídics, que ja s'ha comentat anteriorment.

FIGURA 10. Representació esquemàtica d'un calorímetre diferencial d'escombrat: a. càmera de mostreig, b. càmera de referència, c. sensors de temperatura, d. escalfadors.



Per tant, mitjançant aquesta tècnica s'han pogut conèixer les transicions de fase dels fosfolípids presents en els sistemes bicel·lars i els canvis produïts per la inclusió de DDEA i FFA en aquests sistemes. Aquestes dades han estat incloses en els articles 2 i 6 que han donat lloc a aquesta tesi.

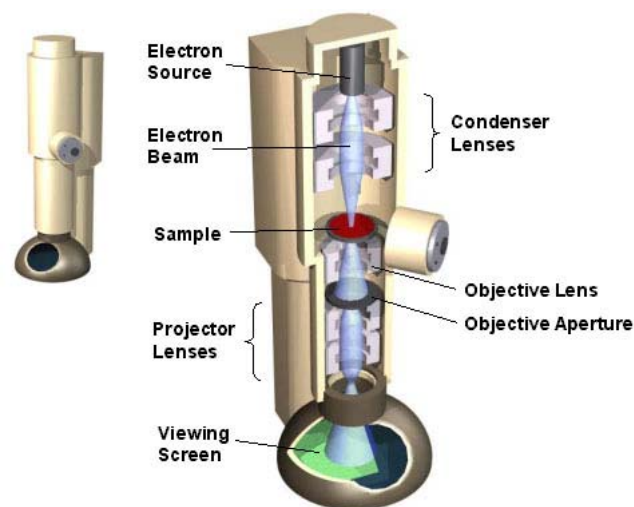
Les mesures de DSC es van dur a terme utilitzant l'aparell calorimètric DSC 821E Mettler Toledo (Greifensee, Switzerland) del Servei d'Anàlisi Tèrmica (SAT) de l'Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC-CSIC), sota l'assistència tècnica del Sr. Josep Carilla.

1.3.3-Microscòpia electrònica de transmissió (TEM)

La microscòpia electrònica de transmissió (*Transmission Electron Microscopy*, TEM) utilitza com a font d'il·luminació un feix electrònic que és dirigit i focalitzat mitjançant lents electromagnètiques. Aquest procés es realitza a l'interior d'una columna en condicions d'alt buit, de manera que els electrons accelerats segueixen trajectòries rectes llevat que interaccionin amb els àtoms presents en la mostra.

El xoc dels electrons amb els àtoms de la mostra fa que aquests perdin velocitat i variïn la seva trajectòria. Els electrons que no xoquen amb la mostra es projecten sobre una pantalla fluorescent, placa fotogràfica o CCD (*Charge Coupled Device*) d'una càmera formant imatges reals. En formar la imatge, les zones que més desvien els electrons apareixeran més fosques que les que desvien menys. A causa que els electrons tenen una longitud d'ona molt menor que la de la llum poden mostrar estructures molt més petites que les tècniques de microscòpia òptiques.

FIGURA 11. Esquema d'un microscopi electrònic de transmissió (extret de Barrett Research Group)



Les parts principals d'un microscopi electrònic són les següents (Figura 11):

- Canó d'electrons, que emet els electrons que xoquen contra la mostra, creant una imatge augmentada.
- Lents magnètiques per crear camps que dirigeixen i enfoquen el feix d'electrons.

- Sistema de buit, que és una part molt important del microscopi electrònic. A causa que els electrons poden ser desviats per les molècules de l'aire, s'ha de fer un buit gairebé total a l'interior d'un microscopi d'aquestes característiques.

- Placa fotogràfica o pantalla fluorescent que es col·loca darrere de l'objecte a visualitzar per registrar la imatge augmentada.

- Sistema de registre que mostra la imatge que produeixen els electrons i que sol ser un ordinador.

Els experiments de microscòpia electrònica s'han realitzat en la unitat de Crio-Microscòpia Electrònica dels Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona (CCiT-UB), sota l'assistència tècnica de la Dra. Carmen López i de la Dra. Elisenda Coll.

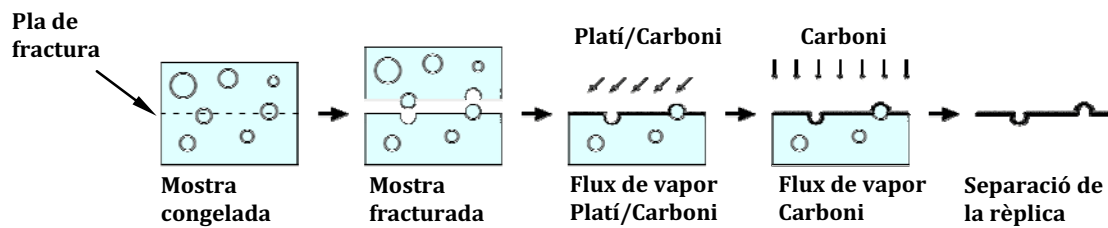
1.3.3.1-Microscòpia electrònica de criofractura (FFEM)

L'observació de mostres amb un microscopi electrònic requereix un procés previ de preparació de la mostra que implica una immobilització. Diferents mètodes són usats per assolir aquesta immobilització. En l'estudi de sistemes bicel·lars, la criofixació per immersió en propà i la criofractura són les metodologies més freqüentment emprades. El procediment dut a terme en la preparació de les mostres per criofractura es basa en el descrit per Egelhaaf (Egelhaaf i cols, 1996). En la Figura 12 s'indiquen les etapes experimentals seguides per a la preparació de les mostres que són les següents:

- Congelació sobtada de la mostra (criofixació) introduint la mostra, que s'ha col·locat entre dues petites plaques de coure, en un bany de propà líquid (-189 °C). Així es conserva l'estructura de la mostra i permet observar els agregats tal i com es troben en solució.

- Fracturació de la mostra introduint-la en un aparell amb un sistema de "freeze-etching" (BALTEC BAF 300), on les plaques de coure són separades brusquement i la mostra es fracturada en unes condicions de -150 °C i 10^{-8} mbar de pressió. Les mostres es fracturen per la part més fràgil, que és, en el cas de bicapes lipídiques, longitudinalment enmig de la bicapa.

- Obtenció d'una rèplica de la mostra fracturada. Mantenint la mostra en l'aparell de fractura, es sotmet a un flux de vapor de platí-carboni a un angle de 45°. A continuació s'evapora carboni a un angle de 90° sobre la mostra. El platí provoca un augment de contrast i el carboni, que no es visible al microscopi, fa de suport físic.

FIGURA 12. Esquema del procés de criofixació i replicació.

-Neteja de les rèpliques i els suports amb hipoclorit sòdic per a treure completament la matèria orgànica que pugui quedar, deixant així només les rèpliques de platí-carboni.

Un cop s'han obtingut les rèpliques, ja poden ser observades pel microscopi electrònic a temperatura ambient.

Aquesta tècnica és especialment útil per visualitzar principalment bicapes i estructures multilaminars amb dimensions superiors a 10-20 nm (Papahadjopoulos-Sternberg, 2010). Aquesta tècnica de microscòpia ha estat útil per observar les diferents estructures lipídiques que han format els sistemes bicel·lars que han inclòs FFA. Les micrografies obtingudes han estat incloses en l'article 2 de la secció de resultats.

1.3.3.2-Criomicroscòpia electrònica de transmissió (Cryo-TEM)

Amb el mètode de Cryo-TEM es poden examinar espècimens en el seu estat nadiu a temperatures molt baixes (-170 °C) gràcies a la vitrificació. La vitrificació és una de les tècniques de criofixació per la qual a través d'una congelació molt ràpida s'aconsegueix la vitrificació de l'aigua de la mostra sense la formació de cristalls de gel que poden generar danys en les estructures que es volen visualitzar. Aquesta tècnica ha obert la possibilitat d'obtenir imatges directes d'agregats d'amfifílics en solució aquosa (Almgren i cols, 2000).

El procés de vitrificació de les mostres s'ha realitzat de forma automatitzada amb l'aparell anomenat *Vitrobot*. En aquest aparell, una petita quantitat de mostra es col·loca en una reixeta de coure amb una pel·lícula de carboni a sobre. A través d'un procés anomenat "*blotting*", l'aparell amb un paper de filtre absorbeix la mostra sobrant i es queda una pel·lícula fina de mostra sobre la reixeta. A continuació la mostra es vitrifica submergint-la immediatament en età líquid (-180 °C). Les mostres s'emmagatzemen en nitrogen líquid (-196 °C) abans de ser examinades per TEM a baixes temperatures.

FIGURA 13. Imatge de l'aparell utilitzat per a la vitrificació de les mostres (Vitrobot)



La morfologia i la mida dels sistemes bicel·lars van ser estudiats mitjançant aquesta tècnica ja que permet la visualització d'estructures petites en medi aquós. Les micrografies obtingudes mitjançant aquesta tècnica han estat incloses en els articles 1, 2 i 4 d'aquesta tesi.

1.3.4 Tècniques de dispersió de raigs X

La dispersió de raig X és un mètode no destructiu que avalua el patró de dispersió de raigs X obtingut per la interacció entre la radiació incident i els electrons dels àtoms de la matèria a analitzar (Figura 14). Aquest patró de dispersió reflexa diferents intensitats de raigs X en diferents angles de dispersió.

La intensitat de dispersió I (en unitats arbitràries) es mesura en funció del mòdul del vector de dispersió q (en \AA^{-1}). Aquest últim es defineix com:

$$|q| = (4\pi \sin\theta) / \lambda$$

on θ és l'angle de dispersió i λ és la longitud d'ona de la radiació (1.542 \AA). La posició dels pics de dispersió està directament relacionada amb la distància de repetició (d) de l'estructura molecular, com descriu la llei de Bragg (Bragg, 1913):

$$2d \sin \theta = n\lambda$$

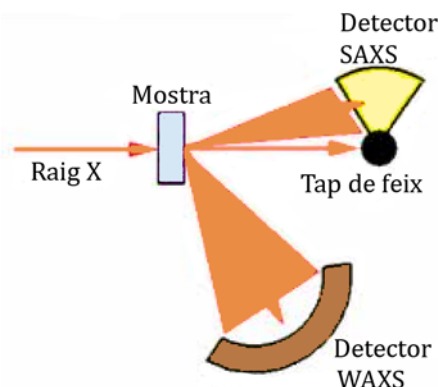
on n i d són l'ordre del pic de difracció i la distància de repetició, respectivament. En el cas d'una estructura laminar, els pics es troben en diverses posicions equidistants, i:

$$q_n = 2\pi n / d$$

on q_n és el mòdul del vector de dispersió que indica la posició de l' n ordre de reflexió.

Els experiments de dispersió de raigs X són de gran valor en l'estudi del comportament de les fases i l'organització de lípids (Pereira-Lachataignerais i cols, 2006). La dispersió de raigs X a angles petits (SAXS) proporciona informació sobre les unitats estructurals més grans d'una mostra donada. En el cas dels estudis realitzats en aquesta tesi, la distància de repetició laminar (d) es va estimar a partir de l'anàlisi dels pics del patró de dispersió per la llei de Bragg i es va relacionar amb el gruix de la bicapa com en els estudis amb liposomes i altres models de bicapa (Barbosa-Barros i cols, 2008a; López i cols, 2000). Per altra banda, la dispersió de raigs X a angles grans (WAXS) ha permès obtenir informació sobre l'empaquetament lateral dels lípids en les bicapes proporcionant la distància entre molècules veïnes (d_c) (Sega i cols, 2007) que també és estimada per la llei de Bragg.

FIGURA 14. Representació esquemàtica d'una mesura de SAXS/WAXS



Les mesures de SAXS i WAXS amb radiació convencional es van dur a terme utilitzant l'aparell SAXS/WAXS S3 MICRO (Hecus GmbH, Graz, Àustria) del Servei SAXS-WAXS de l'Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC-CSIC), sota l'assistència tècnica del Sr. Jaume Caelles. Els resultats d'aquestes tècniques de dispersió de raig X amb radiació convencional es mostren en els articles 2 i 6 de l'apartat de resultats.

1.4-La pell com a via d'administració de principis actius

1.4.1-Característiques de la pell

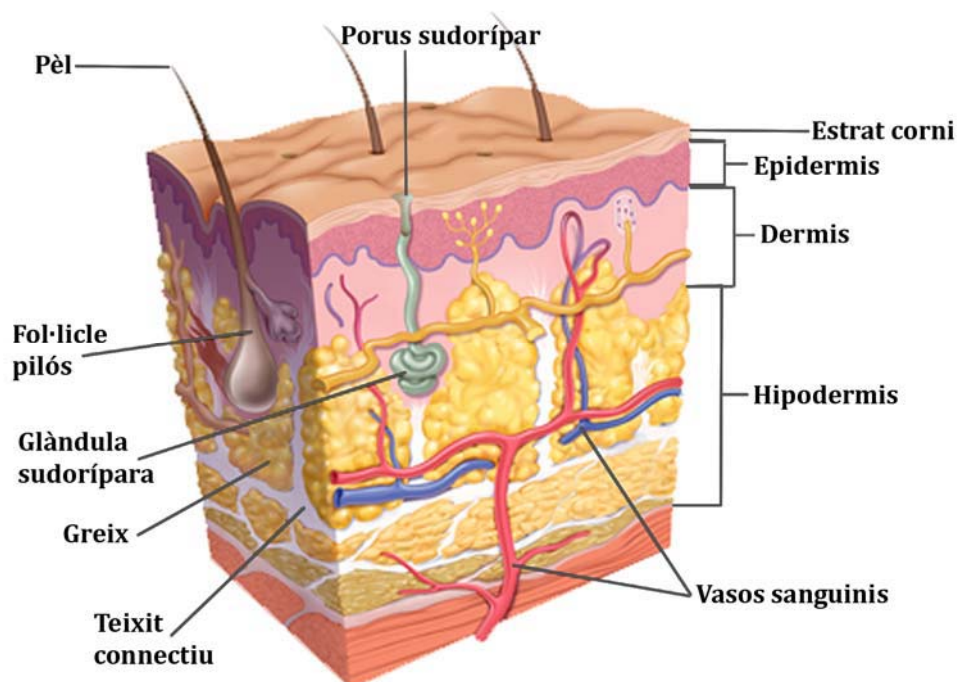
La pell (Figura 15) és la coberta externa del cos humà i un dels òrgans més importants del mateix tant per grandària com per les seves funcions. Representa més del 10% del cos en pes (Schaefer i Redermeier, 1996; Walters i Roberts, 2002) del cos. La pell sana és una barrera contra agressions mecàniques i químiques, tòxics, calor, fred, radiacions ultraviolades i microorganismes patògens. A més, la

pell és essencial pel manteniment de l'equilibri de fluids corporals actuant com a barrera davant la possible pèrdua d'aigua (pèrdua transepidermica d'aigua), el manteniment de l'equilibri tèrmic i la transmissió d'una gran quantitat d'informació externa que accedeix a l'organisme per receptors del tacte, la pressió, la temperatura i el dolor.

La barrera física de la pell consisteix en la defensa contra la intrusió d'agents biològics i físics. L'intercanvi de calor entre el cos i els seu voltant està regulat per dos apèndixs de la pell, les glàndules sudorípares i el cabell. La protecció contra la pèrdua d'aigua i els agents químics és principalment proporcionada per l'estrat corni (EC). Aquesta és la capa més externa de la pell que és molt lipòfila i forma una barrera entre el cos i el seu entorn, que el protegeix contra la pèrdua d'aigua endògena i la penetració exògena d'agents. La funció de barrera protectora de la pell no és total ja que és pràcticament permeable a totes les substàncies variant el seu grau de permeabilitat que depèn principalment de l'estat fisiològic de la pell. La permeabilitat de la pell pot ser modificada per substàncies externes a la pell com poden ser els diferents components presents en productes d'aplicació tòpica tant a nivell cosmètic com dermofarmacèutic.

En la Figura 15 es representa un esquema de l'estructura de la pell i els seus components.

FIGURA 15. Estructura de la pell.



La pell està constituïda per diferents capes (Schaefer i Redermeier, 1996):

-Estrat corni (EC): és el principal responsable de la seva funció barrera (Elias i Feingold, 2006) . En un apartat posterior s'ampliarà la informació donada la seva importància en la funció barrera de la pell.

-Epidermis: és el teixit viu més superficial de la pell. Té una estructura estratificada formada per diferents capes: estrat basal, estrat espinós i estrat granulós. El gruix de l'epidermis va de 0,04 mm a les parpelles fins a 1,5 mm als palmells de les mans.

-Dermis: és la capa més gran de la pell, és el teixit connectiu sobre el qual s'assenta l'epidermis i, per tant, és l'element que actua de sostenidor de l'epidermis. El col·lagen present en aquesta capa és el que proporciona turgència a la pell. La dermis és una estructura molt vascularitzada a partir de la qual es nodreix l'epidermis i d'ella parteixen els pèls i les glàndules sudorípares i sebàcies.

-Hipodermis: és la capa cutània més interna de la pell. Aquesta capa està formada de teixit connectiu lax i moltes de les seves fibres es fixen a les de la dermis, formant franges d'ancoratge, fixant així la pell a les estructures subjacents. L'espessor de la hipodermis és molt variable depenent de la seva localització, el pes corporal, el sexe o l'edat. Està formada per teixit adipós (d'aquí la denominació de greix subcutani). El teixit subcutani serveix de magatzem d'energia, a més d'aïllant tèrmic i de protector mecànic davant els cops.

1.4.1.1-L'estrat corni

És el principal responsable de la funció barrera de la pell. Fins fa poc temps, es considerava com el compartiment més extern de l'epidermis. No obstant, en l'actualitat, i degut a les específiques característiques funcionals i estructurals que presenta, es considera una capa independent de l'epidermis i se li dóna un protagonisme especial.

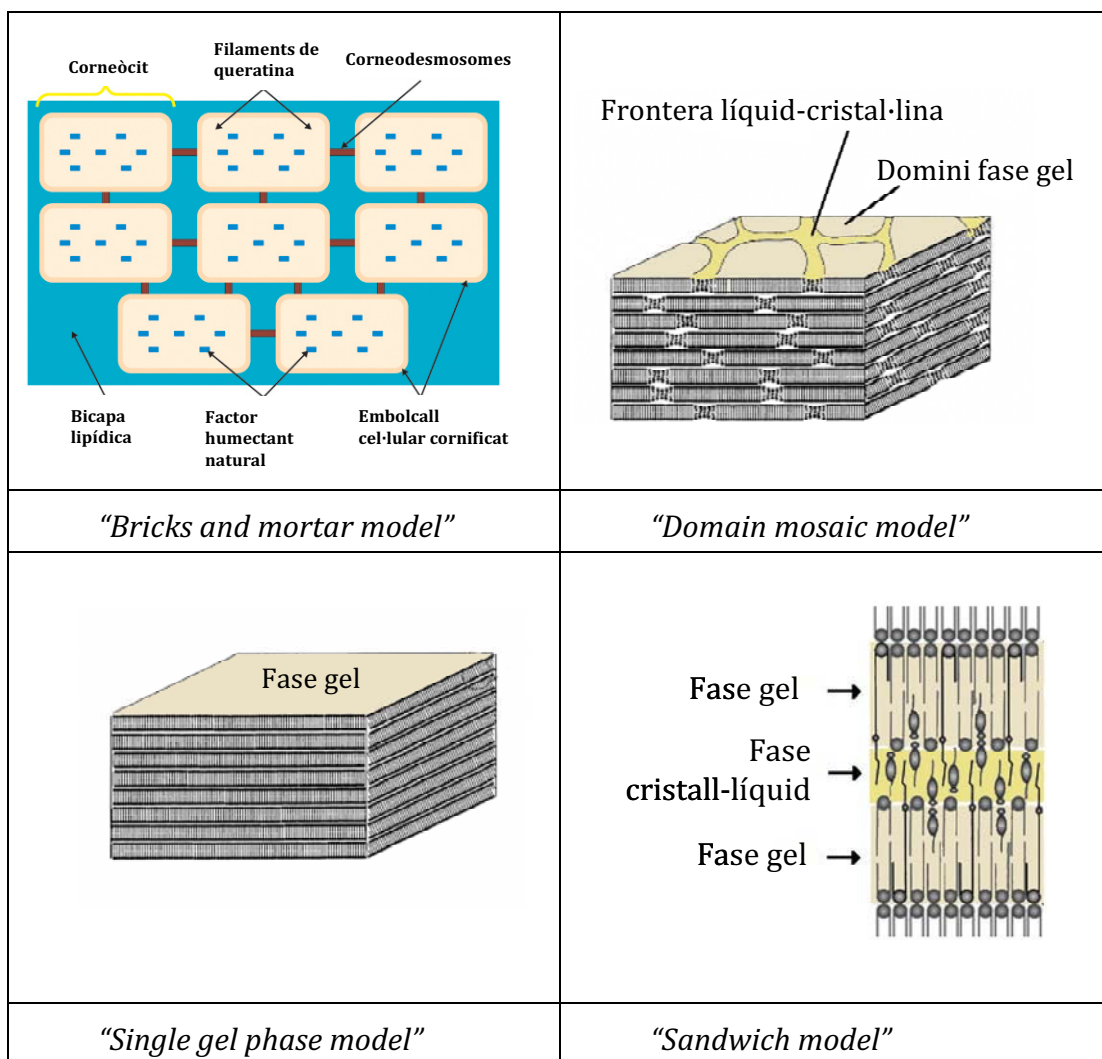
L'estat corni té un gruix entre 10 i 20 µm en pell normal. Està format per aproximadament 15 capes de cèl·lules anucleades cornificades riques en queratina anomenades corneòcits (Schaefer i Redermeier, 1996) suspeses en una matriu lipídica (Plewig i cols, 1997; Potts i Francoeur, 1990). Els corneòcits estan interconnectats mitjançant unes estructures proteiques anomenades corneodesmosomes que contribueixen a la cohesió del teixit. La funció barrera de l'EC s'atribueix al contingut i la composició dels lípids de l'estrat corni i, sobretot, a l'estructura organitzada que adquireix la matriu lipídica intercel·lular així com a dels lípids que envolten els corneòcits (Elias, 1991; Potts i Francoeur, 1990).

Els lípids del EC provenen o bé de la diferenciació dels queratinòcits (cèl·lules provinents de l'epidermis), o bé de la secreció sebàcia. Els primers s'anomenen

lípidis intercel·lulars i tenen un paper molt important en la funció barrera. La composició lipídica de l'EC és aproximadament la següent: 40-50 % de ceramides, 25 % de colesterol, 15-20 % d'àcids grassos lliures, 5 % de sulfat de colesterol y 2 % d'èsters de colesterol.

L'organització estructural de l'EC ha estat àmpliament estudiada, encara que no s'ha arribat a un consens en un model únic que descriu l'empaquetament lipídic. Han estat proposats molts models (Figura 16). Aquesta estructura de l'EC va ser modelitzada per primera vegada per Elias (Elias, 1988) com una paret de maons i ciment (*"bricks and mortar model"*), on els corneòcits representen els maons i les bicapes lipídiques situades en l'espai intercel·lular, el ciment. En aquest model inicial no es parlava de les fases físico-químiques en que podien estar les bicapes lipídiques.

FIGURA 16. Models proposats de l'organització estructural de l'estrat corni.



Posteriorment altres models han anat sorgint a mesura que s'han anat aplicant noves tècniques de caracterització. Forslind (Forslind, 1994; Forslind i cols, 1997) va proposar el model de mosaic de dominis, "*domain mosaic model*", on els lípids s'organitzen en dominis en fase gel i dominis en fase cristall-líquid. Un altre model es basa en que els lípids estan en una fase gel única, "*single gel phase model*" (Norlén, 2001). Bouwstra va proposar el model "*sandwich*" (Bouwstra i cols, 2000) on una capa central de lípids en fase cristall-líquid està envoltada per una capa de lípids en fase gel a banda i banda.

Els models descrits estan basats en els resultats obtinguts en estudis realitzats amb diferents tècniques. Tots aquests models coincideixen en una agregació laminar dels lípids que es pot observar per microscòpia electrònica de criosubstitució (FS-TEM); més endavant s'explica la base tècnica d'aquest mètode microscòpic. L'espectroscòpia infraroja per transformada de Fourier amb reflectància total atenuada (FTIR-ATR) ofereix informació sobre la mobilitat i l'empaquetament lateral dels lípids en l'EC (Ongpipattanakul i cols, 1994). La tècnica de SAXS utilitzant radiació sincrotró és una excel·lent eina per estudiar l'organització estructural del col·lagen a la pell i l'organització lipídica laminar de l'EC (Van den Bergh i cols, 1997).

1.4.2-Patologies de la pell: disfunció de la barrera cutània

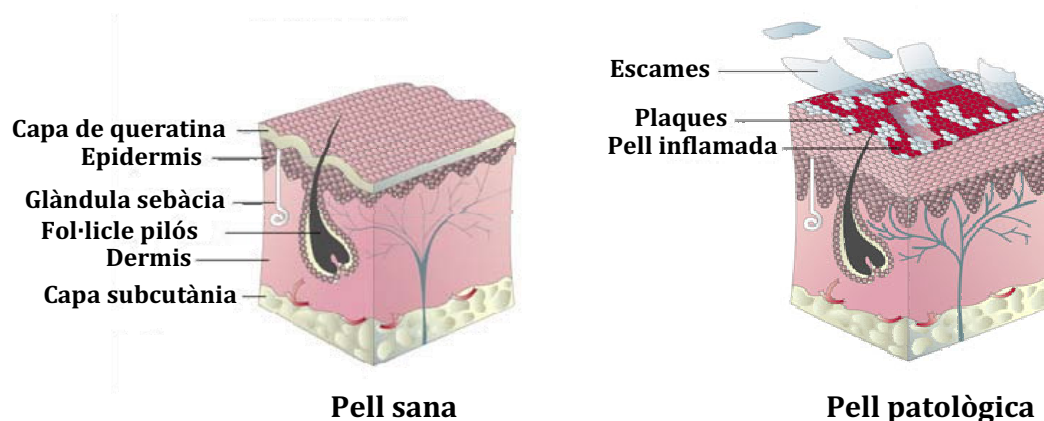
Les anomalies en la funció barrera de l'EC són presents en moltes malalties inflamatòries de la pell. Entre aquestes malalties existeixen la dermatitis atòpica i la psoriasis *vulgaris* que comparteixen la característica comú de tenir la funció barrera cutània deteriorada alterant la permeabilitat de la pell.

La dermatitis atòpica es defineix com un "defecte hereditari de la funció barrera", en el qual hi ha una disminució de la resistència davant irritants i una susceptibilitat a patir asma, febre del fenc i èczema. La pell eczematososa dels atòpics difereix de la pell sana en que la pèrdua transepidermica d'aigua ("*Transepidermal Water Loss*", TEWL) és superior i el grau d'hidratació és menor.

En la psoriasis el TEWL està incrementat entre 1 i 20 vegades, depenent de la severitat de la lesió. S'observen també canvis dramàtics en l'estructura lipídica de l'EC, podent-se detectar tant perturbacions en el subministrament de lípids dels cossos laminars durant la formació de l'EC com canvis generals en la composició lipídica.

En la Figura 17 es poden veure representades algunes de les diferències existents entre una pell sana i una patològica.

FIGURA 17. Esquema representatiu d'algunes de les diferències entre una pell sana i una pell patològica



1.4.2.1- Simulació *in vitro* de pell amb disfunció de la barrera cutània

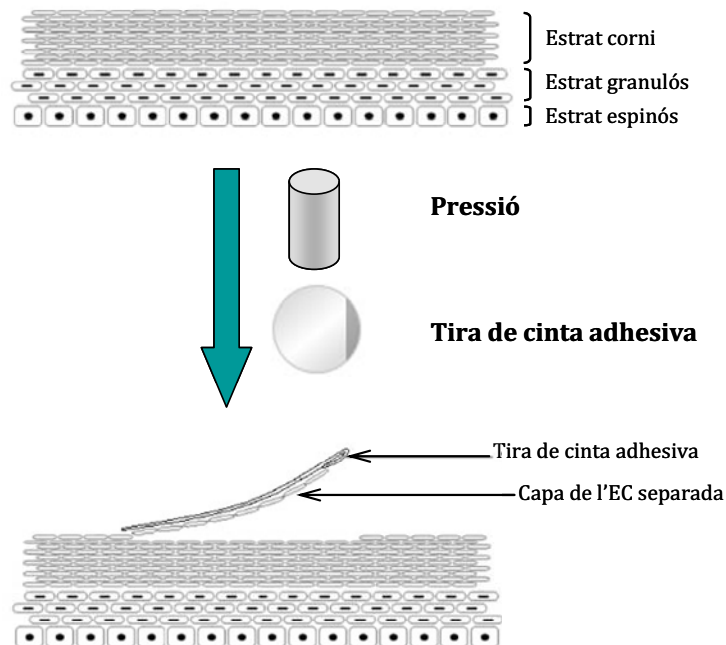
Sota diferents condicions patològiques, la funció de barrera de l'EC està deteriorada, com s'ha comentat anteriorment. Per tant, el desenvolupament d'un model *in vitro* de pell amb la funció barrera deteriorada podria ser convenient per a predir la biodisponibilitat, l'eficàcia clínica i els possibles efectes de toxicitat sistèmica en el desenvolupament de productes per al tractament de patologies de la pell.

Hi ha diferents metodologies per a alterar la funció barrera de l'EC: mètodes químics utilitzant acetona (Tsai i cols, 2001) o lauril sulfat sòdic (Nielsen, 2005; Nielsen i cols, 2007) i mètodes mecànics mitjançant "*tape-stripping*" (Sekkat i cols, 2004a; 2004b; Simonsen i Fullerton, 2007), puncions amb microagulles (Gomaa i cols, 2010) o abrasió amb paper de vidre (Wu i cols, 2006).

En els treballs 5 i 6 que han donat lloc a aquesta tesi, s'ha utilitzat el mètode del "*tape-stripping*" per a la simulació de pell amb la funció barrera deteriorada. Aquest és un mètode clàssic emprat habitualment per a l'avaluació farmacocinètica de l'absorció de fàrmacs en l'EC, però també pot ser utilitzat per danyar la barrera de la pell *in vivo* i *in vitro* (Jensen i cols, 2011; Senzui i cols, 2009; Simonsen i Fullerton, 2007).

Amb aquesta tècnica, les capes de l'EC són seqüencialment separades per l'aplicació repetida de tires de cinta adhesiva ("*tape-strip*") (Figura 18). En aquesta tesi s'ha emprat aquest mètode aplicant una pressió constant de 80 g/cm² durant 5 segons tant *in vivo* com *in vitro* abans de retirar la cinta adhesiva.

FIGURA 18: Esquema gràfic de la separació d'una capa d'EC amb una tira de cinta adhesiva.



1.4.2.2- Avaluació de l'alteració de la funció barrera de la pell

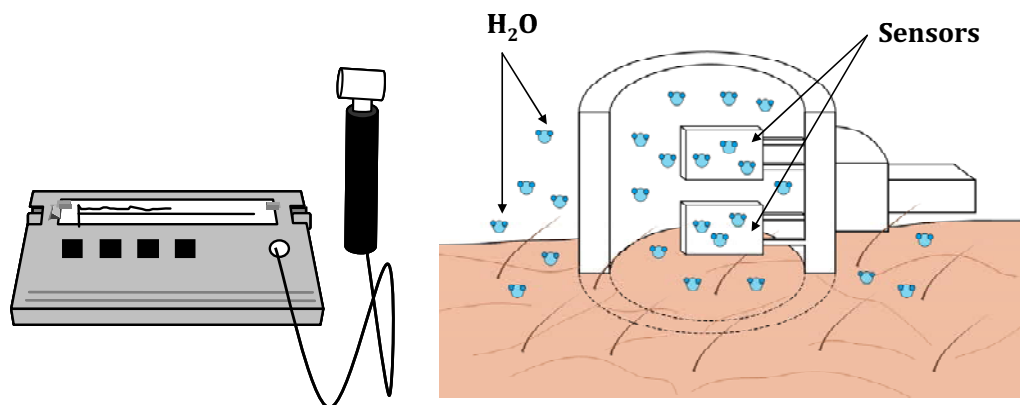
Hi ha dues tècniques principals per avaluar l'estat de la funció barrera de la pell acceptades per l'Organització per a la Cooperació i el Desenvolupament Econòmic (OECD, 2004): la mesura de la resistència elèctrica de la pell a un corrent altern i la mesura de la pèrdua transepidermica d'aigua, TEWL.

El TEWL és molt utilitzat per a la mesura de la integritat de la pell ja que és una tècnica senzilla de fer servir per quantificar les alteracions de la funció barrera de l'EC (Fuchs i cols, 2000). El TEWL es pot definir com la quantitat d'aigua per àrea superficial de pell i per unitat de temps que passa des de l'interior del cos, a través de l'epidermis, a l'exterior a través de la difusió i de la subsegüent evaporació cutània. Quan la funció barrera de la pell està deteriorada, la quantitat d'aigua que s'evapora augmenta. El TEWL, per tant, es pot emprar per determinar l'estat de la funció barrera de la pell (Fluhr i cols, 2006), sempre i quan es controlin altres factors que també poden afectar a la difusió de l'aigua com poden ser la temperatura i la humitat.

L'evaporímetre és l'aparell més utilitzat per a determinar el TEWL. Hi ha varis tipus d'evaporímetres però en aquesta tesi s'ha utilitzat el Tewameter® (Figura 19). En aquest aparell, el TEWL es mesura mitjançant una sonda que es situa en contacte sobre la pell. Aquesta sonda disposa d'uns sensors que apart de

mesurar el TEWL també indiquen la temperatura i la humitat de la superfície de la pell.

FIGURA 19: Esquema gràfic del Tewameter® utilitzat en aquesta tesi i de l'aplicació de la sonda sobre la superfície de la pell.



En aquesta tesi el TEWL ha estat utilitzat tant per avaluar la funció barrera després de l'aplicació seqüencial de "tape-strips" en pell porcina *in vitro* i pell humana *in vivo*, com per avaluar la integritat dels discs de pell que s'han utilitzat en els estudis d'absorció percutània que més endavant s'expliquen.

1.5- La pell i els sistemes lipídics

Hi ha sistemes lipídics que fa molt de temps que s'usen en l'aplicació de cosmètics o fàrmacs sobre la pell. D'entre ells destquen els liposomes i les micel·les mixtes, que ofereixen avantatges i inconvenients a l'hora del seu ús com a vehicles d'administració tòpica.

La utilització de liposomes convencionals per al tractament de problemes dèrmics ofereix l'avantatge de possibilitar la difusió controlada de compostos, ja que les característiques d'aquestes vesícules les fan apropiades com a vehicle de transport de compostos (Mezei i Gulasekharam, 1980; Nounou i cols, 2008; Pierre i dos Santos Miranda Costa, 2011). A més, donada la similitud entre la membrana d'aquestes vesícules i l'estructura lipídica laminar de l'EC, es pot suposar que els liposomes poden facilitar la penetració intercel·lular dels compostos que estan encapsulats en ells. Hi ha controvèrsia a l'hora d'afirmar si els liposomes poden penetrar com a vesícules intactes en l'EC i si són capaços d'arribar a les capes més profundes de l'epidermis com molècules lipídiques independents. Alguns autors han trobat evidències de la penetració dels liposomes intactes en capes profundes de la pell (Kirjavainen i cols, 1996; Mezei i Gulasekharam, 1980). Mentre d'altres

estudis han demostrat que els liposomes no penetren més enllà de l'EC (Korting i cols, 1995; Lasch i cols, 1992). La interacció i/o penetració dels liposomes amb l'EC ha estat explicat també mitjançant diferents tipus de mecanismes tals com l'adsorció, els canvis de fase de les vesícules, l'adhesió, la fusió, l'intercanvi lipídic, etc. (Kirjavainen i cols, 1999; López i cols, 2001). El que sembla comú en aquests estudis és que els lípids que formen els liposomes tendeixen a quedar-se retinguts en l'EC.

En els últims 15 anys, altres tipus de vesícules lipídiques s'han anat desenvolupant per a solucionar alguns dels inconvenients dels liposomes convencionals. Entre aquests estan els *transfersomes*, que són liposomes altament deformables (El Maghraby i cols, 1999; Qiu i cols, 2008; Trotta i cols, 2004). Aquests inclouen en la seva composició tensioactius, que com es sabut alteren la funció barrera de l'EC. Un altre tipus són els *ethosomes*, que inclouen etanol en la seva composició (Ainbinder i Touitou, 2005; Paolino i cols, 2005). L'etanol és un dissolvent que altera la composició lipídica de l'EC, al tenir un efecte extractor dels seus lípids.

Un altre dels sistemes lipídics emprats en els tractaments tòpics són els sistemes de micel·les mixtes lípid-tensioactiu. Aquestes micel·les són capaces de transformar-se en liposomes al retirar-se el tensioactiu mitjançant diàlisi o simplement per dilució amb aigua. Aquesta propietat fa que aquests sistemes es presentin com una estratègia molt prometedora en dos aspectes: protecció i reparació de les estructures lipídiques de la pell i vehiculització de substàncies a través de l'EC i l'epidermis (López i cols, 2002). L'estratègia de l'ús de micel·les mixtes formades per tensioactius i lípids es basa en que al tenir una mida molt més petita que els liposomes, les micel·les tenen la capacitat de passar a través dels espais intercel·lulars de l'EC i allà es transformen en liposomes per dilució degut al major contingut d'aigua en les capes més profundes de la pell. El desavantatge d'aquests sistemes està relacionat amb la presència de tensioactius en la seva composició. Aquestes molècules tenen un conegut efecte irritant sobre la pell (López i cols, 2001) podent solubilitzar la barrera lipídica, entre altres efectes.

Per les seves característiques de composició lipídica i de versatilitat de dimensions, els sistemes bicel·lars han estat estudiats pel nostre grup en aplicacions tòpiques. Aquestes investigacions van començar per intentar minimitzar els desavantatges dels liposomes i les micel·les en aplicacions tòpiques. D'aquests estudis s'ha conclòs que els sistemes bicel·lars poden funcionar com a agents permeabilitzants de la pell o com agents de reforç de les estructures lipídiques presents en els dominis intercel·lulars de les capes més externes de la pell (Barbosa-Barros i cols, 2008b; Barbosa-Barros i cols, 2008c; Rodríguez i cols, 2010).

En aquesta tesi es proposen per primera vegada els sistemes bicel·lars com a vehicles per l'aplicació tòpica de principis actius.

1.6-Absorció percutània

1.6.1- Vies d'absorció percutània

La pell constitueix una barrera molt selectiva al pas de substàncies externes. El principal responsable d'aquest control, com ja s'ha comentat anteriorment, és l'EC (Barry, 1983; Walters i Roberts, 2002). El pas de les molècules a través de la pell depèn de la naturalesa de la substància, del coeficient de repartiment vehicle-pell i del coeficient de difusió de les substàncies que penetren (Hadgraft, 2004).

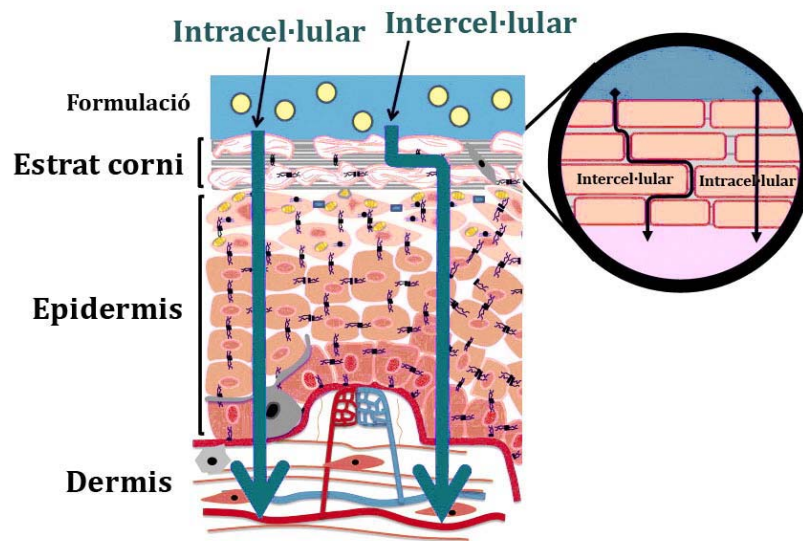
El principal obstacle que es troba el principi actiu per a penetrar a través de la pell són les característiques de barrera de l'EC, les quals estan originades per la geometria de l'estructura interna dels corneòcits i per la resistència a la difusió de l'estructura lipídica extracel·lular (Hadgraft, 2001).

L'absorció percutània implica el pas d'un fàrmac a través de la pell fins als capil·lars que irriguen la dermis, després del seu alliberament del sistema que l'inclou. Ja en la circulació sistèmica, es distribueix per tot l'organisme fins assolir el seu lloc d'acció. El pas de substàncies a través de la pell es pot fer mitjançant diverses vies que es resumeixen a continuació: la via transepidèrmica (a través de la pell) i la via transapendicular (a través dels apèndixs cutanis).

-Via transepidèrmica (Figura 20): Aquesta és la via principal d'absorció ja que la seva àrea superficial és mil vegades més gran que la de la via transapendicular. Les molècules polars i no polars difonen a través de l'EC per diferents mecanismes. Existeixen dues microvies fonamentals per a l'absorció percutània a través de l'EC: la intracel·lular i la intercel·lular.

- *Intracel·lular*: Les substàncies, ja siguin polars o no polars, difonen a través de l'EC per mecanismes moleculars diferents. L'EC s'hidrata, s'acumula l'aigua prop de la superfície dels filaments de les proteïnes, i és a través d'aquesta aigua immobilitzada per on les molècules polars poden passar a través de la pell. Les molècules no polars, per contra, probablement, es dissolen i difonen a través de la matriu lipídica intracel·lular, no aquosa, que existeix entre els filaments de les proteïnes.

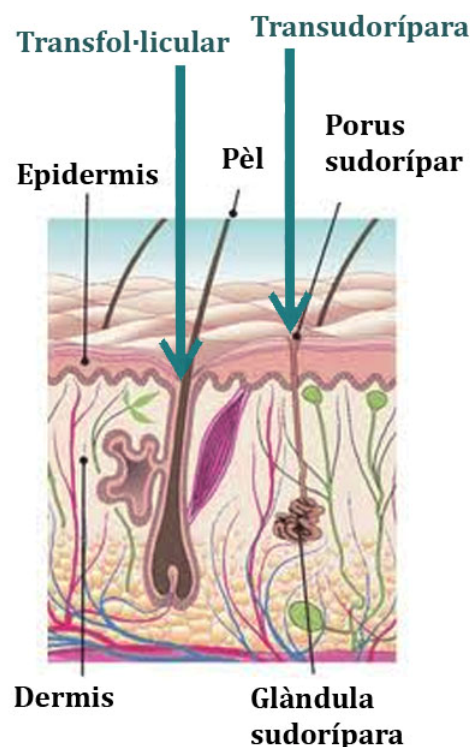
- *Intercel·lular*: Es pensa que aquesta via, encara que és la major barrera que es troben els fàrmacs en el seu pas a través de la pell, és la ruta de penetració que trien la majoria dels fàrmacs lipòfils per accedir a capes més profundes de l'epidermis (Hadgraft, 2001). És una ruta tortuosa i la difusió del principi actiu es fa pels canals lipídics que hi ha entre les cèl·lules de l'EC.

FIGURA 20: Esquema de les vies d'absorció transepidèrmica

-Via transapendicular (Figura 21): Si el fàrmac utilitza aquesta via d'accés ho fa a través dels apèndixs cutanis: glàndules sudorípares i fol·licles pilosos, evitant haver de travessar la funció barrera de l'EC. Ambdues alternatives, tenen una contribució escassa a la cinètica global de la penetració transdèrmica, encara que en casos específics pot ser molt útil.

- *Transfol·licular*: La penetració de les substàncies químiques a través d'aquesta via està lligada a la presència d'un major o menor nombre de fol·licles pilosos a la pell. Cada fol·licle pilós porta associat una glàndula sebàcia, que secreta seù, i és una barrera de protecció de l'estrat basal germinatiu. Certs principis actius bastant lipòfils, al dissoldre's en el seù, són capaços de superar aquesta barrera, veient-se afavorida la seva absorció percutània a través d'aquesta ruta. Per aquesta via s'absorbeixen substàncies que tenen un alt coeficient de repartiment (lípid / aigua), solubles en el greix. En certes circumstàncies també és possible que difonguin molècules que es poden acumular en els fol·licles pilosos.

- *Transudorípara*: És la via menys important ja que proporciona una petita ruta d'absorció. Es creu que la difusió per aquesta via segueix el model de "difusió per porus". Mitjançant els porus sudorípars poden accedir a la dermis substàncies de caràcter polar, hidròfiles de baix pes molecular i que siguin solubles en la suor, així poden arribar a la base de la glàndula sudorípara, que al no estar queratinitzada, no ofereix cap resistència a ser travessada i es produirà l'absorció del compost.

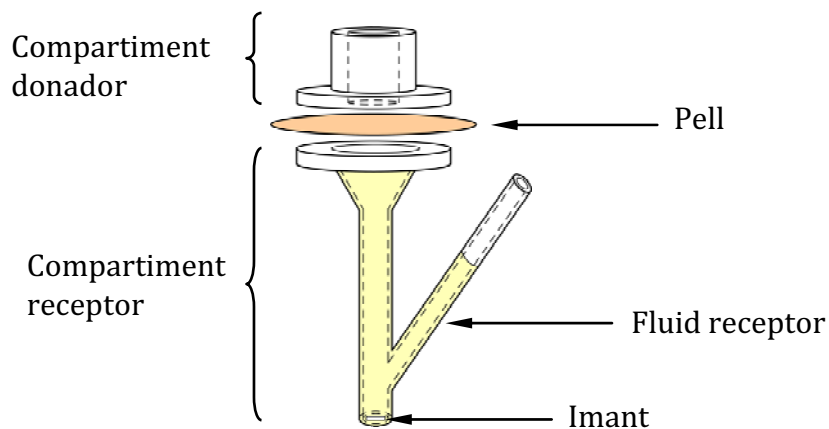
FIGURA 21: Esquema de les vies d'absorció transapendicular

Els fol·licles pilosos i les glàndules sudorípares (endocrines i apocrines) representen un camí potencial per superar la barrera epidèrmica; la seva capacitat per a l'absorció percutània és mínima, menys del 0,1%, però malgrat tot, incrementen la superfície d'absorció de la pell. Tant la ruta transfol·licular com la transsudorípara poden ser les més importants per a l'absorció d'ions i per a les molècules de gran polaritat, que tenen una permeabilitat baixa a través de l'EC.

1.6.2-Metodologia de l'absorció percutània *in vitro*

Els estudis d'absorció percutània *in vitro* són una bona manera d'identificar en quina mesura un determinat principi actiu penetra a la pell. Aquests estudis *in vitro* amb membranes de pell d'animal o humana són una eina elegant per obtenir dades sobre el pas de substàncies a través de la pell, així com per a conèixer la seva distribució a través dels diferents compartiments cutanis (Elias i Feingold, 2006; OECD, 2004; Schaefer i Redermeier, 1996).

El mètode estàndard per a l'estudi de l'absorció percutània *in vitro* d'una substància és mitjançant les cel·les de difusió. Hi ha diversos tipus de cel·les de difusió des de les cel·les de difusió estàtiques de dos compartiments fins a les cel·les de flux continu. En aquesta tesi s'han utilitzat cel·les de difusió estàtiques de dos compartiments tipus "Franz", amb un compartiment receptor de 3ml de volum i una àrea d'exposició a la pell de 1,86 cm². En la Figura 22 es pot veure una representació esquemàtica d'una cèl·lula de difusió tipus "Franz".

FIGURA 22: Esquema d'una cèl·lula de difusió tipus "Franz".

En aquests tipus d'experiments la membrana més adequada és la pell humana. No obstant això, degut a la dificultat de la seva obtenció, la pell de porc és la membrana habitualment usada. Aquesta presenta propietats histològiques, bioquímiques, i fins i tot, una permeabilitat similars a la de la pell humana. És per aquest motiu que la pell de porc és apreciada com a model experimental de permeació (Simon i Maibach, 2000) i ha estat la usada en els experiments d'absorció percutània *in vitro* en els articles 1, 3, 4, 5 i 6 que han originat aquesta tesi.

La pell porcina utilitzada en els assajos d'absorció percutània es va obtenir de porcs femella utilitzats en investigacions clíniques. D'aquesta pell s'obtenen uns discs que es guarden al buit i congelats a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, fins a la seva utilització. Només s'han utilitzat en els experiments els discs de pell intacta (és a dir, sense tall, cicatrius, taques ni ferides). La integritat de la funció barrera de les biòpsies de pell s'ha controlat mitjançant la mesura del TEWL una vegada col·locades sobre les cel·les de difusió.

Els experiments de l'absorció percutània de les formulacions investigades s'han realitzat durant 24h d'exposició en tots els casos i després s'ha extret el principi actiu estudiat de les diferents capes de la pell per al seu posterior anàlisi per HPLC juntament amb l'excés superficial i el fluid receptor per a obtenir un balanç de massa.

1.7-Tècniques de caracterització de la pell

La investigació dels possibles canvis morfològics i estructurals de l'EC que poden tenir lloc com a conseqüència de l'aplicació tòpica dels principis actius

vehiculitzats en sistemes bicel·lars i altres formulacions ha requerit l'ús de diferents tècniques específiques per a la caracterització de la pell.

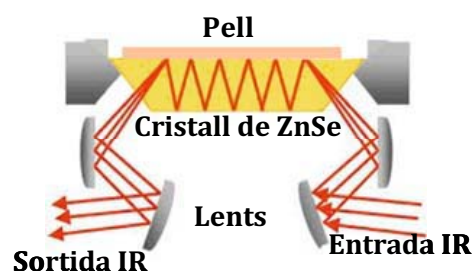
1.7.1- Espectroscòpia infraroja per transformada de Fourier per reflectància total atenuada (ATR-FTIR)

L'espectroscòpia infraroja per transformada de Fourier ("*Fourier transform infrared*", FTIR) es basa en la interacció de la radiació infraroja amb la mostra. La zona de radiació infraroja abasta radiacions de freqüències compreses entre 400 i 12.500 cm^{-1} . La radiació més emprada en la pràctica és la corresponent a l'infraroig mitjà, entre 4000 i 400 cm^{-1} que és la de major interès en l'anàlisi de compostos orgànics, com és el cas dels lípids de l'EC. Aquesta tècnica aporta informació relacionada amb les vibracions característiques de conjunts d'àtoms ja que la freqüència de la radiació infraroja és del mateix rang que la freqüència de les vibracions moleculars. La freqüència de vibració depèn de la naturalesa química dels àtoms implicats en la vibració i del tipus de vibració.

La quantitat de radiació absorbida es mesura com el percentatge de transmissió o d'absorbància. Tenint en compte que cada molècula o grup funcional té una o diverses absorcions característiques a longituds d'ona determinades, a partir de l'espectre podem identificar els grups funcionals de cada mostra.

Dins de l'espectroscòpia IR és possible també obtenir espectres per reflexió. Es poden distingir dues formes generals d'adquirir l'espectre: reflectància difusa i reflectància total atenuada. En el nostre cas hem utilitzat la reflectància total atenuada ("*attenuated total reflection*", ATR) (Figura 23), la qual es pot descriure de la següent manera: quan la radiació IR incideix sobre un vidre pla d'alt índex de refracció és totalment reflectada. Si el vidre es posa en contacte amb un material com la pell que absorbeix la radiació, aquesta penetra a la mostra i la intensitat de la radiació reflectada pel vidre disminueix per a aquelles longituds d'ona en què la mostra absorbeix energia. L'atenuació dona lloc també a un espectre d'absorció.

FIGURA 23. Esquema d'un ATR de reflexions múltiples



Aquesta tècnica és útil per investigar l'EC sense haver d'aïllar-lo de les altres capes de la pell. Aquest fet és degut a que la profunditat de penetració de la radiació a la pell és d'aproximadament 1 μm (López i cols, 2000). En la literatura es poden trobar estudis de l'EC de pell de porc *in vitro* mitjançant aquesta tècnica (Boncheva i cols, 2008; Rodríguez i cols, 2010; Rodríguez i cols, 2009) per tal de treure informació de les freqüències de vibració característiques dels lípids relacionades amb les diferents fases d'ordenament de l'EC (Taula 2).

Taula 2. Freqüències d'ATR-FTIR característiques de les cadenes alquíliques dels lípids i el seu significat.

Mode vibracional	Rang de freqüències (cm^{-1})	Sensibilitat
<i>CH₂ symmetric stretching</i>	2847-2855	Les freqüències monitoritzen qualitativament l'ordenament conformacional de les cadenes alquíliques i el seu empaquetament lateral
	2849	Empaquetament ortoròmbic
	2850	Empaquetament hexagonal
	2852	Conformació de cristall-líquid
<i>CH₂ asymmetric stretching</i>	2915-2924	Aquest mode és menys sensible als canvis conformacionals
<i>CH₂ scissoring</i>	1462, 1473	El desdoblament revela la presència d'empaquetament ortoròmbic
	1468	Normalment denota empaquetament hexagonal
<i>CH₂ rocking</i>	719, 730	El desdoblament revela la presència d'empaquetament ortoròmbic
	720	Empaquetament hexagonal

Les freqüències vibracionals d'"*stretching*" i "*scissoring*" del metilè de les cadenes alquíliques dels lípids de l'EC s'han estudiat en l'article 3. Aquestes

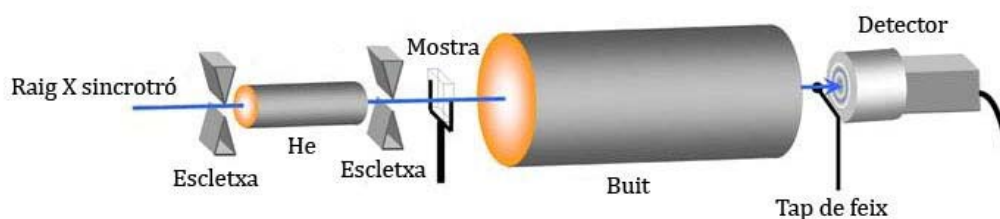
freqüències han permès investigar l'efecte de diferents sistemes que contenen àcid flufenàmic en l'organització conformacional i lateral de la matriu lipídica intercel·lular de l'EC. Les freqüències vibracionals de "*stretching*" s'utilitzen per determinar si els lípids estan en una conformació ordenada (empaquetament lateral ortoròmbic o hexagonal) o en una conformació desordenada (fase líquida). Els experiments s'han dut a terme a diferents temperatures. L'equip utilitzat en aquesta investigació ha estat un espectròmetre 360-FTIR Nicolet Avatar (Nicolet Instruments, Inc, Madison, WI) equipat amb un accessori d'ATR.

1.7.2-SAXS sincrotró

SAXS amb radiació sincrotró és una eina excel·lent per estudiar l'organització estructural del col·lagen a la pell i l'organització lipídica laminar de l'EC (Cócera i cols, 2011).

La radiació sincrotró es produïda aplicant una acceleració centrípeta a un feix d'electrons relativistes, és a dir, sotmetent-los a un moviment circular amb velocitat constant. La radiació sincrotró té un rang espectral molt ampli. Cobreix continuadament el rang que va de l'infraroig als raigs X més energètics, sent el rang que compren l'ultraviolat llunyà i els raigs X el de major interès. Una de les propietats úniques de la llum sincrotró és la seva alta intensitat, més concretament, la seva densitat d'intensitat, o brillantor. Aquesta alta densitat d'energia permet realitzar experiments en temps molt curts, amb una extraordinària relació senyal/soroll i amb una alta resolució en energia. El considerable augment de la relació senyal/soroll permet resoldre estructures que abans quedaven ocultes per la seva baixa intensitat com és el cas de l'organització estructural del col·lagen a la pell i l'organització lipídica laminar de l'EC, que han estat objectes d'estudi en l'article 3 d'aquesta tesi. En la Figura 24 es pot veure un esquema representatiu de la configuració de l'aparell utilitzat en l'estudi de SAXS per radiació sincrotró.

FIGURA 24. Esquema representatiu de la configuració de l'aparell utilitzat en l'estudi de SAXS per radiació sincrotró.



El fonament del SAXS ja s'ha explicat en l'apartat 1.3.4 d'aquesta introducció.

Totes les mesures de SAXS per radiació sincrotró es van realitzar a temperatura ambient en la línia de llum espanyola (BM16) de la Instal·lació Europea de Radiació Sincrotró (*European Synchrotron Radiation Facility*, ESRF, Grenoble, França) sota l'assistència tècnica del Dr. François Fauth i de la Dra. Ana Labrador.

1.7.3-Criosubstitució aplicada a la microscòpia electrònica de transmissió (FSTEM).

Aquesta tècnica inclou un procés de fixació química, un de post fixació química, un procés de criofixació seguit d'un de criosubstitució i la posterior inclusió del teixit en una resina. Aquests processos són necessaris per a la correcta visualització de la ultraestructura de la pell i els lípids extracel·lulars de l'EC. Les etapes experimentals seguides per a la preparació de les mostres han sigut les següents:

- Procés de fixació química: es fa servir el glutaraldehyd el qual fixa les proteïnes de la pell.

- Post fixació: s'introdueix tetròxid de ruteni per tal de que els lípids de l'EC quedin contrastats i es puguin veure al microscopi electrònic.

- Criofixació en nitrogen líquid (-196 °C) usant un Cryovacublock (Leica, Viena).

- Criosubstitució: es fa en un sistema automatitzat de substitució ("*Automatic Freeze Substitution*", AFS) (Figura 25). Aquest procés consisteix en l'intercanvi (substitució) de l'aigua del medi per un solvent orgànic. En aquest cas el solvent orgànic emprat va ser el metanol i també es va incloure tetròxid d'osmi (entre altres compostos) per tal de que els lípids de les altres estructures de la pell com els desmosomes es poguessin observar per TEM. Les mostres de teixit es criosubstitueixen a -90 °C durant 48 h.

- Inclusió: el teixit s'inclou en una resina, en aquest cas Lowicryl HM20 (100%), durant 24h.

- Polimerització de la resina: les mostres es van transferir a un motlle contenint Lowicryl, i es van incubar durant 48 hores a -50 °C sota radiació UVA, per permetre la polimerització.

Els talls ultrafins per a la seva visualització al microscopi electrònic van ser preparats en un ultramicrotom (Ultracut UCT, Leica, Viena, Àustria).

Després de la preparació de les mostres, aquestes es van visualitzar en un TEM Hitachi 600.

FIGURA 25. Fotografia de l'aparell utilitzat per a la criosubstitució.

Amb aquesta tècnica es van poder visualitzar els possibles canvis causats a l'estructura de l'EC pel tractament de la pell amb FFA vehiculitzat en sistemes bicel·lars. Les micrografies obtingudes apareixen en l'article 3 de l'apartat de resultats.

Les preparacions dels teixits i la posterior visualització de les mostres per microscòpia electrònica s'han realitzat en la unitat de Crio-Microscòpia Electrònica dels Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona (CCiT-UB), sota l'assistència tècnica de la Dra. Carmen López.

2. OBJECTIUS

2. OBJECTIUS

El principal objectiu de la investigació realitzada en el marc d'aquesta tesi ha consistit en conèixer les possibilitats reals de l'ús dels sistemes bicel·lars en la vehiculització de principis actius aplicats tòpicament.

Per a això, s'han dissenyat un seguit d'estudis amb la finalitat d'aconseguir els següents objectius específics:

- Caracteritzar l'estructura dels sistemes bicel·lars, la seva versatilitat d'acoblament, així com la seva capacitat d'incorporació de principis actius. Per a aconseguir això, s'ha plantejat l'ús de tècniques instrumentals d'ampli espectre. Aquestes tècniques permeten conèixer el seu tamany de partícula, les propietats termotròpiques, les interaccions lipídiques i els canvis que ocasiona en l'organització de les bicel·les la incorporació de principis actius.
- Demostrar la idoneïtat dels sistemes bicel·lars per a vehiculitzar principis actius a través de les diferents capes de la pell quan són aplicats tòpicament. Per aconseguir aquest objectiu s'ha plantejat:
 - La realització d'estudis d'absorció percutània *in vitro* que permetran establir criteris definits sobre l'interès dels sistemes bicel·lars com una nova estratègia d'alliberament de principis actius sobre la pell.
 - L'estudi, per tècniques espectroscòpiques i de microscòpia, de les interaccions d'aquests sistemes bicel·lars amb els lípids de l'EC.
- Dissenyar un model *in vitro* per a simular el comportament d'una pell patològica amb la seva funció barrera deteriorada, amb la finalitat de conèixer l'efecte dels sistemes bicel·lars sobre aquest tipus de pell.

Aquests objectius s'han intentat aconseguir mitjançant la realització d'una sèrie d'investigacions publicades en articles científics que s'inclouen en la secció de Resultats.

En l'Article 1 es va estudiar la caracterització físico-química dels sistemes bicel·lars i la seva capacitat de vehiculització del DDEA per a la seva aplicació tòpica, així com l'ús dels sistemes bicel·lars sense fàrmac com a potenciadors de l'absorció percutània d'una solució aquosa de DDEA. A continuació en els Articles 2 i 3 es va

investigar la inclusió d'un altre fàrmac, el FFA, en els sistemes bicel·lars. Per a això els estudis es van centrar en la caracterització físico-química dels sistemes bicel·lars de FFA i la seva aplicació tòpica, juntament amb l'estudi de l'efecte d'aquests sistemes bicel·lars ens els lípids de l'EC. Posteriorment en l'Article 4 es va fer un estudi comparatiu de la capacitat retardant dels sistemes bicel·lars en l'absorció percutània del DDEA i del FFA. En l'Article 5 es va plantejar un model *in vitro* de pell patològica amb la finalitat de realitzar estudis d'absorció percutània en condicions més realistes. Finalment, en l'Article 6 es va investigar la possibilitat de que els sistemes bicel·lars que contenen DDEA puguin tenir efectes beneficiosos per a reparar la funció barrera disminuïda d'una pell patològica. Tanmateix s'avalua el benefici de l'acció retardant d'aquests sistemes per a reduir la toxicitat a nivell sistèmic. A continuació, s'inclouen els esmentats articles íntegres amb un breu resum en català.

3. RESULTATS

3. RESULTATS

Els resultats que han donat lloc a aquesta tesi es reflecteixen en els sis articles científics que es mostren a continuació. Quatre d'ells ja han estat publicats i la resta estan en procés de revisió. Aquests articles es presenten acompanyats d'un breu resum en català.

Els articles són els següents:

Article 1. Bicellar systems for in vitro percutaneous absorption of diclofenac.

L. Rubio, C. Alonso, G. Rodríguez, L. Barbosa-Barros, L. Coderch, A. De la Maza, J.L. Parra i O. López. (2010) *Int. J. Pharm.*, 2010, 386, 108-113.

Article 2. Structural effects of flufenamic acid in DPPC/DHPC bicellar systems.

L. Rubio, G. Rodríguez, C. Alonso, C. López-Iglesias, M. Cócera, L. Coderch, A. De la Maza, J. L. Parra i O. López. *Soft Matter*, 2011, 7, 8488-8497.

Article 3. Bicellar systems as new delivery strategy for topical application of flufenamic acid.

L. Rubio, C. Alonso, G. Rodríguez, M. Cócera, C. López-Iglesias, L. Coderch, A. De la Maza, J. L. Parra i O. López. *J. Phys. Chem. B*- en revisió.

Article 4. Bicellar systems as a new colloidal delivery strategy for skin.

L. Rubio, G. Rodríguez, L. Barbosa-Barros, C. Alonso, M. Cócera, A. de la Maza, J.L. Parra i López. *Colloid Sur.f B- Biointerfaces*, 2012, 92, 322– 326.

Article 5. Barrier function of intact and impaired skin: Percutaneous penetration of caffeine and salicylic acid.

L. Rubio, C. Alonso, O. López, G. Rodríguez, L. Coderch, J. Notario. A. de la Maza and J. L. Parra. *Int J Dermatol*, 2011, 50, 881–889.

Article 6. Bicellar systems as vehicle for treatment of impaired skin.

L. Rubio, C. Alonso, G. Rodríguez, M. Cócera, L. Coderch, J. Notario. A. de la Maza, J. L. Parra i O. López. *J. Control. Release* - en revisió.

Article 1

Bicellar systems for *in vitro* percutaneous absorption of diclofenac

Int. J. Pharm., 2010, 386, 108-113

En aquesta publicació s'avalua l'efecte de diferents sistemes bicel·lars sobre l'absorció percutània del DDEA utilitzant dos enfocaments diferents. En el primer cas, el fàrmac es va incloure en els sistemes bicel·lars formats per DMPC/DHPC i DPPC/DHPC, i a continuació es van aplicar en pell porcina *in vitro*. En el segon cas, la pell es va tractar amb els sistemes bicel·lars sense fàrmac abans de l'aplicació d'una solució aquosa de DDEA.

Prèviament, la caracterització dels sistemes bicel·lars per DLS va mostrar que la grandària de partícula disminueix quan el DDEA és encapsulat, tant en els sistemes DMPC/DHPC com en els de DPPC/DHPC. També, les micrografies obtingudes per Cryo-TEM van demostrar aquest efecte en el cas dels sistemes de DPPC/DHPC.

Els estudis d'absorció percutània van constatar una menor penetració del DDEA quan el fàrmac es va incloure en bicel·les de DMPC i DPPC que quan es va aplicar en una solució aquosa. Aquest efecte és degut possiblement a una certa rigidesa dels sistemes bicel·lars causada per la incorporació del DDEA. L'absorció percutània de DDEA a la pell prèviament tractada amb els sistemes bicel·lars sense fàrmac va augmentar en comparació amb l'absorció de DDEA sobre la pell sense tractar. Les bicel·les sense DDEA, podrien causar certa desorganització de la funció barrera de l'EC, el que facilitaria la penetració percutània del DDEA aplicat posteriorment.

Així, depenent dels seus paràmetres fisicoquímics i de les condicions d'aplicació, els sistemes bicel·lars poden tenir efectes potenciadors o retardants de l'absorció percutània. Aquests dos efectes poden ser estratègies interessants per ser utilitzades en futures aplicacions tòpiques d'administració de fàrmacs.



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Pharmaceutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpharmBicellar systems for *in vitro* percutaneous absorption of diclofenac

L. Rubio*, C. Alonso, G. Rodríguez, L. Barbosa-Barros, L. Coderch, A. De la Maza, J.L. Parra, O. López

I.Q.A.C.-C.S.I.C., C/Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 July 2009

Received in revised form 4 November 2009

Accepted 6 November 2009

Available online 14 November 2009

Keywords:

Bicellar systems

Diclofenac

In vitro percutaneous absorption

Vehicle

Drug delivery system

ABSTRACT

This work evaluates the effect of different bicellar systems on the percutaneous absorption of diclofenac diethylamine (DDEA) using two different approaches. In the first case, the drug was included in bicellar systems, which were applied on the skin and, in the second case, the skin was treated by applying bicellar systems without drug before to the application of a DDEA aqueous solution. The characterization of bicellar systems showed that the particle size decreased when DDEA was encapsulated. Percutaneous absorption studies demonstrated a lower penetration of DDEA when the drug was included in bicellar systems than when the drug was applied in an aqueous solution. This effect was possibly due to a certain rigidity of the bicellar systems caused by the incorporation of DDEA. The absorption of DDEA on skin pretreated with bicelles increased compared to the absorption of DDEA on intact skin. Bicelles without DDEA could cause certain disorganization of the SC barrier function, thereby facilitating the percutaneous penetration of DDEA subsequently applied. Thus, depending on their physicochemical parameters and on the application conditions, these systems have potential enhancement or retardant effects on percutaneous absorption that result in an interesting strategy, which may be used in future drug delivery applications.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Over the past few decades, there has been wide interest in exploring new techniques to modulate drug absorption through the skin (Barry, 2001; Williams, 2003; Honeywell-Nguyen and Bouwstra, 2005). The first lipid vesicles studied for skin delivery were liposomes (Mezei and Gulasekharan, 1980). Over the past 15 years, a new class of lipid vesicles has been developed, the highly deformable liposomes, termed transfersomes (El Maghraby et al., 2001, 1999; Qiu et al., 2008; Trotta et al., 2002, 2004). Other lipid carriers recently developed are ethosomes (Ainbinder and Touitou, 2005; Paolino et al., 2005; Touitou et al., 2000), solid lipid nanoparticles (Fang et al., 2008; Puglia et al., 2008) and micelle-based surfactants (Spernath et al., 2008). These studies on skin delivery point to the need to obtain vehicles of appropriate sizes, high stability and biocompatibility. Bicelles are bilayered aggregates with a discoidal shape composed of long- and short-chain phospholipids. Long-chain lipids commonly used are dimyristoyl and dipalmitoyl phosphatidylcholine (DMPC and DPPC) and the short-chain lipid most frequently used is dihexanoyl phosphatidylcholine (DHPC) (Visscher et al., 2006). The long-chain phospholipids of bicelles form a bilayer section that is surrounded by a rim of short-chain phospholipids (DHPC) (Vold and Prosser, 1996). These systems have the propensity to align in magnetic fields; in fact, their use

is mainly based on this property (Whiles et al., 2002). Thus, bicelles are used to orient membrane proteins that can be inserted in the bilayer structure and also to study the superficial interactions between proteins and the phospholipids bilayer. Considering the structure, composition and nanodimensions of these systems, their use as delivery systems for topical applications may be interesting. The use of bicellar systems for skin purposes has been explored and the results obtained indicate that depending on their composition, these systems are able to work in two ways: as permeabilizing agents of the skin or as reinforcing agents of the lipid structures present in the intercellular domains of the outermost layers of the skin (Barbosa-Barros et al., 2008a,b).

In vitro percutaneous absorption studies are a good way to identify how far a given drug penetrates into the skin. These *in vitro* studies with animal or human skin membranes are an elegant tool for obtaining data on the passage of test substances through the skin as well as on its distribution over the different cutaneous compartments (Elias and Feingold, 2006; OECD, 2004; Schaefer and Redermeier, 1996). Also, these studies permit the evaluation of the effectiveness of some vehicles and enhancers (Gwak and Chun, 2002).

Diclofenac is a potent non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) with analgesic effects. Diclofenac may cause side effects, such as gastrointestinal disorders when it is administered by the oral route and cutaneous lesions if it is administered by an intramuscular injection (Galer et al., 2000). Thus, the identification of strategies to reduce toxicity and to increase the pharmacological effect of the NSAID may be highly relevant.

* Corresponding author. Tel.: +34 400 61 00x2328; fax: +34 93 204 59 04.
E-mail address: laia.rubio@iqac.csic.es (L. Rubio).

This work seeks to analyze the influence of different vehicles based on bicellar systems on the percutaneous absorption of diclofenac diethylamine (DDEA). To this end, some physico-chemical aspects of the nanostructures were investigated. Also, the effective location of the drug in the skin compartments, as a function of the different bicellar systems used, was evaluated. Our results show that these new systems should be considered as appropriate vehicles for topical applications.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

DDEA was supplied by Novartis (Basel, Switzerland). Dimyristoyl phosphatidylcholine (DMPC), dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) and dihexanoyl phosphatidylcholine (DHPC) were supplied by Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA). Methanol (HPLC Grade), sodium dihydrogen phosphate monohydrate and orthophosphoric acid 85% were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Purified water was obtained by an ultra-pure water system, Milli-Q plus 185 (Millipore, Bedford, USA).

2.2. Preparation of bicellar systems

Bicellar systems were formed with DMPC or DPPC as long-chain phospholipids and DHPC as a short-chain phospholipid. In Fig. 1 a general schema of the formation of bicellar systems, with and without DDEA, is shown.

For the preparation of the bicellar systems, an appropriate amount of DMPC or DPPC was weighed and mixed with a DHPC chloroform solution to get DMPC/DHPC or DPPC/DHPC in the molar ratio 2:1. This molar ratio was chosen to ensure the small size of the bicelles, which is more appropriate for skin purposes. The chloroform was eliminated by rotaevaporating the solvent until a lipid film was obtained. Then, this lipid film was hydrated to reach 20% (w/v) of total lipid concentration and sonicated until a transparent solution was obtained. To obtain bicellar systems containing diclofenac, the procedure was the same, but the lipid film was

hydrated with an aqueous solution of DDEA 1.16% (w/v) (see Fig. 2). This concentration was chosen as normally this drug is topically administered in the form of a 1.16% gel.

2.3. Characterization of the bicellar systems

2.3.1. Dynamic light scattering technique

The hydrodynamic (HD) diameter of the bicellar systems was measured using the Zetasizer nano ZS90 (Malvern Instruments, UK). This apparatus employs the dynamic light scattering (DLS) technique to determine particle sizes between 1 nm and 3 μm . DLS measures the Brownian motion of the particles and correlates this to particle size (Probstein, 1994).

2.3.2. Cryo-transmission electron microscopy

Bicellar systems of DPPC/DHPC with and without DDEA were visualized by Cryo-transmission electron microscopy (Cryo-TEM). Vitrified specimens were prepared using a Vitrobot (FEI Company, Eindhoven, Netherlands). 5–10 μL of sample was placed onto a glow-discharged holey carbon grid. After, the grid was blotted with filter paper, leaving thin sample films spanning the grid holes. The blotted samples were vitrified by plunging the grid into liquid ethane at its freezing point (-196°C) and stored under liquid nitrogen (LN_2) prior to examination in the microscope (Honeywell-Nguyen et al., 2002). The vitreous sample films were transferred to a microscope Tecnai F20 (FEI Company, Eindhoven, Netherlands) using a Gatan cryotransfert (Barcelona, Spain) cooled with LN_2 to temperature between -170 and -175°C . The visualization was taken at 200 kV and using low-dose imaging conditions.

2.4. HPLC analysis of diclofenac

The quantitative determination of DDEA was performed by HPLC using a Hitachi LaChrom Elite equipment (Darmstadt, Germany). The apparatus consists of an L-2130 pump, L-2200 autosampler and an L-2400 UV detector. The system was operated from the software Merck EZChrom Elite v3.1.3. Then 20 μL of injection volume were eluted in a Lichocart 250-4/Lichrosorb RP-18 (5 μm)

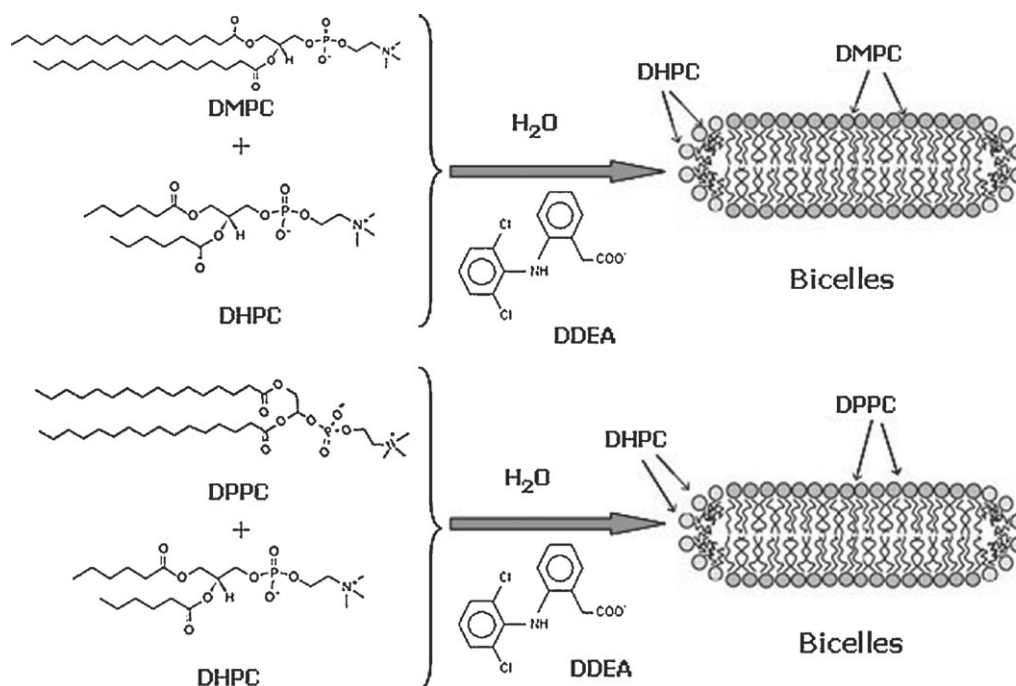


Fig. 1. Schema of the bicellar systems formation.

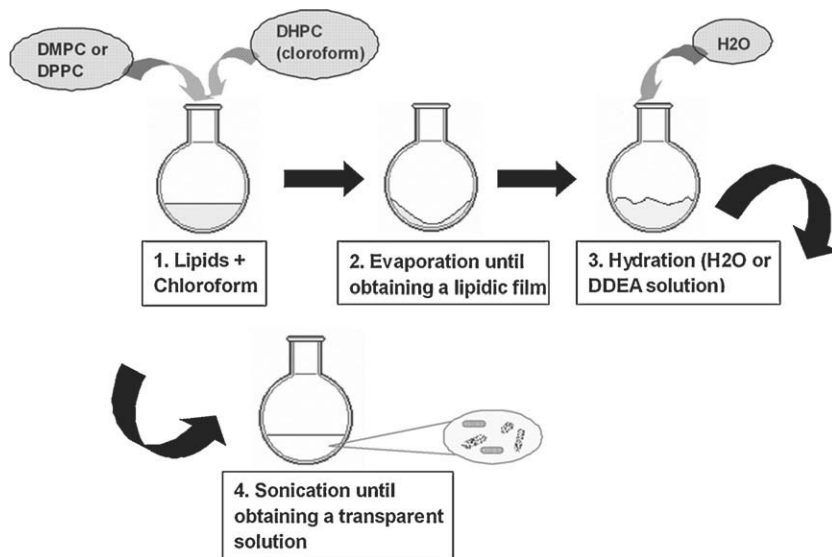


Fig. 2. Preparation of bicellar systems.

column (Merck, Germany) at room temperature. DDEA was monitored by UV detection at 254 nm. A mobile phase consisting of a 66% methanol and 34% phosphate buffer (pH 2.5) was used at a flow rate of 1 mL/min. The area under the peak was used to calculate the concentration of DDEA using external standards that showed linearity over the concentration range of 0.33–83 $\mu\text{g/mL}$. The intraday and interday variations of the method were less than 2%.

2.5. *In vitro* percutaneous absorption studies

For this study pig skin from the unboiled back of Landrace large white pigs weighing between 30 and 40 kg was used. The pig skin was provided by the Clinic Hospital of Barcelona, Spain. The bristles were removed carefully with an animal clipper and then the skin was washed with tap water. The excised skin was dermatomed to $500 \pm 50 \mu\text{m}$ thickness (Dermatome GA630, Aesculap, Tuttlingen, Germany). Discs of the dermatomed skin were obtained with an iron punch (2.5 cm inner diameter) and fitted into Franz type diffusion cells. The skin discs were stored at -20°C until use. One hour prior to the diffusion experiments, the skin was thawed at room temperature.

Franz cells (Lara-Spiral, Courtenon, France) consisted of an upper donor compartment and a receptor chamber (3 mL of volume). These two parts were separated by the skin biopsy, leaving an exposed surface area of 1.86 cm^2 . A magnetic stirring bar was introduced into the receptor chamber. The skin disc was mounted with the SC side up in the Franz cell. The receptor chamber was filled with a receptor fluid (RF) which was PBS (pH 7.4) in distilled water, containing 1% of bovine serum albumin and 0.04% gentamicin sulphate, this was stirred continuously.

Franz cells were kept at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ by means of a circulating water bath (Julabo Labortechnik GmbH, Germany) to ensure that the surface skin was maintained at $32 \pm 1^\circ\text{C}$. The integrity of each skin sample was checked by determining the transepidermal water loss (TEWL) using a Tewameter TM210 (Courage-Khazaka, Köln, Germany). The diffusion experiment was initiated by applying to the entire surface, delimited by the upper cell, 10 μL of each of the following solutions: aqueous solution of DDEA, DMPC/DHPC bicelles with DDEA or DPPC/DHPC bicelles with DDEA. A control cell was also used (only with the application of 10 μL of water). After the exposure time (24 h), the test formulation remaining on the skin surface was removed with a specific wash: first with 0.5 mL of sodium lauryl ether sulphate solution (at 0.5%, w/v) and then

twice ($2 \times 0.5 \text{ mL}$) with distilled water. After that, the skin surface was dried with a cotton swab. Water aliquots, all tips of the micropipette, all cotton swabs as well as the top of the cell were pooled, constituting the fraction of the active compound remaining in the surface. Then, the receptor fluid was removed from the receptor compartment and brought up to 5 mL in a volumetric flask. The SC of the treated skin area was removed by 8 successive tape-strippings using adhesive tape (D-Squame[®], CuDerm Inc., Dallas, USA). After that, the viable epidermis was separated from the dermis after heating the skin at 80°C for a few seconds.

The amount of DDEA in the different layers and in the washing solution was extracted with a solution of methanol: water (50:50) for 20 h. Then, samples were shaken for 30 min at room temperature and sonicated for 15 min. Before the analytical determination by HPLC, the samples were filtered through a $0.45 \mu\text{m}$ Acrodisc filter (Pall Gelman Sciences, Northampton, UK).

2.6. Pretreatment of the skin with DMPC/DHPC and DPPC/DHPC bicelles

To evaluate the effect of the pretreatment of skin with bicelles in the subsequent percutaneous absorption of DDEA, 10 μL of bicelles (without diclofenac) were topically applied for 1 h and after that a careful aqueous washing of the skin surface was carried out. This process was repeated four times. Then, an *in vitro* percutaneous absorption test of an aqueous solution of DDEA (1.16%, w/v) was performed as described in Section 2.5.

2.7. Statistical analysis

Each value is expressed as the mean \pm S.D. for six determinations. For group comparisons, analysis of variance (ANOVA) with a one-way layout was applied. The software used was the STATGRAPHICS plus 5. Significant differences in the mean values were evaluated by the Student's unpaired *t*-test. A *p* value of less than 0.05 was considered significant.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of bicellar systems

The characterization of the bicellar systems have been carried out by two different techniques: DLS and Cryo-TEM.

Table 1

Particle size of the bicellar systems investigated, measured with Zetasizer nano ZS90 at 37 °C.

	Diameter (nm) ^a	%Vol
DMPC/DHPC	14.0 ± 0.2	99.8
DPPC/DHPC	15.2 ± 0.3	99.9
DMPC/DHPC/DDEA	2.4 ± 0.1	99.8
DPPC/DHPC/DDEA	2.8 ± 0.1	100

^a Mean ± S.D.

The results obtained on the particle size of the bicellar systems investigated by DLS are indicated in Table 1. It is appreciated that similar size values were detected for both bicellar systems not including DDEA, with diameters in the range of 14–15 nm. Almost 100% of particles analyzed by volume were in this size range. The incorporation of DDEA in the bicellar systems led to a drastic decrease in the particle size for both systems (2.4 and 2.8 nm). These particle sizes are in the range of the formation of bicellar systems. It is known that the minimal size of vesicles is 20 nm. (Cornell et al., 1982). The size decrease by effect of DDEA can be understood considering that surface-active drugs, as non-steroidal anti-inflammatory compounds, are reported to self-associate and bind membranes causing partial disruption and solubilization. Several authors have described this behavior for diclofenac and other drugs (Lopes et al., 2004; Kriwet and Müller-Goymann, 1994; Lopes et al., 2006; Rades and Müller-Goymann, 1997; Schreier et al., 2000; Schutze and Muller-Goymann, 1998).

DDEA could have a similar effect as DHPC in the discoidal structure of the bicellar systems, showing a tendency to locate at the edges of the lamellar structure. This fact would induce a decrease in the molar ratio between molecules in the bilayer and in the edges, and, hence, the size would decrease, as indeed occurred in our experiments. Everything seems to indicate that the discoidal morphology of the bicelles is reduced by the effect of DDEA taking on a spherical structure similar to that described for mixed micelles (Schutze and Muller-Goymann, 1998).

The mechanism of DDEA incorporation in the bicelles is probably similar to that published by Lopes et al (Lopes et al., 2004) when this active principle was encapsulated in soya phosphatidylcholine (PC) liposomes. The amphiphilic nature of diclofenac would permit its incorporation into the lipid bilayer (Lopes et al., 2004). This incorporation would be possible given the hydrophobicity of the diclophenil ring of the drug, which would be oriented toward the hydrophobic core of the bilayers.

Fig. 3 shows Cryo-TEM micrographs of DPPC/DHPC bicellar systems with (Fig. 3a) and without (Fig. 3b) DDEA. In Fig. 3a little structures with sizes smaller than 5 nm are observed in agreement with data reported by DLS experiments (Table 1). In the case of the bicellar systems of DPPC/DHPC without DDEA (Fig. 3b), the micrograph shows discoidal bicelles in edge-on (white arrow) and face-on dispositions (black arrow). Micrographs of DMPC/DHPC bicellar systems showed very similar structures (data not shown)

3.2. Bicelles as a drug delivery system

Systems formed by DMPC/DHPC or DPPC/DHPC were able to incorporate 1.16% DDEA in a similar way to other colloidal drug carrier systems such as liposome, microemulsions, mixed micelles, etc. (Boinpally et al., 2003; Kriwet and Müller-Goymann, 1996; Kweon et al., 2004; Lopes et al., 2004; Parsaee et al., 2002; Kriwet and Müller-Goymann, 1994; Lopes et al., 2006; Rades and Müller-Goymann, 1997; Schreier et al., 2000; Schutze and Muller-Goymann, 1998). The bicellar systems with DDEA showed a transparent appearance without phase separation and/or precipitates. These systems remained stable for at least 1 week and

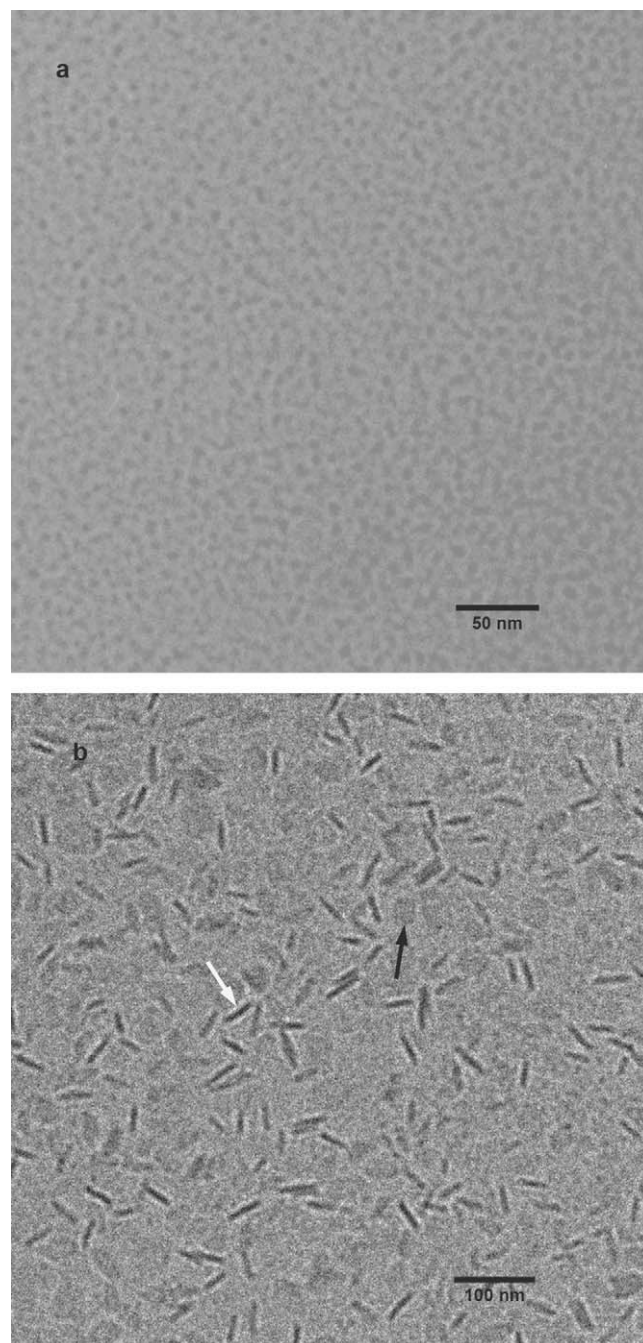


Fig. 3. Cryo-TEM micrographs of DPPC/DHPC bicellar systems with (a) and without (b) DDEA.

exhibited a gel aspect, which facilitated its application on the skin compared to the application of an aqueous solution of DDEA (much more fluid).

The percutaneous absorption profiles of diclofenac vehiculated in the mentioned bicelles compared with DDEA in an aqueous solution (1.16%, w/v) is shown in Fig. 4. The results are expressed as a percentage of the applied dose on the skin. As it can be shown, most DDEA remained in the skin surface. However, it is interesting to note that among all the skin layers, a higher percentage of DDEA was detected in the SC. This behavior is noted especially when the drug was applied in an aqueous solution. The inclusion of DDEA, in both types of bicelles, decreases the percutaneous absorption of the drug compared to that of an aqueous solution of diclofenac.

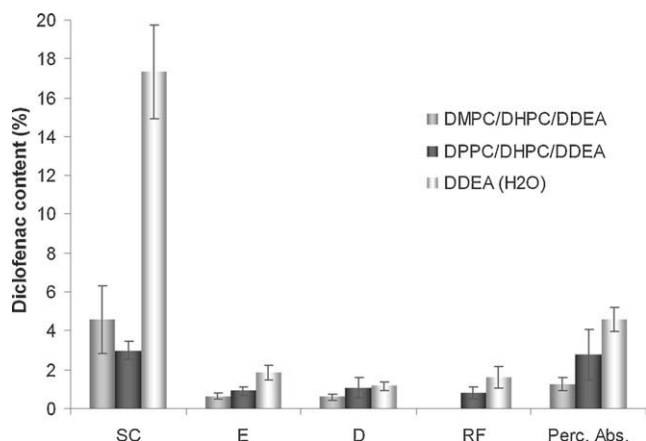


Fig. 4. Percutaneous absorption profiles of all the diclofenac formulations studied (mean values \pm SD, $n=6$). Distribution in the different layers of the skin: stratum corneum (SC), epidermis (E), dermis (D), receptor fluid (RF) and total percutaneous absorption (Perc. Abs.).

This finding suggests a retarder effect of the percutaneous absorption when the drug is included in bicellar systems. This effect would be interesting to be applied in drugs which have a too fast percutaneous absorption, as it is the case of fentanyl, to prevent an overdose of the drug (Frölich et al., 2001).

It is obvious that the use of both kinds of bicellar systems prevents the passage of the drug to the deeper layers of the skin. This inhibitory effect on skin penetration was more marked for DMPC/DHPC bicelles. For these bicelles, Fig. 4 shows a higher value of DDEA in SC and an absence of drug in the receptor fluid. The results as global percentage of percutaneous absorption (considering the amount of DDEA detected in epidermis (E), dermis (D) plus receptor fluid (RF)) show the following ranking: aqueous solution DDEA ($4.61 \pm 0.62\%$) > DPPC/DHPC bicelles with DDEA ($2.78 \pm 1.62\%$) > DMPC/DHPC bicelles with DDEA ($1.25 \pm 0.33\%$). The significant difference ($p < 0.05$) of skin penetration detected between DPPC and DMPC bicelles could be due to the different transition temperature (T_m) of these two phospholipids. The DPPC at the experimental temperature is in a gel phase, like lipids of the SC (T_m about 60°C) (Golden et al., 1987); this fact could facilitate the mix between lipids from the SC and from the bicelles promoting skin penetration, with respect to the DMPC bicelles. On the other hand, DMPC at the experimental temperature exhibits a liquid crystalline phase (T_m of DMPC 23°C) (Lewis et al., 1987). Therefore, the DMPC has a different phase than the lipids from the SC and, as a consequence, the skin penetration could be more difficult.

Due to the small particle size of the lipid systems formed after the encapsulation of DDEA, one might expect that these systems could penetrate more easily through the skin. But there are different factors that are involved in the enhancer effect of a vehicle. Some of these factors are the possible disruption of the organization of the intercellular lipids of the SC, the affinity of the drug to the vehicle and the rigidity of the lipid structure of the vehicle (Gwak and Chun, 2002; Thong et al., 2007). The incorporation of DDEA in a bicellar system may cause a certain rigidity in the bicelles. In fact, the drug is not simply dissolved in the lipophilic region of the phospholipids, but is incorporated in the bilayer lined up with the phospholipids and the diclofenac's carboxyl groups increase the rigidity of the head groups of the phospholipids (Ferreira et al., 2005; Seddon et al., 2009). This possible rigidity would hinder the penetration of DDEA through the skin (Kriwet and Müller-Goymann, 1996; Kriwet and Müller-Goymann, 1994). Also, another possible reason for this low penetration could be related to the difficulty of the DDEA to diffuse out of the bicellar systems.

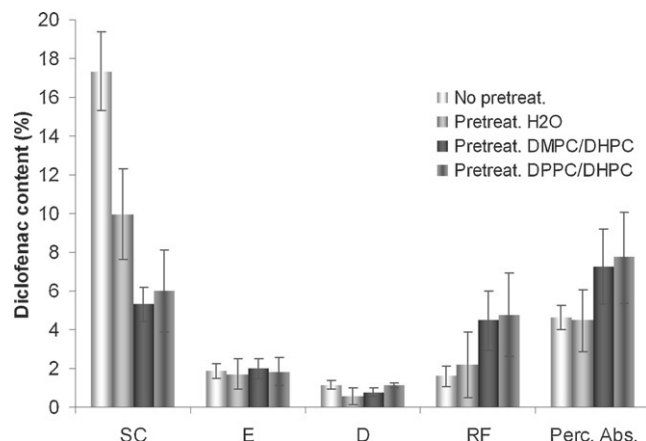


Fig. 5. Percutaneous absorption profiles of diclofenac with skin pretreated with bicellar systems or water (blank) (mean values \pm SD, $n=6$). Distribution in the different layers of the skin: stratum corneum (SC), epidermis (E), dermis (D), receptor fluid (RF) and total percutaneous absorption (Perc. Abs.).

3.3. Bicelles as enhancers of skin penetration

Although the bicelles with DDEA inhibit the drug penetration, *in vivo* studies of Barbosa-Barros et al. (2008c) showed an increase of TEWL after a consecutive application of phospholipids bicelles. The effect of bicelles on the barrier function and their possible enhancer effect on the *in vitro* percutaneous absorption of DDEA were investigated. To this end, we performed a pretreatment of the skin discs with bicellar systems of DMPC/DHPC and DPPC/DHPC followed by a topical application of a DDEA aqueous solution. Also, to discard the possible influence of the water contained in the bicellar systems, some skin discs were pretreated with water (blank).

Fig. 5 shows the percutaneous absorption of DDEA using skin pretreated with bicelles, expressed in percentage of applied dose and using the experimental conditions described earlier.

In general terms, the amount of DDEA detected in the SC was higher in skin not pretreated with bicelles than in pretreated samples. In addition, the global results obtained on skin penetration show that a pretreatment of the skin with bicelles promotes the percutaneous absorption of diclofenac. There were no significant differences ($p < 0.05$) in the percentage of percutaneous absorption between the treatment with DMPC/DHPC or DPPC/DHPC bicelles. These results have been obtained despite the fact that microscopy studies have shown that each of these systems change, in different ways, the microstructure of the SC. DMPC/DHPC bicelles did not affect SC lipid microstructure (Barbosa-Barros et al., 2008a) and DPPC/DHPC systems seem to penetrate inside the skin SC and grow forming vesicles (Barbosa-Barros et al., 2008c). In future works it would be interesting to study the eventual histological changes detected not only in the SC but also in whole structure of skin treated with bicelles.

The enhancer effect of the bicellar systems on the percutaneous absorption of diclofenac could be due to an initial interaction of bicelles with the SC. This interaction could cause some disorganization of intercellular lipids, responsible of the SC barrier function. This fact would help the absorption of diclofenac through the skin. The interaction of the specific phospholipids of bicelles with the lipids of the SC would be the mechanism responsible for the event detected. This mechanism is different for both systems because the DMPC/DHPC bicellar systems, apparently, did not produce modifications in the microstructure of the SC, whereas the DPPC/DHPC system did produce changes in the lipid lamellae regions (Barbosa-Barros et al., 2008a,c). Thus, our results seems to indicate that other factors, in addition to the microstructural changes of the SC, must be involved in the penetration of DDEA, since the two types of bicelles

produce a similar effect. In this case, the DDEA is applied in an aqueous solution. For this reason, the limiting rate of drug transport through the SC may not be due to drug release from the vehicle, but could probably be related more to inherent SC resistance.

4. Conclusions

This work demonstrates that bicellar systems are able to incorporate DDEA. This incorporation decreases the particle size with respect to the original bicelles. These bicellar systems, including DDEA, can act as retarders in the percutaneous absorption of the drug; probably, the limiting of the rate of drug transport is dependent on rate of the drug release from the vehicle. The results of our work may be useful to develop bicellar systems for drugs which have a too fast percutaneous absorption as it is the case of fentanyl (Frölich et al., 2001). On the contrary, the previous *in vitro* application of bicelles on skin discs seems to promote the passage of diclofenac through the lipidic interstices of the SC and, as a result, to improve the percutaneous absorption. In this case, there are no problems of drug release since DDEA is in an aqueous solution. As a consequence, a previous application of bicellar systems on the skin seems to be useful to modulate the percutaneous absorption of topically applied DDEA. Further investigations on the use of bicelles as delivery systems, using other drugs with different physicochemical properties and applications, should be considered in future research.

Acknowledgments

The authors acknowledge Ministerio de Educación y Ciencia, Spain. This work was supported by European Social Fund (Programa Nacional de Potenciación de Recursos Humanos del Plan Nacional de I+D+I (2004–2008)).

References

- Ainbinder, D., Touitou, E., 2005. Testosterone ethosomes for enhanced transdermal delivery. *Drug Deliv.* 12, 297–303.
- Barbosa-Barros, L., de la Maza, A., Estelrich, J., Linares, A.M., Feliz, M., Walther, P., Pons, R., Lopez, O., 2008a. Penetration and growth of DPPC/DHPC bicelles inside the stratum corneum of the skin. *Langmuir* 24, 5700–5706.
- Barbosa-Barros, L., De la Maza, A., Walther, P., Estelrich, J., Lopez, O., 2008b. Morphological effects of ceramide on DMPC/DHPC bicelles. *J. Microsc.* 230, 16–26.
- Barbosa-Barros, L., Barba, C., Cocera, M., Coderch, L., Lopez-Iglesias, C., de la Maza, A., Lopez, O., 2008c. Effect of bicellar systems on skin properties. *Int. J. Pharm.* 352, 263–272.
- Barry, B.W., 2001. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.* 14, 101–114.
- Boinpally, R.R., Zhou, S.L., Poondru, S., Devraj, G., Jasti, B.R., 2003. Lecithin vesicles for topical delivery of diclofenac. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 56, 389–392.
- Cornell, B.A., Fletcher, G.C., Middlehurst, J., Separovic, F., 1982. The lower limit to the size of small sonicated phospholipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 690, 15–19.
- El Maghraby, G.M., Williams, A.C., Barry, B.W., 2001. Skin delivery of 5-fluorouracil from ultra-deformable and standard liposomes *in-vitro*. *J. Pharm. Pharmacol.* 53, 1069–1077.
- El Maghraby, G.M., Williams, A.C., Barry, B.W., 1999. Skin delivery of oestradiol from deformable and traditional liposomes: mechanistic studies. *J. Pharm. Pharmacol.* 51, 1123–1134.
- Elias, P.M., Feingold, K.R., 2006. *Skin Barrier*. Taylor and Francis group, New York.
- Fang, J.Y., Fang, C.L., Liu, C.H., Su, Y.H., 2008. Lipid nanoparticles as vehicles for topical psoralen delivery: solid lipid nanoparticles (SLN) versus nanostructured lipid carriers (NLC). *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 70, 633–640.
- Ferreira, H., Lucio, M., Lima, J.L.F.C., Matos, C., Reis, S., 2005. Effects of diclofenac on EPC liposome membrane properties. *Anal. Bioanal. Chem.* 382, 1256–1264.
- Frölich, M., Giannotti, A., Modell, J.H., 2001. Opioid overdose in a patient using a fentanyl patch during treatment with a warming blanket. *Anesth. Analg.* 93, 647–648.
- Galer, B.S., Rowbotham, M., Perander, J., Devers, A., Friedman, E., 2000. Topical diclofenac patch relieves minor sports injury pain: results of a multicenter controlled clinical trial. *J. Pain Symptom Manage.* 19, 287–294.
- Golden, G.M., Guzek, D.B., Kennedy, A.H., McKie, J.E., Potts, R.O., 1987. Stratum corneum lipid phase transitions and water barrier properties. *Biochemistry* 26, 2382–2388.
- Gwak, H.S., Chun, I.K., 2002. Effect of vehicles and penetration enhancers on the *in vitro* percutaneous absorption of tenoxicam through hairless mouse skin. *Int. J. Pharm.* 236, 57–64.
- Honeywell-Nguyen, P.L., Frederik, P.M., Bomans, P.H., Junginger, H.E., Bouwstra, J.A., 2002. Transdermal delivery of pergolide from surfactant-based elastic and rigid vesicles: characterization and *in vitro* transport studies. *Pharm. Res.* 19, 991–997.
- Honeywell-Nguyen, P.L., Bouwstra, J.A., 2005. Vesicles as a tool for transdermal and dermal delivery. *Drug Discov. Today: Technol.* 2, 67–74.
- Kriwet, K., Müller-Goymann, C.C., 1994. Mutual interactions between diclofenac diethylamine and phospholipids—investigation on the microstructure of the arisen systems. *Pharmazie* 49, 187–191.
- Kriwet, K., Müller-Goymann, C.C., 1996. Diclofenac release from phospholipid drug systems and permeation through excised human stratum corneum. *Int. J. Pharm.* 125, 231–242.
- Kweon, J.H., Chi, S.C., Park, E.S., 2004. Transdermal delivery of diclofenac using microemulsions. *Arch. Pharm. Res.* 27, 351–356.
- Lewis, R.N., Mak, N., McElhaney, R.N., 1987. A differential scanning calorimetric study of the thermotropic phase behavior of model membranes composed of phosphatidylcholines containing linear saturated fatty acyl chains. *Biochemistry* 26, 6118–6126.
- Lopes, L.B., Scarpa, M.V., Silva, G.V., Rodrigues, D.C., Santilli, C.V., Oliveira, A.G., 2004. Studies on the encapsulation of diclofenac in small unilamellar liposomes of soya phosphatidylcholine. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 39, 151–158.
- Lopes, L.B., Scarpa, M.V., Pereira, N.L., Oliveira, L.C., Oliveira, A.G., 2006. Interaction of sodium diclofenac with freeze-dried soya phosphatidylcholine and unilamellar liposomes. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 42, 497–504.
- Mezei, M., Gulasekharan, V., 1980. Liposomes—a selective drug delivery system for the topical route of administration. Lotion dosage form. *Life Sci.* 26, 1473–1477.
- OECD, 2004. Guideline 428: skin absorption: *in vitro* method. In: Development, O.f.E.C.a. (Ed.), *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*. Paris, p. 8.
- Paolino, D., Lucania, G., Mardente, D., Alhaique, F., Fresta, M., 2005. Ethosomes for skin delivery of ammonium glycyrrhizinate: *in vitro* percutaneous permeation through human skin and *in vivo* anti-inflammatory activity on human volunteers. *J. Control. Release* 106, 99–110.
- Parsaee, S., Sarbolouki, M.N., Parnianpour, M., 2002. *In-vitro* release of diclofenac diethylammonium from lipid-based formulations. *Int. J. Pharm.* 241, 185–190.
- Probstein, R.F., 1994. *Physicochemical Hydrodynamics*. John Wiley & Sons, New York.
- Puglia, C., Blasi, P., Rizza, L., Schoubben, A., Bonina, F., Rossi, C., Ricci, M., 2008. Lipid nanoparticles for prolonged topical delivery: an *in vitro* and *in vivo* investigation. *Int. J. Pharm.* 357, 295–304.
- Qiu, Y., Gao, Y., Hu, K., Li, F., 2008. Enhancement of skin permeation of docetaxel: a novel approach combining microneedle and elastic liposomes. *J. Control. Release* 129, 144–150.
- Rades, T., Müller-Goymann, C.C., 1997. Investigations on the micellisation behaviour of fenopropfen sodium. *Int. J. Pharm.* 159, 215–222.
- Schaefer, H., Redermeier, T.E., 1996. *Skin Barrier—Principles of Percutaneous Absorption*. Karger-Verlag, Basel.
- Schreier, S., Malheiros, S.V., de Paula, E., 2000. Surface active drugs: self-association and interaction with membranes and surfactants. *Physicochemical and biological aspects*. *Biochim. Biophys. Acta* 1508, 210–234.
- Schutze, W., Müller-Goymann, C.C., 1998. Phase transformation of a liposomal dispersion into a micellar solution induced by drug-loading. *Pharm. Res.* 15, 538–543.
- Seddon, A.M., Casey, D., Law, R.V., Gee, A., Templer, R.H., Ces, O., 2009. Drug interactions with lipid membranes. *Chem. Soc. Rev.* 38, 2509–2519.
- Spernath, A., Aserin, A., Sintov, A.C., Garti, N., 2008. Phosphatidylcholine embedded micellar systems: enhanced permeability through rat skin. *J. Colloid Interface Sci.* 318, 421–429.
- Thong, H.Y., Zhai, H., Maibach, H.I., 2007. Percutaneous penetration enhancers: an overview. *Skin Pharmacol. Physiol.* 20, 272–282.
- Touitou, E., Dayan, N., Bergelson, L., Godin, B., Eliaz, M., 2000. Ethosomes—novel vesicular carriers for enhanced delivery: characterization and skin penetration properties. *J. Control. Release* 65, 403–418.
- Trotta, M., Peira, E., Carlotto, M.E., Gallarate, M., 2004. Deformable liposomes for dermal administration of methotrexate. *Int. J. Pharm.* 270, 119–125.
- Trotta, M., Peira, E., Debernardi, F., Gallarate, M., 2002. Elastic liposomes for skin delivery of dipotassium glycyrrhizinate. *Int. J. Pharm.* 241, 319–327.
- Visscher, I., Stuart, M.C., Engberts, J.B., 2006. The influence of phenyl and phenoxy modification in the hydrophobic tails of di-n-alkyl phosphate amphiphiles on aggregate morphology. *Org. Biomol. Chem.* 4, 707–712.
- Vold, R.R., Prosser, R.S., 1996. Magnetically oriented phospholipid bilayered micelles for structural studies of polypeptides. Does the ideal bicelle exist? *J. Magn. Res. Ser. B* 113, 267–271.
- Whiles, J.A., Deems, R., Vold, R.R., Dennis, E.A., 2002. Bicelles in structure-function studies of membrane-associated proteins. *Bioorg. Chem.* 30, 431–442.
- Williams, A.C., 2003. *Transdermal and Topical Drug Delivery: From Theory to Clinical Practice*. Pharmaceutical Press, London.

Article 2

Structural effects of flufenamic acid in DPPC/DHPC bicellar systems

Soft Matter, 2011, 7, 8488-8497

En aquest treball es va investigar l'efecte de la inclusió del FFA en els sistemes bicel·lars de DPPC/DHPC. Per a aquest propòsit, es va utilitzar una combinació de diferents tècniques. La tècnica de DLS es va utilitzar per a mesurar la diferència en la mida de la partícula dels sistemes bicel·lars amb i sense fàrmac. La tècnica microscòpica de FFEM va permetre observar les diferents estructures lipídiques que es van formar quan el FFA va ser inclòs en els sistemes bicel·lars de DPPC/DHPC. Addicionalment, amb la microscòpia de Cryo-TEM es van poder observar les estructures lipídiques petites dels sistemes bicel·lars amb i sense FFA. El SAXS va reportar informació sobre la diferència en el gruix de les bicapes dels sistemes bicel·lars incloent o no el FFA. Per altra banda, el WAXS va proporcionar informació sobre la diferència d'empaquetament lateral de les bicapes lipídiques quan el fàrmac estava inclòs o no. La tècnica calorimètrica DSC va permetre conèixer les diferents transicions de fase que el FFA va induir sobre la DPPC al ser inclòs en els sistemes bicel·lars.

La incorporació del FFA va provocar canvis en la grandària, la morfologia, el comportament termotròpic i l'autoacoblament dels sistemes bicel·lars inicials. A les tres temperatures estudiades, es van formar diferents estructures com a conseqüència de la incorporació del fàrmac en els bicel·les. En l'estudi dels sistemes bicel·lars sense FFA, a les tres temperatures estudiades es va veure la formació de bicel·les discoïdals per FFEM i Cryo-TEM d'una grandària mesurada per DLS d'uns 9 nm aproximadament. Els resultats de SAXS i WAXS van informar que l'amplada de la bicapa era d'uns 58 Å i l'empaquetament lateral era ortoròmbic en les tres temperatures. Quan el fàrmac es va incloure en les bicel·les, es van observar a 25 °C la formació de grans estructures multilaminars per FFEM i grans estructures discoïdals per Cryo-TEM. Els resultats de SAXS i WAXS van permetre deduir l'apilament de bicapes i l'empaquetament lateral hexagonal, respectivament. A 32,5 °C, es va observar la disminució de la grandària dels sistemes lipídics i l'aparició d'estructures ondulades. També es va detectar una petita disminució de l'amplada de la bicapa i de l'empaquetament lateral hexagonal. A 37 °C es van apreciar petites estructures tubulars, discoïdals i esfèriques, una amplada de bicapa similar als sistemes sense fàrmac i un empaquetament lateral híbrid entre hexagonal i cristall-líquid. Els estudis de DSC van detectar la formació de noves fases.

Usant aquestes tècniques experimentals, s'han caracteritzat els sistemes bicel·lars que contenen FFA, que poden ser molt prometedors com a nous vehicles per a l'aplicació tòpica de principis actius.

Cite this: *Soft Matter*, 2011, **7**, 8488

www.rsc.org/softmatter

PAPER

Structural effects of flufenamic acid in DPPC/DHPC bicellar systems

L. Rubio,^{*a} G. Rodríguez,^a C. Alonso,^a C. López-Iglesias,^b M. Cócera,^a L. Coderch,^a A. De la Maza,^a J. L. Parra^a and O. López^a

Received 18th April 2011, Accepted 16th June 2011

DOI: 10.1039/c1sm05692a

The effect of the anti-inflammatory flufenamic acid (FFA) in dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC)/dihexanoylphosphatidylcholine (DHPC) bicellar systems has been investigated. For this purpose, a combination of different techniques was used, including dynamic light scattering (DLS), freeze-fracture electron microscopy (FFEM), cryo-transmission electron microscopy (Cryo-TEM), X-ray scattering and differential scanning calorimetry (DSC). The incorporation of FFA induced changes in the size, morphology, thermotropic behaviour and self-assembly of the initial bicellar systems. At the three temperatures studied, different structures were formed as a consequence of the incorporation of the drug in the bicelles. At 25 °C, the formation of large multilamellar sheets was observed, and at 32.5 °C, the vesicle size decreased, and undulated structures and discoidal bicelles appeared. At 37 °C, tubular, discoidal and spherical small structures were detected. Using this experimental approach, we have attempted to characterise these bicellar systems containing FFA, which may be very promising as new vehicles for the topical application of active principles.

1. Introduction

Bicellar systems are bilayered aggregates composed of long-alkyl-chain and short-alkyl-chain phospholipids. Depending on the temperature and composition, bicellar systems can form different nanostructures.^{1–3} One of these structures is discoidal bicelles, in which the long-chain phospholipids self-assemble into a planar bilayer, while the short-chain phospholipids segregate to the edge regions of high curvature.^{4,5} These systems have been widely employed as model membranes in biophysical studies on the conformation and dynamics of membrane-associating molecules.^{6,7}

Bicelles have a morphology that is an intermediate between the classic lipid–surfactant mixed micelles and lipid vesicles, combining some of the remarkable properties of both of these systems. Bicelles, much like micelles, are optically transparent, non-compartmentalised and effectively mono-dispersed. However, as an improvement, bicelles do not have surfactants in their structure and maintain some bilayer properties that are absent in the conventional spherical micellar systems.⁸ Liposomes and micelles have often been used as drug delivery systems.^{9,10} However, their topical application has been extensively debated due to the large size of liposomes that hinder their penetration through the skin and the use of surfactants in

micelles that promote skin irritation. Bicellar systems seem to offer advantages over liposomes and micelles due to their small dimensions, avoidance of the use of surfactants and their bilayered structure.^{11,12} For all these reasons, in very recent studies, we have used bicellar aggregates for drug delivery purposes.¹³ Additionally, the ability of these nanostructures to function as permeabilising agents of the skin or as reinforcing agents of the lipid structures present in the intercellular domains of the outermost layers of the skin^{11,14,15} has been reported. Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC)/dihexanoyl phosphatidylcholine (DHPC) offers some improvements over common systems formed by dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) and DHPC. One of these improvements is based on the DPPC, the major phospholipids of biological membranes; therefore, DPPC increases the biological character of these new bicelles. Another improvement is based on the different thermotropic behaviour of DMPC and DPPC. The main transition temperature (T_m) is 24.1 and 41.5 °C for DMPC¹⁶ and DPPC,¹⁷ respectively. At the experimental temperature (37 °C), DPPC exists in a gel phase like the stratum corneum lipids (T_m about 60 °C),¹⁸ maintaining the native state of the stratum corneum.

Flufenamic acid (FFA) is a non-steroidal anti-inflammatory drug of the anthranilic acid group with potent anti-inflammatory and analgesic effects.¹⁹ Different products containing FFA are available on the market and are administered either *via* the oral or dermal route. Because the dermal route normally reduces gastrointestinal side effects such as ulceration and hemorrhages,²⁰ it has been recognised as a useful alternative to the oral delivery of drugs. The inclusion of other anti-inflammatory drugs in DPPC/DHPC systems has been previously reported by our

^aDepartment of Chemical and Surfactants Technology (IQAC-CSIC), C/Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain. E-mail: laia.rubio@iqac.csic.es; Fax: +34-93204 59 04; Tel: +34-93400 61 00

^bScientific and Technological Centers-University of Barcelona (CCiT-UB), Barcelona Science Park, C/Baldiri Reixac, 10, 08028 Barcelona, Spain

group,¹³ and the results showed the potential of these systems for drug delivery. Therefore, the inclusion of FFA in bicellar systems proposed in the present work and its topical application could be very advantageous.

However, it is important to find out, through preliminary studies, if some structural changes have been induced due to the incorporation of FFA into the (DPPC/DHPC) bicelles. To do so, these systems were characterised by the combined use of different techniques, including dynamic light scattering (DLS), freeze-fracture electron microscopy (FFEM), cryo-transmission electron microscopy (Cryo-TEM), X-ray scattering and differential scanning calorimetry (DSC). Using these techniques, several structural changes of the bicelles have been detected as a function of temperature (from 25 to 37 °C). A separate application of these techniques in the characterisation of colloidal systems has reported relevant data in this field.^{21–23}

The present work focuses on the study of structural changes induced by the inclusion of FFA in DPPC/DHPC bicellar systems. The evaluation of the structural changes was carried out with the aforementioned techniques. Our work reports innovative data that should be important in designing bicellar systems as vehicles for the topical application of FFA, taking into consideration their physicochemical behaviour at different temperatures.

2. Materials and methods

2.1 Materials

Flufenamic acid (FFA) was purchased from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) and dihexanoyl phosphatidylcholine (DHPC) were supplied by Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA). Chloroform was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Purified water was obtained from an ultra-pure water system, Milli-Q plus 185 (Millipore, Bedford, USA).

2.2 Preparation of bicellar systems

An appropriate amount of DPPC was weighed and mixed with a DHPC chloroform solution to obtain DPPC/DHPC in the molar ratio 2 : 1, with a 20% weight/volume (w/v) total lipid concentration. In the case of FFA bicellar systems, 10 mg of FFA was weighed and mixed with DPPC, DHPC and chloroform. The chloroform from both systems was removed by rota-evaporation, and the lipid film was dissolved in 1 ml of water and sonicated until a transparent solution was obtained. This DPPC/DHPC/FFA solution contained 10 mg of FFA per ml (1% w/v). pH measurements of the DPPC/DHPC/FFA aqueous solution were performed with a Model 720 pH meter and a ROSS Model 8103 SC pH electrode (both from Orion Research, Cambridge, MA, USA).

2.3 Characterisation of the bicellar systems

2.3.1 Dynamic light scattering technique (DLS). DLS is a useful technique to measure the dimensions of the vesicle structures. The hydrodynamic diameter (HD) and polydispersity index (PI) of the aggregates were measured using the Zetasizer nano ZS (Malvern Instruments, UK). This apparatus employs the dynamic light scattering (DLS) technique to determine particle

sizes between 0.6 nm and 6 μm. DLS measures the Brownian motion of the particles and correlates this phenomenon to particle size.²⁴ To minimise multiple scattering, non-invasive back scatter technology (NIBS) was used. With this technology, the detection of scattering is performed at an angle of 173°; therefore, concentrated samples can be measured, as is the case of our systems. The measurements were carried out at three different temperatures (25 °C, 32.5 °C and 37 °C). The results were analysed as the percentage of scattering intensity. The data obtained were collected and analysed with the program DTS (dispersion technology software) provided by Malvern Instruments Ltd.

2.3.2 Microscopy techniques. FFEM and Cryo-TEM were used to visualise the dimensions and morphologies of these systems. Samples of DPPC/DHPC/FFA systems were equilibrated at three different temperatures (25 °C, 32.5 °C and 37 °C) for 30 min to visualise the system at these conditions. These three temperatures were chosen because 25 °C is the ambient temperature, 32.5 °C is approximately the temperature of the skin surface and 37 °C is the physiological temperature. For control purposes, bicelles of DPPC/DHPC were cryofixed at 25 °C. Samples were visualised using the microscopy techniques described below.

2.3.2.1 Freeze-fracture electron microscopy (FFEM). FFEM is a technique that involves cryofixation, replication and transmission electron microscopy. This technique is widely used to characterise lipid bilayer and non-bilayer arrangements²⁵ and monolayer-based structures.²⁶ FFEM avoids artifacts due to composition changes that are inherent in chemical fixation, staining and drying techniques. The procedure carried out in this work for the FFEM study was based on that described by Egelhaaf.²⁷ Freeze-fracture samples were prepared by first depositing approximately 1 μL of sample between two copper platelets using a 400 mesh gold grid as a spacer. Then samples were frozen by plunging into a liquid propane bath cooled at –189 °C by liquid nitrogen and fractured by separating the two copper plates in a BalTec BAF 300 freeze-etching device (Leica, Vienna, Austria) at –150 °C and 10^{–8} mbar of pressure. The replicas were obtained by unidirectional shadowing at 45° with 2 nm of platinum/carbon (Pt/C) and at 90° with 20 nm of carbon. After the replication, the samples were brought to room conditions. An advantage of this preparation design is that large portions of the metal replicas were automatically attached to the TEM grids. The grids and replicas were cleaned by immersion in concentrated sodium hypochlorite to completely remove any organic material from the sample, leaving only the Pt/C replica. The replicas were examined in a Jeol 1010 Transmission electron microscope (Jeol, Tokyo, Japan) at 80 kV.

2.3.2.2 Cryo-transmission electron microscopy (Cryo-TEM). Cryo-TEM is a method whereby the specimen can be examined in its native state by vitrification. This technique has opened the possibility for the direct imaging of amphiphilic aggregates formed in aqueous solutions.²⁸ DPPC/DHPC bicellar systems with and without FFA were visualised by cryo-TEM. Vitrified specimens were prepared using a Vitrobot (FEI Company, Eindhoven, Netherlands). Then 3–5 μL of sample was placed onto a glow-discharged holey carbon grid. The grid was subsequently blotted with filter paper, leaving thin sample films spanning the

grid holes. The blotted samples were vitrified by plunging the grid into liquid ethane at its freezing point and stored under liquid nitrogen (LN₂) prior to examination with the microscope (ref. 29). The vitreous films were transferred to a Tecnai F20 microscope (FEI Company, Eindhoven, Netherlands) using a Gatan cryo transfer (Gatan, Pleasanton, CA, USA) cooled with LN₂ to reach temperatures between -170 °C and -175 °C. The visualisation was taken at 200 kV using low-dose imaging conditions. The images were recorded with a 4096 × 4096 pixel Eagle CCD camera (FEI Company, Eindhoven, Netherlands).

The investigation with cryo-TEM was very extensive. Several grids of each sample were used, and different holes in the perforated carbon film were examined on each grid. From each sample, between twenty and thirty micrographs were saved; however, only a small and representative fraction of these are presented here. It is important to examine different areas of the vitrified specimen to obtain representative micrographs of the bicellar systems.

2.3.3 X-Ray scattering experiments (SAXS, WAXS). X-Ray scattering experiments are of great value for the study of the phase behaviour and organisation of lipids.³⁰ Small-angle X-ray scattering (SAXS) provides information on the larger structural units, giving the repeat distance of the lipid bilayer thickness. Alternatively, wide-angle X-ray scattering (WAXS) reports the lateral packing of the lipids within the bilayers, providing the distance between neighbouring molecules.³¹ SAXS and WAXS measurements were carried out using a SAXS/WAXS S3 MICRO (Hecus GmbH, Graz, Austria). X-Ray radiation with a wavelength corresponding with the Cu K α line (1.542 Å) was used. The linear detector used was a PSD 50 M (Hecus, Graz, Austria), and the temperature control was performed *via* a peltier TCCS-3 (Hecus GmbH, Graz, Austria) (precision better than ± 0.5 °C). The sample was injected into a flow-through glass capillary that was 1 mm in diameter (Hilgenberg GmbH, Malsfeld, Germany).

The scattering intensity *I* (in arbitrary units) was measured as a function of the scattering vector *q* (in reciprocal Å). The latter is defined as:

$$q = (4\pi \sin \theta) / \lambda,$$

where θ is the scattering angle and λ is the wavelength of the radiation (1.542 Å). The position of the scattering peaks is directly related to the repeat distance of the molecular structure, as described by Bragg's law:³³

$$2d \sin \theta = n\lambda$$

in which *n* and *d* are the order of the diffraction peak and the repeat distance, respectively. In the case of a lamellar structure, the various peaks are located at equidistant positions, and:

$$q_n = 2\pi n/d$$

where *q_n* is the scattering vector modulus that indicates the position of the *n*th order of reflection.

2.3.4 Differential scanning calorimetry (DSC). DSC provides a systematic tool for assessing the thermodynamic properties of the systems and allows the inspection of the respective phase

transitions.³² In phosphatidylcholine systems, the more common phase transitions are described as a subtransition corresponding to a change of phase from a lamellar crystalline (L_c) to a tilted gel phase (L_{β'}), a pretransition from a L_{β'} to a ripple phase or an undulated lamellar phase (P_{β'}) and a main transition from any of the previously mentioned phases to the liquid crystalline phase (L_α).^{32,34} The temperature associated with this latter transition is the so-called gel-to-liquid crystalline transition temperature, *T_m*.³⁴

Calorimetric experiments of DPPC/DHPC and DPPC/DHPC/FFA systems were performed with a DSC 821E Mettler Toledo (Greifensee, Switzerland) calorimeter. Aliquots of 30 μL from the DPPC/DHPC and DPPC/DHPC/FFA bicellar systems, corresponding to 4.453 mg and 4.356 mg of DPPC, respectively, were placed in 40 μL aluminium DSC pans and hermetically sealed. Three heating/cooling cycles were performed in a temperature range between 0 and 60 °C at a constant scanning rate of 5 °C min⁻¹. The data from the first scan were always discarded to avoid the mixing of artifacts. Due to the super-cooling phenomenon, only heating scans have been used throughout this work.³⁵ The main transition temperature (*T_m*) was defined as the temperature required to induce a change in the lipid physical state from the ordered gel phase to the disordered liquid crystalline phase. The temperature at the maximum peak corresponding to the thermotropic transitions was defined as the transition temperature. Calorimetric enthalpies were calculated by integrating the peak area, after baseline adjustment and normalisation, to the amount of sample analysed. DSC curves were obtained and analysed by STAR 9.2 Software (Mettler Toledo).

3. Results

DPPC/DHPC bicelles showed a transparent appearance at the three temperatures studied. When FFA was incorporated into DPPC/DHPC systems, the appearance of the sample showed differences depending on the temperature. At 25 °C, the systems exhibited a milky appearance; at 32.5 °C, the sample was fluid and completely transparent; and at 37 °C, it became translucent. No precipitates were formed at any of these temperatures. The techniques used reflect changes in the size, morphology, phase transitions and structure of the DPPC/DHPC bicellar systems in the presence of FFA. These facts confirm the incorporation of FFA in the systems. The pH of the DPPC/DHPC/FFA system was approximately 5.5.

3.1 DLS characterisation

The size distribution curves for the two samples at three different temperatures (25 °C, 32.5 °C and 37 °C) were obtained by DLS (Fig. 1). The measure of the HD was used to determine the particle sizes. Size distribution curves of the systems show various peaks corresponding to particle populations with different sizes that scatter light at different proportions. The peak distribution analysis was used instead of the average particle size to appropriately reflect the complexity of the samples. Fig. 1 shows the size distribution curves obtained by the intensity for both systems at the three temperatures studied (25 °C, 32.5 °C and 37 °C) (Fig. 1A–C, respectively). DLS measurements of the

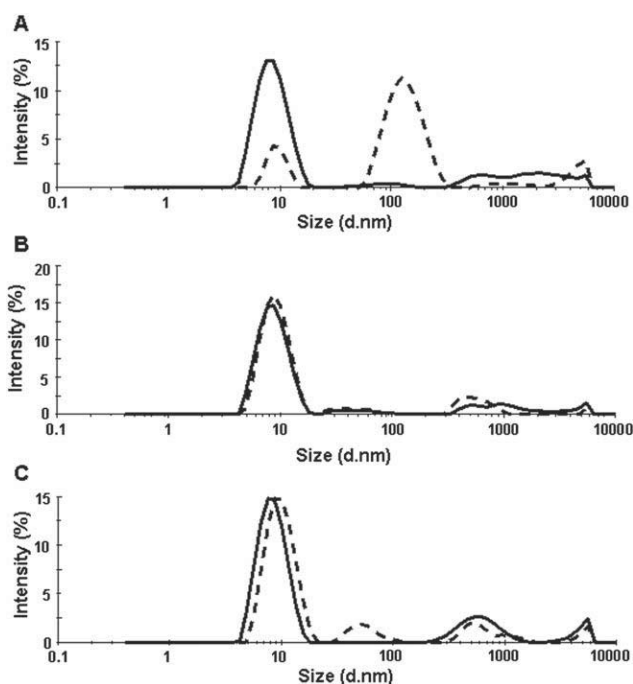


Fig. 1 Particle size distribution curves by intensity at 25 °C (A), 32.5 °C (B) and 37 °C (C). DLS measurements of DPPC/DHPC bicellar systems (solid line) and DPPC/DHPC/FA bicellar systems (dashed line).

DPPC/DHPC bicelles are represented by solid lines, and the dashed lines correspond to the DPPC/DHPC/FA.

For pure DPPC/DHPC bicelles at 25 °C, the curve exhibited one large peak with a HD of 8.72 nm that scattered approximately 72.1% of the light and two minor peaks at 2472 nm (13.7%) and 716 nm (8.6%). At this temperature, the PI was 0.301. At 32.5 °C, the peaks obtained were centred at 8.2 nm (77.2%), 1285 nm (8.6%) and 543.6 nm (5.4%). When the temperature increased to 37 °C, the peak values were obtained at 8.48 nm (76.2%), 617.7 nm (18.2%) and 4811 nm (5.6%). The PI values at 32.5 and 37 °C were 0.308 and 0.295, respectively.

For DPPC/DHPC/FA bicellar systems, the DLS curves at 25 °C show a large peak with a HD of 137.6 nm (72.4%) and two other peaks centred at 9.52 nm (15.7%) and 4569 nm (8.7%). At 32.5 °C, the peaks obtained were centred at 9.33 nm (78.9%), 566.3 nm (13.4%) and 37.04 nm (4.4%). A similar behaviour was obtained at 37 °C, with peaks at 10.01 nm (76.8%), 55.97 nm (9.0%) and 552.0 nm (8.6%). The PI values at 25, 32.5 and 37 °C were 0.659, 0.360 and 0.306, respectively.

Evidently, these results indicate a high complexity and heterogeneity in the size of the samples. However, by observing only the populations that scatter 70% of light or more, a more simplistic scenario can be obtained. Although we are aware that this simplification does not represent the systems exactly, the interpretation is useful in drawing some relevant data. Then we can observe that DPPC/DHPC systems were mainly formed by small structures with a size of approximately 9 nm, regardless of the temperature studied. This size agrees with the results reported by other authors for discoidal bicelles.^{8,13} Bicellar systems with FFA, however, show different size distributions at the three studied temperatures. At 25 °C, most structures exhibited a particle size of approximately 138 nm, that is, the incorporation

of FFA at this temperature induced a significant increase in the size of the structures formed. The increase in temperature in this system containing FFA promotes a decrease in the size of the nanostructures, indicating a reorganisation of the aggregates by the effect of temperature.

In the evaluation of the incorporation of the FFA in the DPPC/DHPC bicelles, it can be seen that the more evident differences between pure DPPC/DHPC and the bicellar systems with FFA were noted at 25 °C. While the systems without FFA exhibited mainly particle sizes of approximately 9 nm in diameter, the incorporation of FFA resulted in the formation of larger structures. At higher temperatures (32.5 and 37 °C), variations in size between the systems with and without FFA were less notable. The values of the PI indicate that, when FFA is included in the DPPC/DHPC bicelles, the size of the nanostructures are more heterogeneous, particularly at 25 °C, coinciding with the milky appearance mentioned above. In the application of these systems as vehicles for drug delivery, the degree of homogeneity should not be a problem given that DPPC/DHPC systems have been used as drug delivery systems for diclofenac,¹³ exhibiting a PI of approximately 0.3.

3.2 Microscopy techniques

FFEM and cryo-TEM were used to visualise the samples. These techniques are complementary because they elucidate different aspects of the microstructures present in the systems. FFEM, as a fracturing and replica technique, is especially useful in visualising bilayers and/or multilamellar structures with dimensions greater than 10–20 nm,²⁵ whereas with cryo-TEM, the detection of smaller structures is possible, most likely because a direct image is obtained.³⁶

3.2.1 FFEM. The transmission electron microscopy of freeze-fractured samples containing bicellar nanostructures allowed us to examine the topography of these samples on the surface and in the inner domains of the lipid bilayers. The fracture occurs along the plane that involves the area of weakest forces.²⁵ In the case of bilayers, such as in our study, the fracture is produced along the bilayer midplane.³⁷

Freeze fracture micrographs of the DPPC/DHPC bicellar systems at 25 °C (Fig. 2) show small aggregates with diameters of approximately 10 nm. These sizes are in accordance with the DLS results. Most of these aggregates have a discoidal form (black arrow).

FFEM images of the DPPC/DHPC/FA systems (Fig. 3) exhibit multiple structures at different temperatures. Fig. 3A and B show systems of DPPC/DHPC/FA at 25 °C. In these micrographs, coexist phospholipids domains of lamellar sheet fragments (Fig. 3A, black arrow), large multilamellar sheets (Fig. 3B, white arrow), and small structures that are 10–20 nm in size (white circle). These morphologies and dimensions agree fairly well with the sizes observed by DLS. Fig. 3C and D depict the DPPC/DHPC/FA systems at 32.5 °C. Fig. 3C shows undulated structures similar to the ripple phases described by Meyer and Richter,³⁸ as well as small structures. In Fig. 3D, structures similar to perforated bilayers are shown. The image of the DPPC/DHPC/FA systems at 37 °C (Fig. 3E and F) shows tubular (white arrow), discoidal (black arrow) and spherical

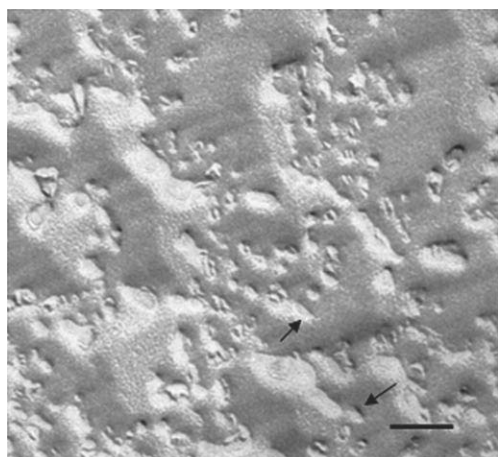


Fig. 2 Micrograph obtained by FFEM of DPPC/DHPC bicellar systems cryofixed at 25 °C. Scale bar: 100 nm.

(black arrowhead) small structures. The tubular structures may be associated with the largest structures detected by DLS (552 nm). The light scattering technique measures the Brownian motion of particles and correlates them with size; if the particles form non-spherical aggregates, these nanostructures are estimated and measured as spherical in shape, and the resulting size is bigger than expected.²⁴

3.2.2 Cryo-TEM. Cryo-TEM pictures were taken to visualise the changes in the morphology of DPPC/DHPC bicellar

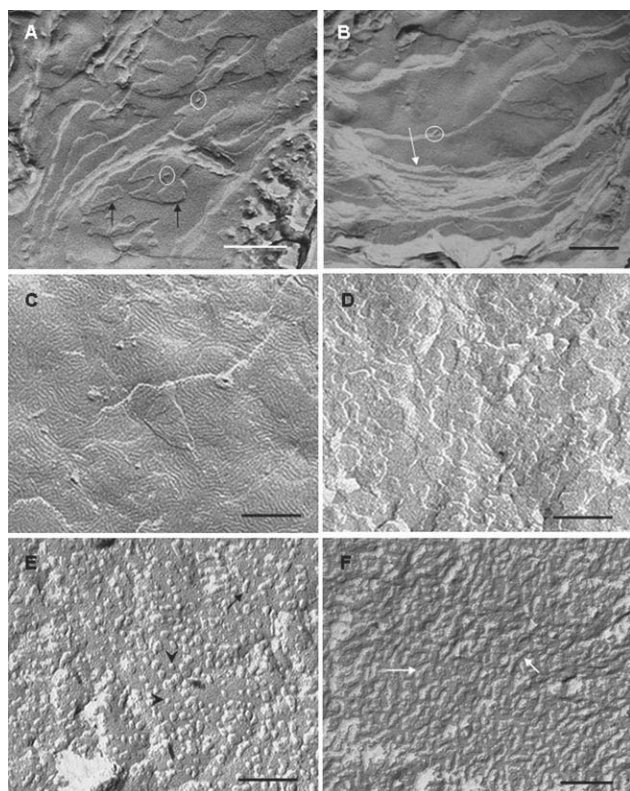


Fig. 3 FFEM micrographs of DPPC/DHPC/FA bicellar systems. At 25 °C (A, B), 32.5 °C (C, D) and 37 °C (E, F). Scale bar: 200 nm.

nanostructures when FFA was included. Fig. 4A shows bicellar systems formed by DPPC/DHPC at 25 °C. Discoidal structures in face-on (white arrow) and edge-on (black arrow) dispositions were visualised. The diameter of these structures is between 20 and 50 nm. Because of the larger amount of phospholipid material in the way of the electron beam, edge-on discs display a higher contrast (dark lines) against the background compared to face-on discs. Edge-on views of these structures can be seen as thin, dark lines. The cryo-TEM micrograph of systems, including FFA at 25 °C (Fig. 4B), shows large disks of approximately 150 nm that agree with the DLS results. At 32.5 °C (Fig. 4C), discoidal bicelles with a diameter of approximately 30–70 nm in the face-on and edge-on dispositions are shown. In most cases, these structures were visualised forming stacks. Also, small spherical structures were observed, which could correspond to the smaller particles detected by DLS at this stage. In addition, larger structures of 566 nm were obtained by DLS, which could correspond to the stacks formed by the bicellar system. Again, it is necessary to consider the peculiarity of the DLS technique in the interpretation of our results. If the particles form stacks, these stacks are measured by DLS as a unique particle, and the size detected corresponds to the set of bicelles. At 37 °C (Fig. 4D), small structures detected as black dots are shown. These structures could correspond to small spherical mixed micelles. Thus, these results indicate that the increase in temperature in systems containing FFA could induce the formation of mixed micelles.

Similar to the results from DLS, microscopic observations reported that small and large structures coexist in the DPPC/DHPC/FFA systems. Small structures were preferably observed with cryo-TEM, whereas FFEM was used more appropriately to study structures with larger sizes and with lamellar shapes.

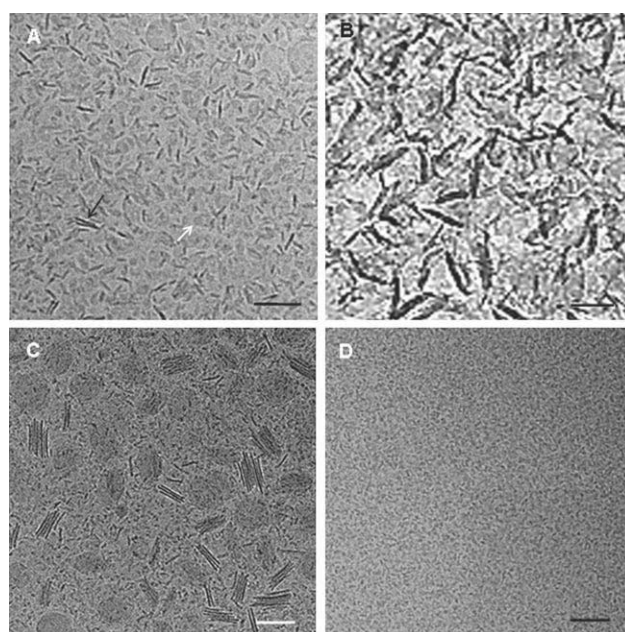


Fig. 4 (A) Cryo-TEM micrographs of DPPC/DHPC bicelles and (B), (C) and (D) DPPC/DHPC/FA bicellar systems at 25 °C, 32.5 °C and 37 °C, respectively. Scale bar: 100 nm.

3.3 DSC

Differential scanning calorimetry (DSC) is a fast and relatively inexpensive technique that allows the study of the thermotropic properties of lipid bilayers in the absence and presence of bioactive molecules. In our case, DSC was used to obtain information regarding the influence of FFA on the phase-transition parameters of DPPC/DHPC bicelles. In fact, the presence of a new molecule in the phospholipid bilayers may affect certain thermodynamic parameters such as the temperature and enthalpy (ΔH) associated with different lipidic transitions. Compounds added in the lipid bilayers can change the lipid packing mode and therefore change both the T_m and ΔH of the gel to the liquid-crystalline transition.³⁹

Fig. 5 shows the DSC thermograms of DPPC/DHPC and DPPC/DHPC/FFA bicellar systems. The signals observed in the thermograms are associated with DPPC because DSC thermograms of DHPC at this temperature range (results not shown) exhibited no peaks, and the melting point of FA is 128 °C (out of the temperature range used).⁴⁰ It is known that pure DPPC multilayers exhibit three endothermic phase transitions: a sub-transition (L_c to $L_{\beta'}$) at approximately 20 °C, a pretransition ($L_{\beta'}$ to $P_{\beta'}$) at 35–36 °C and a main phase transition ($P_{\beta'}$ to L_{α}) at 41.8–42 °C.⁴¹ Although, depending on the method used in preparing the multilayers, the subtransition does not appear.⁴¹ A quantitative determination of all enthalpies was not feasible due to the broadening of the peaks. Only the main transition enthalpies were determined, with approximate values due to the overlapping of the peaks.

The curve associated with the DPPC/DHPC systems shows a transition (T_m) at 41.1 °C (transition enthalpy of approximately 16 kJ mol⁻¹) that corresponds to the $P_{\beta'}$ to L_{α} transition of the DPPC alkyl chains. Additionally, a shoulder peak around 35 °C with low intensity was detected, which is compatible with the pretransition in the pure DPPC systems. The formation of bicellar systems with DHPC may provoke some influence in the

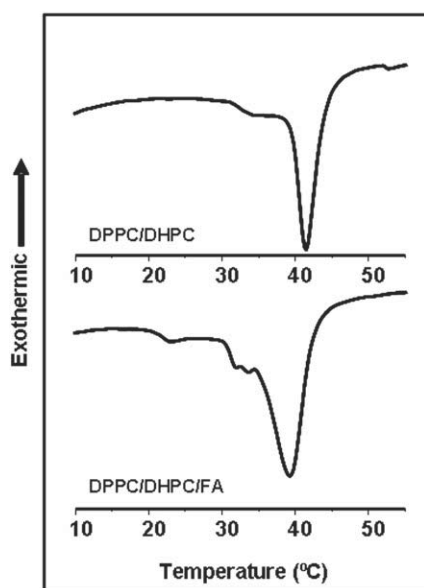


Fig. 5 Calorimetric heating curves of DPPC/DHPC and DPPC/DHPC/FA bicellar systems.

pretransition of DPPC, inducing a widening of the band with respect to the results reported in the literature for pure DPPC systems^{42–44} and a small decrease in the main transition temperature. In the lower curve of Fig. 5 (thermogram of DPPC/DHPC/FA bicellar systems), a main transition temperature at 38.9 °C (transition enthalpy of approximately 22 kJ mol⁻¹) was observed. Furthermore, a weak peak at approximately 22 °C and a double shoulder peak at approximately 32 °C and 33 °C are shown. The peak at approximately 22 °C could correspond to the sub-transition phase (L_c to $L_{\beta'}$) characteristic of pure hydrated DPPC bilayers that were described previously. In the comparison of these two curves, a decrease in the main transition temperature was observed when FFA was included in the DPPC/DHPC bicellar systems. Moreover, the shoulder peak of the upper curve becomes a double peak, and a new transition also appears at lower temperatures. In the DPPC/DHPC curve, the peak of the main transition is sharper than that of the DPPC/DHPC/FA curve. These changes in the DSC thermograms indicate that, when FFA is incorporated in the studied systems, more complex structures appear. These results are in accordance with the DLS measurements and FFEM micrographs that indicate different structures of DPPC/DHPC/FA bicellar systems at different temperatures.

3.4 SAXS/WAXS results

To elucidate the structural effects of FFA on DPPC/DHPC bicelles, a series of SAXS/WAXS studies were carried out at three different temperatures (25, 32.5 and 37 °C).

SAXS provides information on the larger structural units of a given sample. In our case and with the two different systems, the lamellar repeat distance d was estimated from the analysis of the peaks by Bragg's law and was attributed to the bilayer thickness as in the studies with liposomes and other bilayer models.^{8,45} Fig. 6A shows the SAXS region of the DPPC/DHPC systems at the three temperatures studied. At 25, 32.5 and 37 °C, a broad band centred at $q = 0.110 \text{ \AA}^{-1}$, $q = 0.108 \text{ \AA}^{-1}$ and $q = 0.108 \text{ \AA}^{-1}$ appeared, respectively, corresponding to the d values of 57, 58 and 58 Å. Thus, these results do not show significant changes in the large structure of the DPPC/DHPC systems at these temperatures. Additionally, it can be deduced that these bicellar systems do not form lamellar sheets and/or stacks because multiple sharp peaks do not appear. This explanation is in accordance with the visualisation of these bicellar systems by FFEM and cryo-TEM, where no lamellar sheets were observed. In Fig. 6B, SAXS scattering profiles of the bicellar systems containing FFA are observed. At 25 °C, two peaks ($q = 0.097 \text{ \AA}^{-1}$ and $q = 0.217 \text{ \AA}^{-1}$) related to the first and second order of the lamellar repeat distance of 65 Å were detected. At this temperature, the incorporation of FFA into the DPPC/DHPC bicelles causes a scattering profile to which more ordered structures can be associated, such as the formation of stacked multilamellar structures. At 32.5 °C and 37 °C, only a broad peak centred at $q = 0.112$ and 0.110 \AA^{-1} ($d = 56$ and 57 \AA) appears. These results seem to indicate that, at these temperatures, the incorporation of FFA molecules does not modify the d -spacing values. This fact could be explained by the smaller size of the FFA molecules that do not disturb the DPPC bilayer.

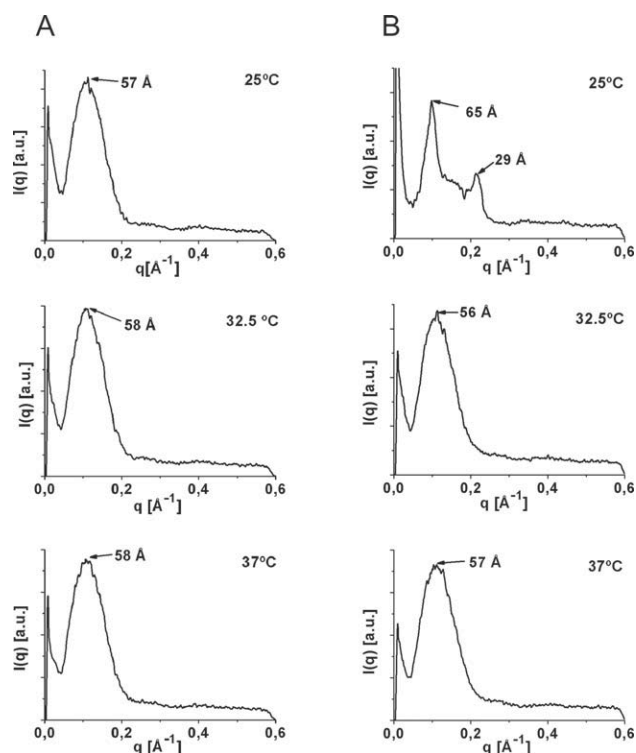


Fig. 6 SAXS intensity profile as a function of the scattering vector modulus q of DPPC/DHPC (A) and DPPC/DHPC/FA bicellar systems (B). The measurements were carried out at 25 °C, 32.5 °C and 37 °C.

Scattering in the WAXS region reveals the lateral chain packing of the lipids. Fig. 7A shows the scattered intensity of the WAXS region for DPPC/DHPC bicellar systems at 25, 32.5 and 37 °C. At the temperatures investigated, two broad bands were observed; these bands were detected at q values of 1.49 and 1.79 \AA^{-1} , corresponding to a chain–chain distance (d_c) of 4.2 and 3.5 \AA . The two different distances are in accordance with an orthorhombic packing described by other authors^{46,47} in other lipid systems. This arrangement is not surprising for DPPC bilayers because it has been already described in previous works.^{42,48}

The WAXS spectra of DPPC/DHPC/FFA bicellar systems at different temperatures are shown in Fig. 7B. At 25 °C, a sharp peak at $q = 1.53 \text{ \AA}^{-1}$ ($d_c = 4.1 \text{ \AA}$) was observed. The presence of this sharp reflection indicates that the phospholipids are well-ordered and form a layered structure, with distances of 4.1 \AA between the aliphatic chains. The presence of only one peak at this q indicates a hexagonal packing.⁴⁶ At 32.5 °C, the presence of a broad band centred at $q = 1.49 \text{ \AA}^{-1}$ ($d_c = 4.2 \text{ \AA}$) was detected, also indicating hexagonal packing. The existence of a broad band instead of a sharp peak indicates that the chains are less organised at this temperature than at 25 °C. When the temperature was increased to 37 °C, a broad band at $q = 1.46 \text{ \AA}^{-1}$ ($d_c = 4.3 \text{ \AA}$) and a shoulder at $q = 1.33 \text{ \AA}^{-1}$ ($d_c = 4.7 \text{ \AA}$) were observed. A d_c value of approximately 4.6 \AA has been associated in the literature with liquid crystal packing.⁴⁶ Thus, these two bands could be explained by the formation of a hybrid packing of hexagonal and liquid crystalline conformations. Liquid crystalline packing occurs when the lipids undergo a transformation from an ordered gel state to a disordered liquid state after reaching the transition temperature.

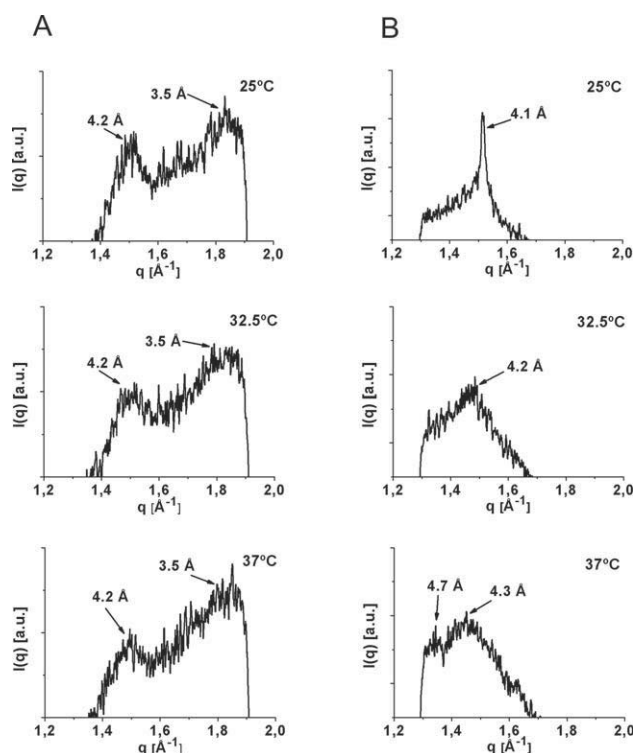


Fig. 7 WAXS intensity profile versus the scattering vector modulus q recorded from DPPC/DHPC (A) and DPPC/DHPC/FA bicellar systems (B). The measurements were carried out at 25 °C, 32.5 °C and 37 °C.

In the DSC results obtained for DPPC/DHPC/FFA bicellar systems, the main transition temperature detected for this system was 38.90 °C; therefore, at 37 °C, evidence of the existence of a liquid crystalline conformation for the DPPC/DHPC/FFA systems is reasonable.

It seems that the inclusion of FFA in the DPPC/DHPC systems induces a change in the lateral packing from the orthorhombic to hexagonal conformation and a formation of the corresponding lamellae at 25 °C.

4. Discussion

In this work, we have demonstrated the incorporation of 1% w/v FFA in DPPC/DHPC bicellar systems. This incorporation modifies the initial discoidal structure. In addition, the poor solubility of this drug in water (0.03 mg ml^{-1})⁴⁹ and the concentration included in our systems (10 mg ml^{-1}) eliminated the possibility that the FFA was located in the aqueous medium; therefore, the inclusion of the drug in the bicellar system was the most likely option.

Thus, considering the incorporation of FFA in the lipid domains of the bicellar system, two different accommodation sites could be considered: the polar and the apolar environments of the lipid bilayers. It has been reported that this incorporation is in either of these sites depending on the protonation state of the carboxylic acid group of the FFA, which has a pK_a of approximately 4.⁵⁰ At $\text{pH} > pK_a$, the carboxylic group of FFA is ionised and placed at the polar domains of the lipids. At $\text{pH} < pK_a$, the FFA would be expected to be at apolar domains because the

carboxylic group is un-ionised. Consequently, and given that the pH of bicellar systems containing FFA is approximately 5.5 (slightly higher than the pK_a), a preferential inclusion of the drug between the apolar alkyl chains of DPPC may be expected. It is interesting to note that the pH of the system with FFA is the same as that reported for healthy skin.

In general, an increase in the size of structures at 25 °C from approximately 9 nm HD to approximately 138 nm HD was detected by the incorporation of FFA. It is known that, in water, DPPC alone has a tendency to form flat lamellae and vesicles, whereas DHPC tends to form small micelles that are spherical in shape.⁵¹ Therefore, the large structures detected after the addition of FFA may be fragments of lamellar sheets possibly formed by a partial removal of DHPC from the discoidal bicelles. This displacement of the short-chain phospholipids would result in the formation of lamellae and fragments of lamellar sheets enriched in DPPC. Mixed with these lamellar sheets, small nanostructures may also be detected (visualised by microscopy, Fig. 3A, B and Fig. 4B). FFA would be distributed in the apolar domains of the lamellae and most likely in the small nanostructures that are enriched by the DHPC.

The DPPC/DHPC/FFA system exhibited structural and morphological modifications by the effect of temperature. It is interesting to note that no changes with temperature were detected in the system in the absence of FFA. Previous works have reported that discoidal bicelles become large structures when the experimental temperature increases above the T_m of the long-alkyl phospholipid chain.³ Although the T_m of DPPC decreases (according to DSC results) in the system containing FFA, this temperature is close to (38.9 °C) but still higher than the experimental temperature (37 °C). Therefore, an increase in size due to temperature would not be expected. On the contrary, our results indicated that, when the experimental temperature is increased, the size decreases, as observed from the microscopy results (Fig. 3 and 4).

Consequently, other parameters apart from temperature could also cause modifications in the bicellar systems, such as the dilution, composition and molar ratio of short and long-alkyl chain phospholipids.³ FFA is poorly soluble in water; however, its solubility is increased by non-ionic surfactants,⁵² as is the case of DHPC. Variations in FFA solubility (at the temperature range studied) may likely induce the different distributions of the drug between the aqueous medium and the lipid system. This fact promotes the formation of structures with different molar ratios that exhibit different sizes and shapes. At 25 °C, FFA was incorporated with a great extent into the sheets of DPPC, particularly among the alkyl chains of DPPC (apolar domain). At 32.5 °C, a part of the FFA molecules formed lamellae, and another part was included in the bicellar system formed by DPPC/DHPC. At 37 °C, a part of the FFA was included in the bicellar aggregates, and another part formed mixed micelles, worm-like micelles and branched quasi-cylindrical micelles with DHPC and DPPC. Similar aggregates were described in systems composed of dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) and DHPC when the temperature and molar ratio were increased.³ In our case, the structural transformations seem to be highly ruled by the incorporation of FFA in the aggregates, given that no changes were observed in the system without the drug.

The ability of bicellar systems to incorporate different molecules is not new. Different techniques have demonstrated the changes promoted in the structure of these systems by incorporation of several substances such as surfactants,⁵³ cholesterol sulfate⁵⁴ or ceramides.^{8,55} We previously reported results on the incorporation of diclofenac in DMPC/DHPC and DPPC/DHPC bicellar systems studied by DLS and cryo-TEM;¹³ this drug decreased the size of both systems.

The complexity of bicellar systems is obvious and has been demonstrated in a number of studies.^{2,3,6,11,14} This complexity increases when additional molecules are included in the nanostructures that form the systems,^{8,13} as the present work shows. A mix-and-match approach is necessary to obtain a better approximation of the real nature and behaviour of the systems. The HD obtained by DLS is that of a hypothetical hard sphere that diffuses at the same speed as the particle under study. The bicellar structure is supposed to be discoidal when the temperature is below T_m .^{56,57} Our results indicate that changes in the temperature and the inclusion of FFA cause important modifications on the aggregates, forming stacks, lamellar structures and other morphologies. Due to the structural and morphological versatility, the results on particle size obtained with this technique can be considered an estimation of the dimension of the structures present in our samples, representing a useful tool in the study of particle size changes as a function of temperature and the inclusion of FFA. The results obtained by DLS are complementary with the other techniques studied. The difference in the sizes of the small vesicles and structures observed by FFEM and cryo-TEM is not representative because of FFEM only allows the visualisation of the fractured area of the structures in a plane, not in a volume of the solution, as with the cryo-TEM technique.

Cryo-TEM⁵⁸ is particularly appropriate for the study of lipid phase transitions because vitrification is particularly fast and efficient. In FFEM, the fixation protocol is the same as in cryo-TEM; however, the fracture runs randomly and preferably between the two layers of the lipid bilayer. This fact could make it difficult to visualise transient structures. Cryo-TEM images are two-dimensional projections of all the membranes in the dispersion, whereas FFEM images only show the two-dimensional projection of a single fracture surface. Therefore, it is easier to visualise peculiar, short-lived intermediate structures with cryo-TEM. Thus, the characterisation of new structures was facilitated using both microscopy techniques. The disadvantage of cryo-TEM is that images of lipidic structures in water are often formed with comparatively poor contrast. Therefore, cryo-TEM may be an excellent complementary technique to FFEM because different aspects of the microstructure can be elucidated.⁵⁹

In the DSC curve of DPPC/DHPC bicellar aggregates, a pronounced main transition at 41.1 °C was detected that is in accordance with the chain melting of pure DPPC.⁶⁰ The typical peak of pretransition of pure DPPC at 35 °C is detected as a broad band in our case; this fact demonstrates that DHPC influences the pretransition, provoking a certain widening of the band. This widening can be associated with the formation of aggregates of different sizes and assemblies due to different modes of interactions of DPPC with DHPC or with itself; however, only small changes in the main transition temperature of DPPC were noted. In the DPPC/DHPC/FFA bicellar systems

(Fig. 4), we observed a shift of the phase transition temperature and some broadening of this main transition peak (T_m) with respect to the DPPC/DHPC bicelles. This broadening effect is in accordance with the results obtained by Kyrikou *et al.*⁴⁴ on the incorporation of non-steroidal anti-inflammatory drugs in DPPC membrane layers. Chapman⁶¹ reported the relationship between the shape of the DSC peak and the cooperative interaction among DPPC molecules at the phase transition temperature. A sharp peak is derived from a higher cooperative interaction among DPPC molecules, while a broad peak is derived from a lower cooperative interaction.⁶¹ Therefore, the addition of FFA brings about a decrease in the cooperative interaction among DPPC molecules. Additionally, FFA induced a decrease in the T_m . In general, considering the interaction of lipids with molecules such as several carotenoids,⁴¹ melatonin⁶² or progesterone,⁶³ the tendency is the disappearance of the pre-transition; however, in our case, the formation of a double shoulder was observed instead of a disappearance. This double shoulder could correspond to transitions between $L_{\beta'}$ and P_{β} phases and/or the coexistence of both. At 32.5 °C, FFEM micrographs show a ripple phase and also a variety of other structures, corroborating the theory of the coexistence of $L_{\beta'}$ and P_{β} phases. The subtransition phase detected by DSC for FFA bicellar systems could be induced by the formation of the DPPC lamellae in which DHPC would be excluded. Given that this subtransition phase was not detected for systems without FFA, we may assume that the drug was responsible for the displacement of DHPC from the DPPC lamellae. The formation of these lamellae is corroborated with FFEM micrographs at 25 °C. This subtransition could also be due to the fact that, for the formation of the DPPC/DHPC/FFA systems, more thermal treatments were performed than in the case of the DPPC/DHPC bicelles. This is in accordance with the results provided by Kinoshita *et al.*⁶⁴ that reported that an incubation at low temperatures induces the formation of a subgel transition, namely, a sub-transition, in our case. The pretransition double shoulder and the detected subtransition reinforce the hypothesis of the formation of new complexes of DPPC, DHPC and FFA or different combinations of the three. Micrographs of Fig. 3 and 4 show images of the systems at 25, 32.5 and 37 °C. Considering the DSC results, different phases are expected at these temperatures; consequently, the high structural variety observed in the micrographs agrees fairly well with the calorimetric data, and a similar argument is applicable to the DLS results.

The patterns of the DPPC/DHPC system in SAXS revealed a characteristic broad band of single phospholipid bilayers (uncorrelated bilayers) in the absence of stacking.⁶⁵ When FFA is included in the bicelles at 25 °C, the formation of stacks can be detected, which agrees with the FFEM micrographs (Fig. 3). At 32.5 and 37 °C, a broad peak appears, indicating the absence of bilayer stacking. WAXS results indicate an internal disordering caused by the inclusion of FFA, inducing a transformation from orthorhombic to hexagonal chain packing. This behaviour of FFA is also reflected in a previous work of Grage *et al.*,⁶⁶ where the influence of FFA in DMPC bilayers was studied. The disordering of the DPPC/DHPC structure by the inclusion of FFA is more obvious at 37 °C because the initial transformation from hexagonal to liquid crystal packing was observed.

Thus, the inclusion of FFA in the bicellar systems induces the formation of new aggregates such as large multilamellar sheets and undulated, discoidal or tubular structures as a function of temperature. Although to match results from all the techniques is difficult because each technique has its own peculiarities, we believe that it is necessary to address different perspectives to attain an accurate interpretation of the results. The appropriate characterisation of these systems is important for future works, in which bicellar systems will be used to topically deliver hydrophobic drugs such as FFA.

Acknowledgements

The authors acknowledge Ministerio de Educación y Ciencia, Spain (CTQ2010-16964), and Generalitat de Catalunya (2009 SGR 1212). This work was supported by the European Social Fund (Programa Nacional de Potenciación de Recursos Humanos del Plan Nacional de I + D + I (2004–2008)). Mercedes Cócera is funded by the JAE-Doc Program from CSIC. Additionally, the authors wish to thank Elisenda Coll, Jaume Caelles and Josep Carilla for their expert assistance with the techniques used in this work.

References

- 1 J. Struppe and R. R. Vold, *J. Magn. Reson.*, 1998, **135**, 541–546.
- 2 E. Sternin, D. Nizza and K. Gawrisch, *Langmuir*, 2001, **17**, 2610–2616.
- 3 L. van Dam, G. Karlsson and K. Edwards, *Langmuir*, 2006, **22**, 3280–3285.
- 4 C. R. Sanders and J. P. Schwonek, *Biochemistry*, 1992, **31**, 8898–8905.
- 5 R. M. El Maghraby and R. S. Prosser, *J. Magn. Reson., Ser. B*, 1996, **113**, 267–271.
- 6 J. Katsaras, T. A. Harroun, J. Pencer and M. P. Nieh, *Naturwissenschaften*, 2005, **92**, 355–366.
- 7 I. Marcotte and M. Auger, *Concepts Magn. Reson., Part A*, 2005, **24**, 17–37.
- 8 L. Barbosa-Barros, A. de la Maza, C. López-Iglesias and O. López, *Colloids Surf., A*, 2008, **317**, 576–584.
- 9 G. M. El Maghraby, B. W. Barry and A. C. Williams, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2008, **34**, 203–222.
- 10 M. T. Sheu, S. Y. Chen, L. C. Chen and H. O. Ho, *J. Controlled Release*, 2003, **88**, 355–368.
- 11 L. Barbosa-Barros, A. de la Maza, J. Estelrich, A. M. Linares, M. Feliz, P. Walther, R. Pons and O. López, *Langmuir*, 2008, **24**, 5700–5706.
- 12 G. Rodríguez, L. Barbosa-Barros, L. Rubio, M. Cócera, C. López-Iglesias, A. de la Maza and O. López, *Colloids Surf., B*, 2011, **84**, 390–394.
- 13 L. Rubio, C. Alonso, G. Rodríguez, L. Barbosa-Barros, L. Coderch, A. De la Maza, J. L. Parra and O. López, *Int. J. Pharm.*, 2010, **386**, 108–113.
- 14 L. Barbosa-Barros, C. Barba, G. Rodríguez, M. Cócera, L. Coderch, C. López-Iglesias, A. de la Maza and O. López, *Mol. Pharmaceutics*, 2009, **6**, 1237–1245.
- 15 G. Rodríguez, L. Rubio, M. Cócera, J. Estelrich, R. Pons, A. de la Maza and O. López, *Langmuir*, 2010, **26**, 10578–10584.
- 16 P. F. Almeida, W. L. Vaz and T. E. Thompson, *Biochemistry*, 1992, **31**, 6739–6747.
- 17 M. R. Vist and J. H. Davis, *Biochemistry*, 1990, **29**, 451–464.
- 18 G. M. Golden, D. B. Guzek, A. H. Kennedy, J. E. McKie and R. O. Potts, *Biochemistry*, 1987, **26**, 2382–2388.
- 19 H. Wagner, K. H. Kostka, W. Adelhardt and U. F. Schaefer, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2004, **58**, 121–129.
- 20 T. D. Warner, F. Giuliano, I. Vojnovic, A. Bukasa, J. A. Mitchell and J. R. Vane, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1999, **96**, 7563–7568.
- 21 F. Han, S. Li, R. Yin, H. Liu and L. Xu, *Colloids Surf., A*, 2008, **315**, 210–216.

- 22 D. Momekova, G. Momekov, S. Rangelov, G. Storm and N. Lambov, *Soft Matter*, 2010, **6**, 591–601.
- 23 J. Ramos, A. Imaz, J. Callejas-Fernandez, L. Barbosa-Barros, J. Estelrich, M. Quesada-Perez and J. Forcada, *Soft Matter*, 2011, **11**, 5067.
- 24 H. G. Merkus, in *Particle Size Measurements*, ed. B. Scarlett, Springer Pijnacker, 2009, vol. 17, pp. 299–317.
- 25 B. Papahadjopoulos-Sternberg, *Methods Mol. Biol.*, 2010, **606**, 333–349.
- 26 C. Brancewicz, D. H. Rasmussen and B. Papahadjopoulos-Sternberg, *J. Dispersion Sci. Technol.*, 2006, **27**.
- 27 S. U. Egelhaaf, E. Wehrli, M. Müller, M. Adrian and P. Schurtenberger, *J. Microsc.*, 1996, **184**, 214–228.
- 28 M. Almgren, K. Edwards and G. Karlsson, *Colloids Surf., A*, 2000, **174**, 3–21.
- 29 P. S. Mohanty, H. Dietsch, L. Rubatat, A. Streadner, K. Matsumoto, H. Matsuoka and P. Schurtenberger, *Langmuir*, 2009, **25**, 1940–1948.
- 30 J. Pereira-Lachataigneris, R. Pons, H. Amenitsch, M. Rappolt, B. Sartori and O. López, *Langmuir*, 2006, **22**, 5256–5260.
- 31 M. Sega, G. Garberoglio, P. Brocca and L. Cantu, *J. Phys. Chem. B*, 2007, **111**, 2484–2489.
- 32 C. Huang and S. Li, *Biochim. Biophys. Acta, Rev. Biomembr.*, 1999, **1422**, 273–307.
- 33 W. L. Bragg, *The Diffraction of Short Electromagnetic Waves by a Crystal*, 1913.
- 34 R. Koynova and M. Caffrey, *Biochim. Biophys. Acta, Rev. Biomembr.*, 1998, **1376**, 91–145.
- 35 R. A. Videira, M. C. Antunes-Madeira and V. M. Madeira, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 1999, **1419**, 151–163.
- 36 H. Cui, T. K. Hodgdon, E. W. Kaler, L. Abezgaus, D. Danino, M. Lubovsky, Y. Talmon and D. J. Pochan, *Soft Matter*, 2007, **3**, 945–955.
- 37 R. Strey, W. Jahn, G. Porte and P. Bassereau, *Langmuir*, 1990, **6**, 1635–1639.
- 38 H. W. Meyer and W. Richter, *Micron*, 2001, **32**, 615–644.
- 39 B. Pili, C. Bourgaux, H. Amenitsch, G. Keller, S. Lepetre-Mouelhi, D. Desmaele, P. Couvreur and M. Ollivon, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 2010, **1798**, 1522–1532.
- 40 E. Abignente, P. de Caprariis and F. Klaus, in *Analytical Profiles of Drug Substances*, ed. K. Florey, Academic Press, San Diego, 1982, vol. 11, pp. 313–346.
- 41 A. Kostecka-Gugala, D. Latowski and K. Strzalka, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 2003, **1609**, 193–202.
- 42 M. Lucio, F. Bringezu, S. Reis, J. L. Lima and G. Brezesinski, *Langmuir*, 2008, **24**, 4132–4139.
- 43 N. Fa, S. Ronkart, A. Schanck, M. Deleu, A. Gaigneaux, E. Goormaghtigh and M. P. Mingeot-Leclercq, *Chem. Phys. Lipids*, 2006, **144**, 108–116.
- 44 I. Kyrikou, S. K. Hadjikakou, D. Kovala-Demertzi, K. Viras and T. Mavromoustakos, *Chem. Phys. Lipids*, 2004, **132**, 157–169.
- 45 O. López, M. Cócera, L. Campos, A. de la Maza, L. Coderch and J. L. Parra, *Colloids Surf., A*, 2000, **162**, 123–130.
- 46 G. Rodríguez, L. Barbosa-Barros, L. Rubio, M. Cócera, A. Díez, J. Estelrich, R. Pons, J. Caelles, A. D. I. Maza and O. López, *Langmuir*, 2009, **25**, 10595–10603.
- 47 G. S. Pilgram, A. M. Engelsma-van Pelt, H. K. Koerten and J. A. Bouwstra, *Pharm. Res.*, 2000, **17**, 796–802.
- 48 T. Mavromoustakos, D. Papahadjopoulos and P. Laggner, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 2001, **1512**, 183–190.
- 49 J. Hadgraft, J. d. Plessis and C. Goosen, *Int. J. Pharm.*, 2000, **207**, 31–37.
- 50 Y. Lee, I. H. Kim, J. Kim, J.-H. Yoon, Y. H. Shin, Y. Jung and Y. M. Kim, *J. Drug Targeting*, 2010, **0**, 1–8.
- 51 H. Wang, J. de Joannis, Y. Jiang, J. C. Gauding, B. Albrecht, F. Yin, K. Khanna and J. T. Kindt, *Biophys. J.*, 2008, **95**, 2647–2657.
- 52 J. Luengo, B. Weiss, M. Schneider, A. Ehlers, F. Stracke, K. König, K. H. Kostka, C. M. Lehr and U. F. Schaefer, *Skin Pharmacol. Physiol.*, 2006, **19**, 190–197.
- 53 M. Kozak, L. Domka and S. Jurga, *J. Mol. Struct.*, 2007, **846**, 108–111.
- 54 R. A. Shapiro, A. J. Brindley and R. W. Martin, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 11406–11407.
- 55 L. Barbosa-Barros, A. De la Maza, P. Walther, J. Estelrich and O. López, *J. Microsc.*, 2008, **230**, 16–26.
- 56 M.-P. Nieh, C. J. Glinka, S. Krueger, R. S. Prosser and J. Katsaras, *Langmuir*, 2001, **17**, 2629–2638.
- 57 S. Gaemers and A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 12343–12352.
- 58 J. Dubochet, M. Adrian, J. J. Chang, J. C. Homo, J. Lepault, A. W. McDowell and P. Schultz, *Q. Rev. Biophys.*, 1988, **21**, 129–228.
- 59 D. P. Siegel, W. J. Green and Y. Talmon, *Biophys. J.*, 1994, **66**, 402–414.
- 60 M. D. Reeves, A. K. Schawel, W. Wang and P. Dea, *Biophys. Chem.*, 2007, **128**, 13–18.
- 61 D. Chapman, *Q. Rev. Biophys.*, 1975, **8**, 185–235.
- 62 F. Severcan, I. Sahin and N. Kazanci, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 2005, **1668**, 215–222.
- 63 F. Korkmaz and F. Severcan, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2005, **440**, 141–147.
- 64 M. Kinoshita, K. Ito and S. Kato, *Chem. Phys. Lipids*, 2010, **163**, 712–719.
- 65 J. Bolze, T. Fujisawa, T. Nagao, K. Norisada, H. Saito and A. Naito, *Chem. Phys. Lett.*, 2000, **329**, 215–220.
- 66 S. L. Grage, D. R. Gauger, C. Selle, W. Pohle, W. Richter and A. S. Ulrich, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2000, **2**, 4574–4579.

Article 3

Bicellar systems as new delivery strategy for topical application of flufenamic acid

J. Phys. Chem. B- en revisió.

En aquest treball, els sistemes bicel·lars, han estat proposats com una nova estratègia per a l'alliberament de l'antiinflamatori FFA sobre la pell.

La caracterització prèvia dels sistemes bicel·lars amb FFA (Article 2), va confirmar la inclusió del fàrmac en aquests sistemes. En aquest treball s'ha estudiat comparativament l'absorció percutània *in vitro* en pell de porc del FFA en diferents vehicles (sistemes bicel·lars, una solució etanòlica i el producte comercial). També s'ha investigat per ATR-FTIR l'efecte dels diferents vehicles sobre la pell. Addicionalment, mitjançant la tècnica microscòpica FSTEM s'han visualitzat els possibles canvis microestructurals que puguin ser provocats a l'EC de la pell per l'aplicació dels sistemes bicel·lars amb FFA. La tècnica SAXS-SR es va utilitzar amb la pell sencera per a visualitzar canvis en el col·lagen de la pell ; l'estudi de l'EC aïllat va donar informació sobre els possibles canvis en la seva organització lipídica causats per l'aplicació dels sistemes bicel·lars amb FFA.

Els sistemes bicel·lars van exhibir un efecte retardador de l'absorció percutània del FFA respecte als altres vehicles. Els resultats d'ATR-FTIR i de SAXS-SR van mostrar un cert ordenament dels lípids de l'EC respecte a la mostra control que concorda amb l'efecte retardant de l'absorció percutània. En les micrografies de FSTEM no es van observar canvis en l'estructura lamel·lar dels lípids de l'EC. Per tant, els sistemes bicel·lars amb FFA tenen un efecte retardador de l'absorció percutània sense promoure canvis en la microestructura de l'EC de la pell.

Tenint en compte que l'alteració de la pell és un dels principals efectes causats per la inflamació, la prevenció i la reparació de la microestructura de la pell que aporten els sistemes bicel·lars amb FFA podrien ser aspectes pràctics beneficiosos per la seva aplicació tòpica.

Bicellar systems as new delivery strategy for topical application of flufenamic acid

L. Rubio^{,a}, C. Alonso^a, G. Rodríguez^a, M. Cócer^a, C. López-Iglesias^b, L. Coderch^a, A.*

De la Maza^a, J. L. Parra^a and O. López^a.

^aDepartment of Chemical and Surfactants Technology (IQAC-CSIC), C/Jordi Girona
18-26, 08034 Barcelona, Spain.

^bScientific and Technological Centers-University of Barcelona (CCiT-UB), Barcelona
Science Park, C/Baldiri Reixac, 10, 08028 Barcelona, Spain.

* Corresponding author: Laia Rubio, Department of Chemical and Surfactants
Technology (IQAC-CSIC) C/ Jordi Girona 18-26, 08034, Barcelona, Spain. Phone: 34-
93400 61 00. Fax: 34-93204 59 04. E-mail: laia.rubio@iqac.csic.es

ABSTRACT

In this work, bicellar systems, bilayered disk-shaped nanoaggregates formed in water by phospholipids, are proposed as a novel strategy for delivery the anti-inflammatory flufenamic acid (FFA) in the skin. A comparative percutaneous penetration study of this drug in bicellar systems and other different vehicles has been carried out. Also, the effects induced on the skin by the application of FFA in the different vehicles have been analyzed by ATR-FTIR. Additionally, using the microscopic technique FSTEM and SAXS-SR technique has been studied the possible microstructural and organizational changes that may be caused to the SC lipids and the collagen of the skin by the application of FFA bicellar systems. Bicellar systems exhibited a retarder effect on the percutaneous absorption of FFA with respect to the other vehicles without promoting disruption in the SC barrier function of the skin. Given that skin disruption is one of the main effects caused by inflammation, prevention and repair of the skin microstructure should be one of the goals to get in anti-inflammatory formulations.

Keywords:

Bicellar systems, flufenamic acid, ATR-FTIR, FS-TEM, *in vitro* percutaneous absorption, drug delivery.

1. Introduction

Bicellar systems are mixtures of two types of phospholipids in aqueous medium, one with long alkyl hydrophobic chains and another with short alkyl hydrophobic chains. These phospholipids are able to self-assemble forming different nanoaggregates. The most common nanostructures formed are discoidal bicelles, which are intermediate forms between lipid vesicles and classical mixed micelles^{1,2}. In bicelles, the long-chain phospholipids constitute the bilayer structure in the central part and the short-chain phospholipids complete the margins of the disk^{3,4}. Considering the structure, chemical composition avoiding surfactants and nanodimensions of these systems, their use as delivery systems for topical applications emerges as an interesting strategy. The use of bicellar systems has been previously explored by our group for the transdermal delivery of the amphiphilic drug diclofenac⁵. Additionally, in other works we have demonstrated that these systems are able to work for skin applications in two ways: as permeabilizing agents of the skin or as reinforcing agents of the lipid structures present in the intercellular domains of the outermost layer of the skin, the stratum corneum (SC)^{6,7}. The skin represents the largest and most easily accessible organ of the body and it is readily available to drug application. Transdermal drug delivery offers many advantages compared to the conventional routes of application including avoidance of the first pass effect, stable blood levels, easy application and higher compliance of the patient^{8,9 10}. In order to evaluate data on the passage of substances through the skin as well as on its distribution over the different cutaneous compartments¹¹⁻¹³ *in vitro* percutaneous absorption studies are performed. These studies also permit the evaluation of the effectiveness of some vehicles and of the permeability enhancer effect to different compounds¹⁴.

Flufenamic acid (FFA) is a non-steroidal anti-inflammatory drug of the anthranilic acid group with potent anti-inflammatory and analgesic effects ¹⁵. This drug, that is commonly included in products for topical application, is insoluble in water and, organic solvents able to solubilise this drug could impair the skin. Given that skin disruption is one of the major proinflammatory stimulators ¹⁶, prevention and reparation of the skin microstructure should be one of the goals reach by anti-inflammatory topical formulations. Thus, in these formulations not only drug should be effective, but also the vehicle must work in the same address potentiating the drug effect. Additionally, the own deleterious effects of some anti-inflammatory molecules on the skin structure ¹⁷ should be considered and avoided by using appropriate skin repairing vehicles. Considering these arguments, we think that the use of bicellar systems as carriers of FFA may be a good alternative for dermal applications. Bicellar systems including FFA have been previously characterized in a recent work ¹⁸ using a combination of different techniques like dynamic light scattering (DLS), freeze-fracture electron microscopy (FFEM), Cryo-transmission electron microscopy (Cryo-TEM), x-ray scattering and differential scanning calorimetry (DSC).

The present study investigates the percutaneous penetration of FFA in different vehicles, as well as the effects induced on the skin by the application of FFA bicellar systems. Attenuated total reflectance-Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy, small angle X-ray scattering (SAXS) using synchrotron radiation (SR) and electron microscopy were used. ATR-FTIR is a highly suitable technique to determine the vibrational characteristic frequencies of the alkyl chain lipids related to differently ordered phases ¹⁹⁻²¹. SAXS is an excellent tool to study the structural organization of the collagen in the skin and the lipid lamellar organization of the SC ²² and freeze-substitution transmission electron microscopy (FSTEM) has been commonly

used to visualize the microstructure of the skin 23. In this work, the mentioned techniques were used to evaluate the microstructure of skin after treatment with FFA bicellar systems in vitro.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Flufenamic acid (FFA) was purchased from Sigma- Aldrich (St. Louis, MO, USA). Dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) and dihexanoyl phosphatidylcholine (DHPC) were supplied by Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA). Bovine Serum Albumin (BSA), Phosphate Buffer Saline (PBS) and gentamicin were obtained from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). Methanol (HPLC Grade), sodium dihydrogen phosphate monohydrate and ortho-phosphoric acid 85% were acquired from Merck (Darmstadt, Germany). Purified water was obtained by an ultra-pure water system, Milli-Q plus 185 (Millipore, Bedford, USA). Ethanol absolute was purchased from Carlo Erba (Milano, Italy). Commercial topic gel containing FFA, salicylic acid and excipients as isopropanol (Laboratorio Stada, Sant Just Desvern, Spain) was purchased at a local pharmacy. Trypsin (from porcine pancreas) was obtained from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA).

The chemicals for preparing microscopy samples were: ruthenium tetroxide (RuO_4), lowicryl HM20, glutaraldehyde and sodium cacodylate buffer which were supplied by Electron Microscopy Sciences (Hatfield, PA, USA), methanol and potassium ferrocyanide ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$) provided by Merck (Darmstadt, Germany), and osmium tetroxide (OsO_4) purchased from Pelco International (Redding, CA, USA).

2.2. Methods

2.2.1. Preparation of bicellar systems

Bicellar systems including FFA were formed with dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) as long-alkyl-chain phospholipid and dihexanoyl phosphatidylcholine (DHPC) as short-alkyl-chain phospholipid. An appropriate amount of DPPC was weighed and mixed with a DHPC chloroform solution to get DPPC/DHPC in the molar ratio 2:1. 10 mg of FFA were weighed and mixed with the DPPC/DHPC chloroformic solution. The chloroform was removed by rota-evaporation and the lipid film was dissolved in 1 ml of water to reach 20% (w/v) of total lipid concentration and sonicated until a transparent solution was obtained. PH measurements of FFA bicellar systems were performed with a Model 720 pH meter and a ROSS Model 8103 SC pH electrode, (both from Orion Research, Cambridge, MA, USA).

2.2.2. HPLC analysis

The quantitative determination of FFA was carried out by High-performance liquid chromatography (HPLC) using a Hitachi LaChrom Elite equipment (Darmstadt, Germany). The equipment consisted of an L-2130 pump, L-2200 autosampler and an L-400 UV detector. The system was operated from the software Merck EZChrom Elite v3.1.3. The chromatographic separation was performed at room temperature using a Lichrocart 250-4/Lichrosorb RP-18 (5 μ m) column (Merck, Germany) with a flow rate of 1.0 ml/min. Twenty microlitres of samples or calibration standards were injected into the column and eluted with a mobile phase of methanol and phosphate buffer (pH 2.5) (79:21, v/v). Detection was carried out by monitoring the absorbance signals at 284 nm. The calibration curve exhibited linear behaviour (> 0.99%) over the concentration range of 0.078–97 μ g/mL.

2.2.3. *In vitro* percutaneous absorption studies

The *in vitro* permeation experiments through porcine skin were performed using Franz-type diffusion cells (Lara-Spiral, Courtenon, France). The porcine skin was excised from the dorsal region of female Landrace large white pigs weighing between 30–40 Kg. The pig skin was provided by the Clínic Hospital of Barcelona, Spain. The bristles were removed carefully with an animal clipper and subsequently the skin was washed with water. The excised skin was dermatomed to a thickness of $500 \pm 50 \mu\text{m}$ (Dermatome GA630, Aesculap, Tuttlingen, Germany). Circular pieces of the dermatomed skin were obtained using an iron punch (2.5 cm of inner diameter) in such a way that they fit into the Franz diffusion cells. The skin discs were stored at $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Before the experiments, the skin discs were thawed and sandwiched securely between the two halves of the Franz cells (diffusion area of 1.86 cm^2) with the SC side facing the donor compartment. The receptor chamber was filled with a receptor fluid containing PBS (pH 7.4) in distilled water, 4% BSA, and 0.04% of gentamicin sulphate.

The receptor phase was kept under constant stirring at $37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ by means of a circulating water bath (Julabo Labortechnik GmbH, Germany) to ensure that the surface skin was maintained at $32 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. The integrity of each skin sample was checked by determining the transepidermal water loss (TEWL) using a Tewameter TM210 (Courage-Khazaka, Köln, Germany). The diffusion experiment was initiated by applying to the entire surface, delimited by the upper cell, $10 \mu\text{L}$ of each of the ethanolic or bicellar solution of FFA and about 4 mg of the commercial product of FFA. The doses applied are based on the OCDE recommendations¹². The permeation experiments were conducted in six replicates over 24 h. After the exposure time, the content of the donor compartment was washed with sodium lauryl ether sulphate and Milli-Q water following usual procedure, and the washing solution was collected. Then,

the receptor fluid was removed from the receptor compartment and brought up to 5 ml in a volumetric flask. Most of the SC of the treated skin area was removed by 8 successive tape-strippings using an adhesive tape (D-Squame[®], CuDerm Inc., Dallas, USA). After that, the viable epidermis was separated from the dermis by heat treatment at 80 °C for a few seconds.

The FFA content in the washing solution and in the different skin layers was extracted with methanol overnight. The different samples extracted and the receptor fluid were filtered through a 0.45 µm Acrodisc filter (Pall Gelman Sciences, Northampton, UK) and analyzed by HPLC as it is described above.

2.2.4. ATR-FTIR spectroscopy

Four circular pieces of dermatomed porcine skin were placed in Franz diffusion cells, as above described. Three of them were treated with 10 µL of FFA ethanolic solution, FFA bicellar systems or about 10mg of FFA commercial product, respectively. The other sample was used as a control (untreated). The skin exposure was done during 24h; after that, the skin was washed with sodium lauryl ether sulphate and Milli-Q water and removed from the diffusion cells.

Infrared spectra of the porcine skin samples were obtained using a 360-FTIR spectrophotometer Nicolet Avatar (Nicolet Instruments, Inc., Madison, WI) equipped with an attenuated total reflection (ATR) accessory that uses a ZnSe crystal with an angle of incidence of 45° in a horizontal orientation.

Before analysis, the skin was placed with the SC facing onto the ZnSe ATR crystal. In order to ensure reproducible contact between the sample and the crystal, a pressure of 10 kPa was applied on the samples. The IR spectra were collected at 25 °C, 32.5 °C and 37 °C. These three temperatures have been chosen because 25 °C is the room

temperature, 32.5 °C is approximately the temperature of the skin surface and 37 °C is the physiological temperature. For a correct equilibration of the temperature, the skin samples were placed in the equipment 30 min before collecting the spectra. The temperature was controlled by a temperature controller integrated in the ATR device and by an external thermostatic jacket.

All spectra analysed represent an average of 256 scans obtained in 7 min with a resolution of 2 cm⁻¹, and the wavenumber range used was 4000-700 cm⁻¹. Peak positions were determined with the aid of OMNIC software version 7.3 (Nicolet, Madison, WI).

2.2.5. Freeze-substitution transmission electron microscopy (FSTEM)

Two porcine skin discs, one as a control and one treated with FFA bicellar systems, were processed as for percutaneous absorption studies. Then, the porcine skin samples were cut into small rectangular pieces with a size of approximately 2 × 1 mm. The pieces were fixed with 5% (w/v) glutaraldehyde buffered with 0.1 M sodium cacodylate (pH 7.2). The postfixation was performed using 0.2% (w/v) of ruthenium tetroxide (RuO₄) in sodium cacodylate buffer (pH 6.8) with 0.25% (w/v) potassium ferrocyanide (K₄Fe (CN)₆) for 1 h. After rinsing in buffer and prior to freeze-substitution, the tissue samples were cryofixed by liquid nitrogen (-196 °C) using a Cryovacublock (Leica, Vienna). The freeze-substitution method was done in an Automatic Freeze Substitution (AFS) system (Leica Microsystems, Vienna, Austria). The freeze-substitution fluid consisted of 1.0% (w/v) osmium tetroxide (OsO₄), 0.5% (w/v) uranyl acetate and 3.0% (w/v) glutaraldehyde in methanol. The tissue samples were cryosubstituted at -90 °C for 48 h. After the substitution period, the temperature was raised to -50 °C and the samples were washed 3 times in 100% methanol. After that, the methanol solution was gradually

replaced by the embedding medium, Lowicryl HM20 (100%). This resin was replaced after 24 and 48 h by freshly prepared embedding medium. Finally, the samples were transferred to a mold containing Lowicryl, and were incubated for 48 h at -50 °C under UVA-radiation, to allow polymerization. Ultrathin sections were prepared on an ultramicrotome (Ultracut UCT, Leica, Vienna, Austria), transferred to Formvar-coated grids and examined in a Hitachi 600 transmission electron microscope.

2.2.6. X-ray scattering measurements

2.2.6.1. Whole dermatomed skin

The SAXS profile of control skin and skin treated with FFA bicellar systems as described in the percutaneous absorption studies section were analysed to characterise the organisation of the collagen of the skin. SAXS measurements were performed using the Spanish beamline (BM16) of the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Grenoble, France) at room temperature. All of these skin samples were cut into pieces sections 1 mm thick with a 10 mm diameter and were placed in the holder with the skin surface perpendicular to the beam. In the holder, skin pieces were sandwiched between two aluminium plates with two holes, allowing the beam to pass directly through the samples. The energy of the beam was 12 keV ($\lambda = 0.9795 \text{ \AA}$). The scattering data were collected with a SAXS 2D detector MARCCD (Marresearch GmbH, Norderstedt, Germany) with an active surface area of 165 mm in diameter²⁴ and a single exposure time of about 60 seconds. The sample-to-detector distance at 5 m (long set-up) was used. Calibration was performed using silver behenate. Spacing was determined from axially integrated 2D images using the FIT2D program (<http://www.esrf.eu/computing/scientific/FIT2D>) from ESRF. The data were normalised with transmitted intensity.

2.2.6.2. Isolated SC

A control skin and a skin treated with FFA bicellar systems for 24h were heated with the SC side in contact with a metal plate for 10 seconds at 80 °C and the epidermis was scraped off in sheets. To isolate the SC, the epidermal sheets were incubated for 2 h at 37 °C with the epidermal side in contact with a solution of 0.5 % Trypsin in PBS at pH 7.4. Trypsin is used to remove adherent cells from epidermis. After the 2h, the Trypsin was removed by several washes of the SC with Milli-Q water.

SAXS measurements of the isolated SC were performed using the same technical specifications as in the case of whole skin but changing the sample-to-detector distance to 1.4 m (short set-up) in order to achieve a q range between 0.2 and 2 nm⁻¹.

The SAXS technique provides information about the larger structural units in the sample, namely, the repeat distance of one structure (collagen for whole dermatomed skin and lipid lamellar structure for isolated SC). The scattering intensity (I , in arbitrary units) was measured as a function of the scattering vector q (in reciprocal nm), whose modulus is defined as:

$$q = (4\pi \sin\theta)/\lambda$$

where θ is the scattering angle and λ the wavelength of the radiation (0.9795 Å). The position of the diffraction peaks is directly related to the repeat distance of the molecular structure, as described by Bragg's law ²⁵:

$$2d \sin\theta = n\lambda$$

in which n and d are the order of the diffraction peak and the repeat distance, respectively. The different orders of peaks are calculated by:

$$q_n = 2\pi n/d$$

where q_n is the scattering vector modulus that indicates the position of the n^{th} order reflection.

2.2.7. Statistical analysis

Percutaneous absorption values are expressed as the mean \pm standard deviation (SD) for six determinations. For group comparisons, analysis of variance (ANOVA) with a one-way layout was applied. The software used was the STATGRAPHICS plus 5. Significant differences in the mean values were evaluated by the Student's unpaired t -test. A p value of less than 0.05 was considered significant. The positions of IR peaks were obtained as the mean values \pm SD of three measurements.

3. Results

Visual inspection of FFA bicellar systems showed differences in the appearance depending on the temperature. At 25 °C the systems exhibited milky appearance, at 32.5 °C this sample was fluid and completely transparent and at 37 °C it became translucent. No precipitates were appreciated in the bicellar systems at any of these temperatures. The pH of the FFA bicellar system was around 5.5, in this sense, bicellar systems are an appropriate vehicle to use in topical applications because under normal conditions, the skin has a pH between 4 and 5.5²⁶.

3.1. In vitro percutaneous studies

HPLC analysis showed that in the three cases the extraction efficiency of FFA from the different skin layers, washing solution and receptor fluid was higher than 97 %. The higher amount of FFA remained on the skin surface after application using all the vehicles. This effect was specially noted in the case of FFA bicellar systems, in which $94.5 \pm 1.7\%$ of the total amount applied was removed as surface excess. FFA in ethanol showed the lower value, $67.2 \pm 4.6\%$, and the commercial product showed an

intermediate value ($83.0 \pm 5.4 \%$), having statistical differences between the three cases. Fig. 1 that the percutaneous absorption profiles of FFA vehiculized in bicellar systems compared with FFA in an ethanolic solution (1%) and with the commercial product. The results are expressed as a percentage of FFA in each compartment investigated in respect to the applied dose on the skin.

It is interesting to note that among all the skin layers, a higher percentage of FFA was detected in the SC for the three formulations. This behaviour was noted especially when the drug was applied in the ethanolic solution ($16.8 \pm 3.1\%$). The minor content of FFA in the SC corresponded to that applied on bicellar systems ($2.5 \pm 0.5\%$). This data denotes a minor SC reservoir when the drug is included in bicellar systems. The SC reservoir is the amount of material in this layer which is available for further absorption¹³. When the commercial product is used, the value of FFA content in SC is in between the two previous cases ($9.8 \pm 1.7\%$).

In the epidermis (E), the tendency is the same as in the SC, having statistically significant differences between all the cases. But, in the dermis (D), the content of FFA for the ethanolic solution is great major than in the other vehicles, detecting not significant differences on the content of FFA in the dermis for bicellar systems and the commercial product. Observing the receptor fluid (RF) results, in the cases of the commercial product and the ethanolic solution, the content of FFA is similar (about 2.6%), but there are significant differences respect to the drug detected in the RF for bicellar systems ($0.9 \pm 0.2\%$) that exhibited a lower value.

The results as global percentage of percutaneous absorption (considering the amount of FFA detected in E, D plus RF) show significant differences in the absorption of FFA when different vehicles are used. Regarding all the skin layers, a major total percutaneous absorption of FFA when the drug is included in ethanol and in the

commercial formulation than when the drug is included in the bicellar systems was detected.

3.2. ATR-FTIR spectroscopy

Attenuated total reflectance-Fourier transform infrared (ATR-FTIR) is a noninvasive spectroscopic technique whereby the sample is placed directly onto an ATR crystal. This technique is useful to investigate the SC without isolation from the other skin layers. This fact is because the depth of penetration of the radiation to the skin is about $1\ \mu\text{m}$ ²⁷. Previous works have presented IR spectra of porcine skin *in vitro*^{19,21,28} in order to report the vibrational characteristic frequencies of the alkyl chain lipids related to differently ordered phases of the SC. In the present work these studies have been focused in order to investigate the effect of the different systems containing FFA on the SC lipids.

The skin control and the skin treated with FFA in the different vehicles were analyzed at 25, 32.5 and 37 °C. The spectra analysis has been focused on bands associated with the alkyl chain of SC lipid vibrations: CH₂ stretching (around 2920 and 2850 cm⁻¹) and CH₂ scissoring (between 1480 and 1460 cm⁻¹).

3.2.1. CH₂ Stretching Region

The methylene stretching vibrations (region between 2800 and 3000 cm⁻¹) provide information on the conformation ordering (e.g., gel or liquid crystalline) of the SC lipid alkyl chains^{19,21}. In our ATR-FTIR spectra and in accordance with other authors^{29,30}, the asymmetric and the symmetric CH₂ stretching vibrations are observed near 2920 and 2850 cm⁻¹, respectively. In all spectra obtained for all the skin samples, both modes were intense and not overlapped by other vibrational modes in this region. Tables 1 and 2 show values obtained for the symmetric and asymmetric stretching modes,

respectively, for the skin control and for the skin treated with FFA in the different vehicles and at the three different temperatures. In general, in the case of CH₂ symmetric stretching a vibrational frequency of 2849 cm⁻¹ indicates an orthorhombic chain conformation, of 2850 cm⁻¹ a hexagonal chain conformation and of 2852 cm⁻¹ a liquid crystalline chain conformation¹⁹. The increase of the vibrational frequency indicates an increase of the disordering. The same occurs with the CH₂ asymmetric stretching, an increase of vibrational frequency denotes a disordering.

Concerning the symmetric mode (Table 1), in the control skin, a small increase of the CH₂ stretching frequency (2850.1 ± 0.6 to 2850.8 ± 0.2 cm⁻¹) is observed when the temperature is increased from 25 to 37 °C. These results are compatible with a hexagonal (HEX) packing lattice with a tendency to an increase of disorder packing in agreement with results published by other authors^{19,28,31,32}. The skin treated with FFA bicellar systems, at 25 °C shows a vibrational band for CH₂ at 2849.2 ± 0.3 cm⁻¹ corresponding to an orthorhombic (OR) phase. This fact indicates a major ordering of the SC lipids in the sample treated with the FFA bicellar systems respect to the control sample. The increase of temperature induces a shift of the CH₂ symmetric stretching frequency to higher values, indicating a transition from OR to HEX phase. At 37 °C the skin treated with FFA bicellar systems are in HEX phase. This fact agrees with the results obtained for Rodriguez et al.²⁸ when DPPC/DHPC bicelles were applied to porcine skin although those systems did not contain FFA.

When the ethanolic solution of FFA is applied on the porcine skin, the CH₂ symmetric stretching frequency remains practically unaltered respect to the control and also with the increase of the temperature (a lower increase from 2850.0 ± 0.2 to 2850.3 ± 0.1 cm⁻¹), corresponding in all cases to an HEX phase^{21,28}. Results obtained for the application of the FFA commercial product show a transition from an OR phase to a HEX phase

with the increase of temperature. This transition was also detected in the case of FFA bicellar systems as above described.

Although the stretching symmetric vibrations of CH₂ are described as more sensitive than the asymmetric vibrations to packing changes³³, these latter are also used in some studies for similar purposes^{19,27}. Table 2 shows the values detected for the CH₂ asymmetric stretching mode. Concerning the skin control, from 25 to 32.5 °C the frequency remains unaltered (from 2920.1 ± 0.5 to 2920.2 ± 0.4 cm⁻¹) but when the temperature is increased until 37 °C a change to higher values of frequency (2922.1 ± 0.5 cm⁻¹) was observed indicating a higher fluidity of the SC lipids at this temperature. In the case of the skin treated with FFA bicellar systems, the CH₂ asymmetric stretching frequency at 25 °C was 2917.1 ± 0.2 cm⁻¹, quite below to that detected in the control skin, indicating that treatment with FFA bicellar systems induces an ordering in the SC lipid lattice. When the temperature is increased at 32.5 °C the frequency is maintained but at 37 °C this value is increased until 2919.9 ± 0.3 cm⁻¹, denoting also an augment of the lipid fluidization when the temperature increases. In the case of the skin treated with FFA ethanolic solution, at 25 °C the value of the frequency was 2917.3 ± 0.5 cm⁻¹, at 32.5 °C the frequency increased until 2918.3 ± 0.2 cm⁻¹ and at 37 °C was maintained. The augment in the disordering is observed when the temperature increases from 25 to 32.5 °C. When the porcine skin was treated with the FFA commercial, also an increase of the disordering is noted when the temperature is changed from 25 °C (2918.5 ± 0.5 cm⁻¹) to 32.5 °C (2920.1 ± 0.7 cm⁻¹) and, at 37 °C the increase is slightly smaller (2920.3 ± 0.8 cm⁻¹).

Summarizing, respect to the control, FFA bicellar systems and FFA commercial product induce an ordering of the SC lipids, this fact is noted in both the symmetric and the asymmetric stretching vibrations. When FFA is applied with the ethanolic solution,

the symmetric stretching band indicates no alteration of the ordering of the SC lipids respect to the control and the increase of temperature. A shift of the asymmetric stretching band in the ethanolic treatment is observed, indicating an ordering of the SC lipids at all the temperatures respect to the skin control.

3.2.2. CH_2 Scissoring Region

The scissoring vibrations provide information on the lateral packing properties of the SC lipids. A single methylene band at $\sim 1468\text{ cm}^{-1}$ represents HEX acyl chain packing of the lipids whereas OR chain packing is indicated by two components at $\sim 1472\text{ cm}^{-1}$ and $\sim 1464\text{ cm}^{-1}$ ³⁴. In the range of the CH_2 scissoring region ($1480\text{-}1460\text{ cm}^{-1}$), also occur the CH_3 bending modes which are associated mostly to the skin keratins²¹. Since the scissoring region range is very quite small, this region has been enlarged to facilitate the analysis of the significant peaks (Fig. 2). In order to help in the identification of the peaks, Gaussian deconvolution and curve fitting procedure were used. In Fig. 2, the curve fitting and the Gaussian bands of the scissoring region of the control skin and skins treated with FFA bicellar systems, FFA ethanolic solution and the commercial product, at $37\text{ }^\circ\text{C}$, are shown. At the other temperatures studied, similar bands are obtained as at $37\text{ }^\circ\text{C}$.

The curve fitting of the control sample at $37\text{ }^\circ\text{C}$, Fig. 2A, indicated two Gaussian bands at 1467.5 and 1471.0 cm^{-1} . The vibrational band centred at 1467.5 cm^{-1} is compatible with HEX lipid organization and that detected at 1471.0 cm^{-1} is compatible with a distorted OR packing, corresponding to one of the bands of the characteristic OR symmetry split. Fitting curve for skin treated with FFA bicellar systems (Fig. 2B) showed three Gaussian bands centred at 1462.6 , 1468.3 and 1471.4 cm^{-1} , respectively. The bands centred at 1462.6 and 1471.4 cm^{-1} , could correspond to the split

characteristic of OR packing and the vibrational band at around 1468 cm^{-1} is characteristic to an HEX phase. In the case of the skin treated with FFA ethanolic solution (Fig. 2C), two bands centred at 1465.7 and 1471.5 cm^{-1} can be observed. The band at around 1466 cm^{-1} could be due to a shift of the HEX packing band and the vibration at 1471.5 cm^{-1} could correspond to one of the vibrations characteristics of the split of the OR packing. In Fig. 2D Gaussian bands in the scissoring range of the skin treated with the commercial product are observed. In this figure three vibrational bands centred at 1462.1 , 1468.2 and 1471.0 cm^{-1} are shown. As in the other cases, the band centred at around 1468 cm^{-1} is characteristic of an HEX lattice. The other two bands could correspond to a splitting characteristic of an OR packing or could be due to the CH_3 bending modes.

3.3. FSTEM

In order to evaluate the effect of FFA bicellar systems on the microstructure of SC, visualization of the native tissue and the skin treated with FFA bicellar systems was performed and micrographs are shown in Fig. 3 and 4, respectively. Fig. 3A depicts an overview of the SC where skin corneocytes (C), flattened cells characterized by the absence of nucleus or cytoplasmic organelles and the presence of keratin filaments, are clearly visualized. Also, in the intercellular spaces, lipid bilayers (L) and corneodesmosomes (CD), which are SC desmosomes representing the contact areas between adjacent corneocytes, are shown. In Fig. 3B, an enhanced micrograph of the intercellular lipids is shown. In the intercellular space, lipids (L) are observed as regularly packed multilayered structures. Micrographs from Fig. 4 show SC from skin treated with FFA bicellar systems. Fig. 4A depicts an overview whereas in Fig. 4B a detailed intercellular space is shown. In a similar way that control skin, Fig. 4 show skin corneocytes (C), corneodesmosomes (CD) and, in the intercellular spaces, the lipid

lamellae (L) were also clearly visualized. No differences were observed in the different areas of SC after treatment with FFA bicellar systems in comparison to native tissue. This fact indicates that the treatment with these systems did not induce apparent microstructural changes in the SC organization.

3.4. X-ray scattering results

Dermatomed whole skin

Fig. 5 shows the 1D scattering patterns from control skin and skin treated with FFA bicellar systems resulting from the average of several images after integration with FIT2D software. The dermatomed skin samples used has a dermis thickness of about 400 μm . The profiles of both samples show the characteristic peaks of the typical scattering pattern of collagen. In both cases, the characteristic peak centred at $q \approx 0.1 \text{ nm}^{-1}$ corresponding to a d-spacing around 63 nm associated to the axial periodicity of collagen²² (marked region) and their reflections are clearly visualized. The typical axial periodicity of collagen is the result of the displacement of each molecule with respect to the adjacent molecules in a particular direction²².

At low q , differences in the intensity between both samples can be observed. In Fig. 6, a magnification of the SAXS profiles at low q (grey area in Fig. 5) has been plotted in order to elucidate these differences.

Fig. 6 shows the experimental (squared) and fitted (continuous line) curves of the SAXS profile of the control skin (A) and the skin treated with FFA bicellar systems (B), at low q . Differences in intensity and number of bands between these two samples are observed. The curves were fitting to two (control skin) or three (skin treated) Gaussian bands (discontinuous lines) using the Origin software. The resulting bands for control skin were centred at q around 0.055 and 0.099 nm^{-1} corresponding to a d-spacing around 114, and 63 nm. For treated skin, the resulting bands were centred at q around 0.054,

0.075 and 0.098 nm⁻¹ corresponding to spacings of around 116, 84, and 64 nm. Mérioux C. and co-workers³⁵ found the same spacings in the study of the skin, which were associated with the axial (65 nm), the lateral packing of collagen fibrils (115 nm), and the scattering from the cylindrical shape of the fibrils (85 nm) in skin collagen. Thus, reflexions detected in our experiments are probably associated to the organization of skin collagen. Modification in the collagen scattering pattern after treatment with the bicellar system including FFA is indicative of the ability of the system to reach the dermis in which collagen is located. Differences between scattering patterns in both samples could be attributed to an effect of the anti-inflammatory molecules on the collagen arrangement.

Isolated SC

Fig. 7 shows the SAXS pattern of SC in the control skin and the skin treated with FFA bicellar systems. The pattern of the control skin shows a band centred at a q around 1.05 nm⁻¹ corresponding to a d value around 6 nm. This d -spacing is associated to the lamellar arrangement of the lipids. When the skin is treated with the FFA bicellar systems, a shift of the position to lower q (around 0.87 nm⁻¹) corresponding to a d value of about 7.2 nm and an increase of the intensity are observed. Also, a small shoulder centred at a q about 1.26 nm⁻¹ ($d \approx 5$ nm) appears. It can be deduced that the treatment with FFA bicellar systems induces some ordering in the SC lipid structure.

4. Discussion

Bicellar systems containing FFA have been widely characterized in a previous work¹⁸. These lipid systems allow the inclusion of the lipophilic drug FFA without using organic solvents and, have demonstrated to exhibit an interesting morphological versatility. Due to these facts and considering that similar bicellar systems have been evaluated for skin applications⁵, the present work proposes to study the potential of

bicellar systems as drug delivery strategy through the skin without damaging the tissue. Discussion of the results is carried out from two different viewpoints: the effect of the bicellar system as retarder of the drug absorption and the effect of the bicellar system on the skin structure and functionality.

4.1. Bicellar systems as retarder of FFA percutaneous absorption

The results obtained in the percutaneous absorption studies of FFA in the different vehicles regarding all the skin layers show the lowest value when the drug is included in bicellar system and the highest when FFA is dissolved in ethanol.

The high percutaneous absorption values obtained for the ethanolic solution are probably related to the well known penetration enhancer effect of this solvent³⁶. Merle et al.³⁷ reported a reduction of the SC thickness associated to a solubilisation of the SC lipids by effect of ethanol. These effects on the SC could potentiate the permeability of the tissue. An enhancement in the permeability is associated in most cases to a fluidification of SC lipids that involves higher movement of the lipid alkyl chains in these areas³⁸. However, this fact does not seem to occur in samples treated with FFA ethanolic solution considering ATR-FTIR results. The position of the symmetric and asymmetric stretching bands of skin lipids after treatment with FFA ethanolic solution showed a slight ordering rather than the expected disordering of the intercellular lipid alkyl chains respect to the skin control. These results are in accordance with a previous work of Bommannan et al.³⁹ which indicates that while ethanol extracts appreciable amounts of lipids from the SC, it does not appear to induce lipid disorder. Our FTIR scissoring results, indicate a shift of the characteristic HEX peak to lower values, this fact could be associated with the extraction of some of the SC lipids. The change in the lipid composition would induce a certain disturbance in the SC barrier function that it is evidenced in our results as an increase of the skin permeability. The band that remains

at 1465.7 cm^{-1} could be related to the ceramides more resistant to the ethanol extraction³⁷. The results obtained corroborate that lipid extraction rather than disruption of lipid order, may be the predominant mechanism of ethanol as enhancer. Another possible complementary explanation was suggested by Lewis et al.⁴⁰. This group indicated that the apparent ordering produced by ethanol treatment is due to an interdigitation effect of the lipid hydrocarbon chains by displacement of bound water molecules at the lipid headgroup/membrane interface region.

The percutaneous absorption of FFA included in the commercial product was lower than the percutaneous absorption when the drug was included in the ethanolic solution, although higher than in the case of FFA in bicellar systems. This is probably due to the composition of the commercial product that, apart from FFA, consists in 2% of salicylic acid. This compound is a keratolytic molecule able to alter the barrier properties of the skin and provokes a desquamation of corneocytes that reduces the SC barrier function⁴¹⁻⁴³. Therefore, it could enhance the permeability of the SC. The ATR-FTIR results showed an ordering of the SC lipids respect to the control when the commercial product is applied. This apparent ordering could be due to alcoholic excipients of the commercial product, such as isopropanol and polypropylene glycol, that could extract part of the SC lipids and could induce similar effects on ATR-FTIR bands, as ethanol.

When FFA is included in bicellar systems and is applied on the skin, the total percutaneous absorption results indicate the lowest absorption respect to the treatments with the other two vehicles. These results suggest a retarder effect of the percutaneous absorption when the drug is included in bicellar systems. The concept of retarder was described by Schaefer and co-workers¹³ and it is associated to agents which reduce the percutaneous absorption of compounds through augmentation of skin barrier function. Possibly, lipids from bicelles interact with the SC lipids modifying the organization of

the lipids bilayers and increasing the SC barrier function. This effect was also described by some authors for certain compounds such as some iminosulfurane analogs^{44,45} and laurocapram analog N0915^{45,46}. The phospholipid dimyristoyl phosphatidylcholine (DMPC) was also described as retarder of the percutaneous absorption of the drug flurbiprofen in comparison to other compounds such as unsaturated fatty acids and cyclic monoterpenes able to work as enhancers⁴⁷. In that paper, the retarder effect of DMPC was associated to the gel-liquid phase transition temperature (T_m) 23 °C, of this phospholipid, higher than that described for the other molecules used in the study. In the case of FFA bicellar systems, the T_m studied by DSC in a previous work was higher (38.9 °C)¹⁸ than the described for DMPC. This fact involves that at the experimental temperature the system applied is in the gel state. It is well known that gel-state phospholipids do not affect, or even increase, the skin lipid barrier^{47,48}, resulting in our case, in a reduction of the drug permeation. The retarder effect of FFA bicellar systems is in accordance with the results obtained by our group⁵ in which diclofenac diethylamine was included in DPPC/DHPC bicellar systems. In that case the same retarder effect was observed. This behaviour could be useful in the topical application of drugs that exhibit too fast percutaneous absorption rates, as it is the case of fentanyl, to prevent an overdose of the drug⁴⁹, or the vehiculization of cosmetic ingredients that should not penetrate in a great extend or in dermatological formulations to be applied on skin with the barrier function impaired because could prevent the penetration to the systemic level. This last topic is being currently studied in our laboratory.

4.2. FFA bicellar systems did not disturb the SC lipid organization

Images of SC from control and treated FFA bicellar systems showed similar microstructures comparable to those published previously by other authors for native skin^{50,51}. The well organized lamellar lipid structure in both samples indicates that no

structural modifications in the SC were induced by the FFA bicellar system treatment. The effect of different bicellar systems on the SC microstructure has been previously studied by our group. We reported that DMPC/DHPC bicelles did not promoted changes in the organization of the SC lipid lamellae^{52,53} whereas DPPC/DHPC bicelles induced formation of vesicles in the lipid areas^{51,53}. This different behaviour may be understood regarding the T_m associated to the long alkyl chain phospholipids of each system (23 °C for DMPC and 41 °C for DPPC). Another factor to be considered is the ability of bicellar system to increase their size as the water content in the system increases⁶. When DMPC/DHPC bicelles are applied on the skin at physiological temperature (37 °C) this system suffers a phase transition from gel to liquid crystalline state. This change induces an increase in the size of the bicellar structures that hinders the pass of bicelles through the SC. In the case of DPPC/DHPC system, with higher T_m , the contact with the skin at 37 °C does not promote the phase transition and no modification of the size occurs allowing that these systems penetrate through the SC. According to our experience, inside the skin these bicelles grow as a consequence of a dilution caused by the water located into the skin⁶. In the present work, although FFA bicellar systems are composed by DPPC and DHPC no changes in the SC lipid areas were detected. This is due to the fact that when DPPC/DHPC includes FFA, the size of the nanostructures and phase behaviour of the system is modified. The new bicellar system with FFA forms larger aggregates than those detected in the system without FFA¹⁸. This could hinder the pass through the SC and, as a consequence, no new lipid structures are visualized in the SC after treatment, as our FSTEM micrographs showed.

In spite of the absence of new lamellar or vesicular structures after treatment with bicellar systems containing FFA, a certain effect was detected in the lipid organization of this sample. Thus, a partial diffusion of lipids and of FFA from bicellar systems into

the SC could be assumed. ATR-FTIR and SAXS results showed an ordering of the SC lipids respect to the control that agrees with the retarder effect in the permeability described above. This increase in the order the SC lipids could be induced by the inclusion of DPPC from the bicellar system into the lipid bilayers of the tissue. This phospholipid in a gel ordered phase at the experimental temperature could promote an additional order in the lamellar SC structure²⁸. SAXS experiments performed in SC samples (control and treated with FFA bicellar systems) showed an increase of the d-spacing corresponding to the short periodicity phase (SPP) of the SC lamellar phases reported by Bouwstra et al.⁵⁴. The d-spacing is the sum of the lipid bilayer thickness and the thickness of one adjacent interlamellar water layer⁵⁵. For this reason, the increase of the d-spacing when the SC is treated with FFA bicellar systems could be promoted by the incorporation of water on lamellae, or incorporation of lipids in gel phase. This fact corroborates the interaction of bicelles with SC lipids. The higher intensity of the SPP band in the case of the SC treated respect to the control indicates an increase of the ordering of the SC lipid structure. In any case, no extraction of SC lipids should be expected after treatment with the bicellar systems; on the contrary, an enrichment of these areas could be envisaged by effect of the treatment and, considering results from percutaneous absorption, also a reinforcement of the SC barrier function.

Our results indicate that using bicellar systems is possible to introduce small amounts of an anti-inflammatory drug in the skin without disturb the tissue. It has been documented that skin barrier disruption causes chronic inflammation¹⁶. Because of this, it becomes crucial to adjust treatment and prevention strategies for reversing and preventing skin barrier disruption. In this sense, the use of anti-inflammatory drugs should be linked to the use of vehicles able to avoid skin damage. Results presented in this work should stimulate to skin care providers to be more focussed on optimizing the

SC barrier function to prevent and reverse the skin damage, which is cause and effect of chronic inflammation. The use of bicellar systems as vehicle, in spite of reducing the amount of anti-inflammatory drug absorbed, could be more effective on treatment of skin inflammation by improving skin structure and functionality. Future in vivo research studies are open to explore the potential of this strategy.

5. Conclusions

Ethanol as vehicle and salicylic acid contained in the commercial product alter the skin barrier function in different ways, as lipid solubilising or as keratolytic agent, respectively. Instead, bicellar systems did not disturb the SC barrier function but seems to prevent and reinforce skin microstructure and functionality. The results of our work may be useful to develop bicellar systems as an alternative vehicle for drugs that need to be solubilised by organic solvents and that have a too fast percutaneous absorption. These drugs could be applied on the skin without the danger of potential toxicity and of delirious effects on the skin structure.

Acknowledgements

The authors acknowledge Ministerio de Educación y Ciencia, Spain (CTQ2010-16964), and Generalitat de Catalunya (2009 SGR 1212). This work was supported by the European Social Fund (Programa Nacional de Potenciación de Recursos Humanos del Plan Nacional de I+D+I (2004-2008)). Mercedes Cócera is funded by the JAE-Doc Program from CSIC (co-funded by FSE). Additionally, the authors wish to thank Elisenda Coll for her expert assistance with the techniques used in this work.

References

- (1) Sanders, C. R.; Prosser, R. S. *Structure* **1998**, *6*, 1227.
- (2) Seddon, A. M.; Curnow, P.; Booth, P. J. *Biochim Biophys Acta* **2004**, *1666*, 105.
- (3) Sanders, C. R.; Schwonek, J. P. *Biochemistry* **1992**, *31*, 8898.
- (4) Vold, R. R.; Prosser, R. S. *J Magn Reson, Ser B* **1996**, *113*, 267.
- (5) Rubio, L.; Alonso, C.; Rodríguez, G.; Barbosa-Barros, L.; Coderch, L.; De la Maza, A.; Parra, J. L.; López, O. *Int J Pharm* **2010**, *386*, 108.
- (6) Barbosa-Barros, L.; de la Maza, A.; Estelrich, J.; Linares, A. M.; Feliz, M.; Walther, P.; Pons, R.; Lopez, O. *Langmuir* **2008**, *24*, 5700.
- (7) Barbosa-Barros, L.; De la Maza, A.; Walther, P.; Estelrich, J.; Lopez, O. *J Microsc* **2008**, *230*, 16.
- (8) Thomas, B. J.; Finnin, B. C. *Drug Discov Today* **2004**, *9*, 697.
- (9) Prausnitz, M. R.; Mitragotri, S.; Langer, R. *Nat Rev Drug Discov* **2004**, *3*, 115.
- (10) Bal, S. M.; Ding, Z.; van Riet, E.; Jiskoot, W.; Bouwstra, J. A. *J Control Release* **2010**, *148*, 266.
- (11) Elias, P. M.; Feingold, K. R. *Skin barrier*; Taylor and Francis group: New york, 2006.

- (12) OECD. Guideline 428: Skin Absorption: In Vitro Method. In *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*; Development, O. f. E. C. a., Ed. Paris, 2004; pp 8.
- (13) Schaefer, H.; Redermeier, T. E. *Skin Barrier—Principles of Percutaneous absorption*; Karger-Verlag: Basel, 1996.
- (14) Gwak, H. S.; Chun, I. K. *Int J Pharm* **2002**, *236*, 57.
- (15) Wagner, H.; Kostka, K. H.; Adelhardt, W.; Schaefer, U. F. *Eur J Pharm Biopharm* **2004**, *58*, 121.
- (16) Rahman, S.; Collins, M.; Williams, C. M.; Ma, H. L. *Inflamm Allergy Drug Targets* **2011**, *10*, 486.
- (17) Schacke, H.; Docke, W. D.; Asadullah, K. *Pharmacol Ther* **2002**, *96*, 23.
- (18) Rubio, L.; Rodríguez, G.; Alonso, C.; López-Iglesias, C.; Cócera, M.; Coderch, L.; De la Maza, A.; Parra, J. L.; López, O. *Soft Matter* **2011**, *7*, 8488.
- (19) Rodríguez, G.; Barbosa-Barros, L.; Rubio, L.; Cócera, M.; Díez, A.; Estelrich, J.; Pons, R.; Caelles, J.; De la Maza, A.; López, O. *Langmuir* **2009**, *25*, 10595.
- (20) Obata, Y.; Utsumi, S.; Watanabe, H.; Suda, M.; Tokudome, Y.; Otsuka, M.; Takayama, K. *Int J Pharm* **2010**, *389*, 18.
- (21) Boncheva, M.; Damien, F.; Normand, V. *Biochim Biophys Acta* **2008**, *1778*, 1344.

- (22) Cócera, M.; Rodríguez, G.; Rubio, L.; Barbosa-Barros, L.; Benseny-Cases, N.; Cladera, J.; Sabes, M.; Fauth, F.; de la Maza, A.; López, O. *Soft Matter* **2011**, *7*, 8605.
- (23) Van den Bergh, B. A.; Swartzendruber, D. C.; Bos-Van der Geest, A.; Hoogstraate, J. J.; Schrijvers, A. H.; Boddé, H. E.; Junginger, H. E.; Bouwstra, J. A. *J Microsc* **1997**, *187 (Pt 2)*, 125.
- (24) Rueda, D. R.; García-Gutiérrez, M. C.; Nogales, A.; Capitán, M. J.; Ezquerro, T. A.; Labrador, A.; Fraga, E.; Beltrán, D.; Juanhuix, J.; Herranz, J. F.; Bordas, J. *Rev Sci Instrum* **2006**, *77*, 033904.1.
- (25) Bragg, W. L. "The Diffraction of Short Electromagnetic Waves by a Crystal"; Proceedings of the Cambridge Philosophical Society, 1913.
- (26) Parra, J. L.; Paye, M. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* **2003**, *16*, 188.
- (27) Coderch, L.; de Pera, M.; Perez-Cullell, N.; Estelrich, J.; de la Maza, A.; Parra, J. L. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* **1999**, *12*, 235.
- (28) Rodriguez, G.; Rubio, L.; Cocera, M.; Estelrich, J.; Pons, R.; de la Maza, A.; Lopez, O. *Langmuir* **2010**, *26*, 10578.
- (29) Gooris, G. S.; Bouwstra, J. A. *Biophys J* **2007**, *92*, 2785.
- (30) Prash, T.; Knubel, G.; Schmidt-Fonk, K.; Ortanderl, S.; Nieveler, S.; Forster, T. *Int J Cosmet Sci* **2000**, *22*, 371.
- (31) Furuishi, T.; Fukami, T.; Suzuki, T.; Takayama, K.; Tomono, K. *Biol Pharm Bull* **2010**, *33*, 294.

- (32) Pensack, R. D.; Michniak, B. B.; Moore, D. J.; Mendelsohn, R. *Appl Spectrosc* **2006**, *60*, 1399.
- (33) Mendelsohn, R.; Flach, C. R.; Moore, D. J. *Biochim Biophys Acta* **2006**, *1758*, 923.
- (34) Kaushik, D.; Michniak-Kohn, B. *AAPS PharmSciTech* **2010**, *11*, 1068.
- (35) Mériçoux, C.; Durand, D.; Doucet, J.; Eugène, M.; Diat, O. *Newsletter ESRF* **1997**, *July*, 18.
- (36) Thong, H. Y.; Zhai, H.; Maibach, H. I. *Skin Pharmacol Physiol* **2007**, *20*, 272.
- (37) Merle, C.; Baillet-Guffroy, A. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2009**, *1788*, 1092.
- (38) Williams, A. C.; Barry, B. W. Chemical Permeation Enhancement. In *Enhancement in Drug Delivery*; Touitou, E., Barry, B. W., Eds.; CRC Press, 2006.
- (39) Bommannan, D.; Potts, R. O.; Guy, R. H. *Journal of Controlled Release* **1991**, *16*, 299.
- (40) Lewis, E. N.; Levin, I. W.; Steer, C. J. *Biochim Biophys Acta* **1989**, *986*, 161.
- (41) Lebwohl, M. *Int J Dermatol* **1999**, *38*, 16.
- (42) Dias, M.; Hadgraft, J.; Lane, M. E. *Int J Pharm* **2007**, *340*, 65.
- (43) Bashir, S. J.; Dreher, F.; Chew, A. L.; Zhai, H.; Levin, C.; Stern, R.; Maibach, H. I. *Int J Pharm* **2005**, *292*, 187.

- (44) Kim, N.; El-Khalili, M.; Henary, M. M.; Strekowski, L.; Michniak, B. B. *Int J Pharm* **1999**, *187*, 219.
- (45) Asbill, C. S.; Michniak, B. B. *PSTT* **2000**, *3*, 36.
- (46) Hadgraft, J.; Peck, J.; D.G., W.; Pugh, W. J.; Allan, G. *Int. J. Pharm.* **1996**, *141* 17.
- (47) Fang, J. Y.; Hwang, T. L.; Leu, Y. L. *Int J Pharm* **2003**, *250*, 313.
- (48) Kirjavainen, M.; Monkkonen, J.; Saukkosaari, M.; Valjakka-Koskela, R.; Kiesvaara, J.; Urtti, A. *J Control Release* **1999**, *58*, 207.
- (49) Frolich, M. A.; Giannotti, A.; Modell, J. H. *Anesth Analg* **2001**, *93*, 647.
- (50) López, O.; Cócera, M.; Walther, P.; Wehrli, E.; Coderch, L.; Parra, J. L.; de la Maza, A. *Micron* **2001**, *32*, 201.
- (51) Rodríguez, G.; Barbosa-Barros, L.; Rubio, L.; Cócera, M.; López-Iglesias, C.; de la Maza, A.; López, O. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2011**, *84*, 390.
- (52) Barbosa-Barros, L.; Barba, C.; Cocera, M.; Coderch, L.; Lopez-Iglesias, C.; de la Maza, A.; Lopez, O. *Int J Pharm* **2008**, *352*, 263.
- (53) Barbosa-Barros, L.; Barba, C.; Rodriguez, G.; Cocera, M.; Coderch, L.; Lopez-Iglesias, C.; de la Maza, A.; Lopez, O. *Mol Pharm* **2009**, *6*, 1237.
- (54) Bouwstra, J. A.; Gooris, G. S.; van der Spek, J. A.; Bras, W. *J Invest Dermatol* **1991**, *97*, 1005.
- (55) de Jager, M. W.; Gooris, G. S.; Ponec, M.; Bouwstra, J. A. *J Lipid Res* **2005**, *46*, 2649.

Table 1. ATR-FTIR values for the symmetric stretching modes. The results are obtained for the skin control and the FFA vehiculized in bicellar systems, ethanol and the commercial product.

Temperature (°C)	Symmetric stretching band (cm ⁻¹) ^a			
	Skin control	Skin + Bice FFA	Skin + FFA (EtOH)	Skin + FFA commerc.
25	2850.1 ± 0.6	2849.2 ± 0.3	2850.0 ± 0.2	2849.3 ± 0.2
32.5	2850.6 ± 0.0	2849.8 ± 0.2	2850.2 ± 0.8	2849.9 ± 0.0
37	2850.8 ± 0.2	2850.5 ± 0.9	2850.3 ± 0.1	2850.2 ± 0.2

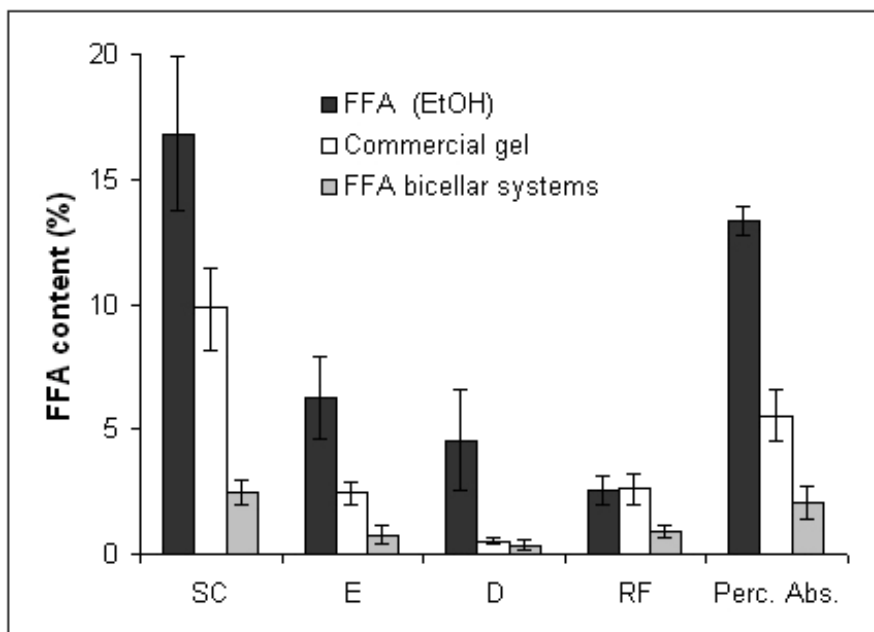
^a Values represents the mean ± S.D. of three measurements.

Table 2. ATR-FTIR values for the asymmetric stretching modes. The results are obtained for the skin control and the FFA vehiculized in bicellar systems, ethanol and the commercial product.

Temperature (°C)	Asymmetric stretching band (cm ⁻¹) ^a			
	Skin control	Skin + Bice FFA	Skin + FFA (EtOH)	Skin + FFA commerc.
25	2920.1 ± 0.5	2917.1 ± 0.2	2917.3 ± 0.5	2918.5 ± 0.5
32.5	2920.2 ± 0.4	2917.0 ± 0.8	2918.3 ± 0.2	2920.1 ± 0.7
37	2922.1 ± 1.4	2919.9 ± 0.3	2918.2 ± 0.3	2920.3 ± 0.8

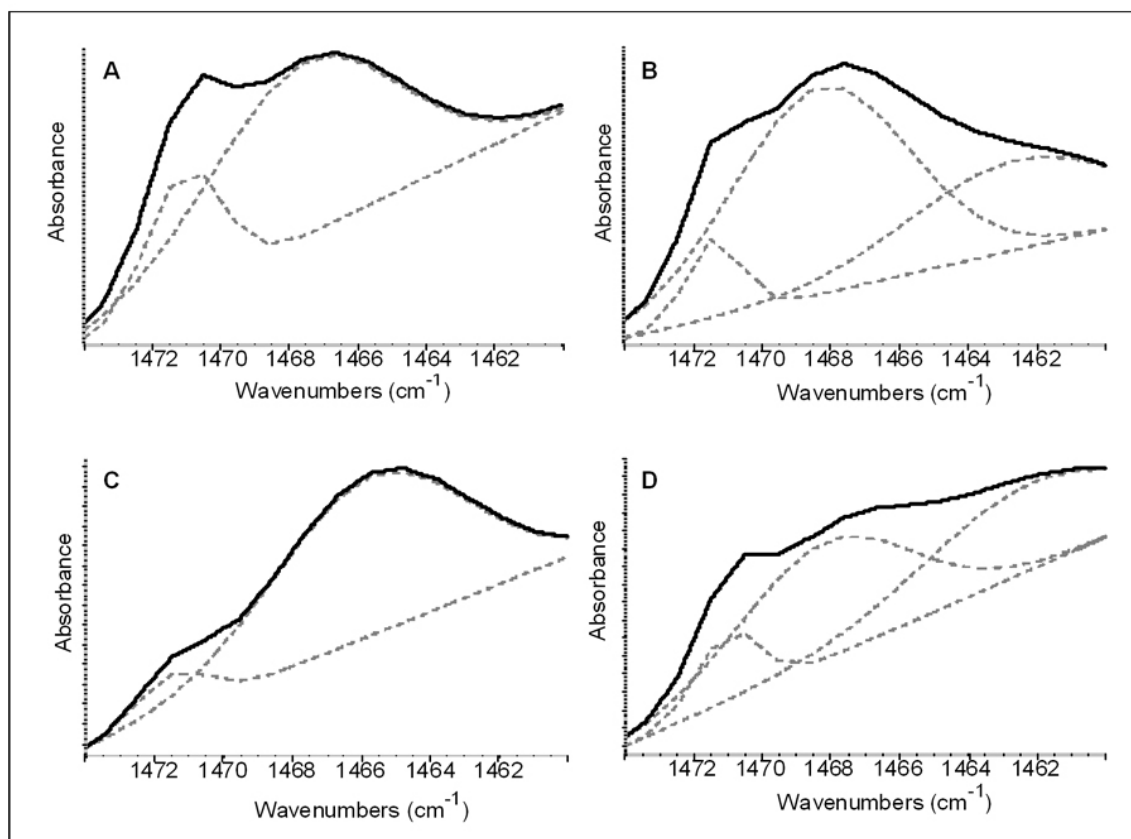
^a Values represents the mean ± S.D. of three measurements.

FIGURE 1



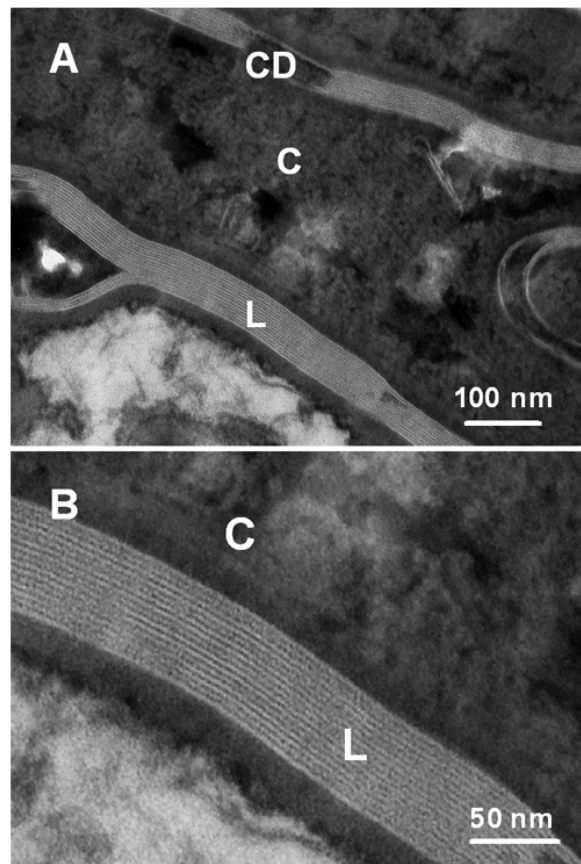
Distribution of FFA content after 24h. Amounts detected in the stratum corneum (SC), epidermis (E), dermis (D), receptor fluid (RF) and the total percutaneous absorption (Perc. Abs.). Bars are the % of applied dose (mean of $n = 6$) and the errors bars are the standard deviations (S.D.).

FIGURE 2



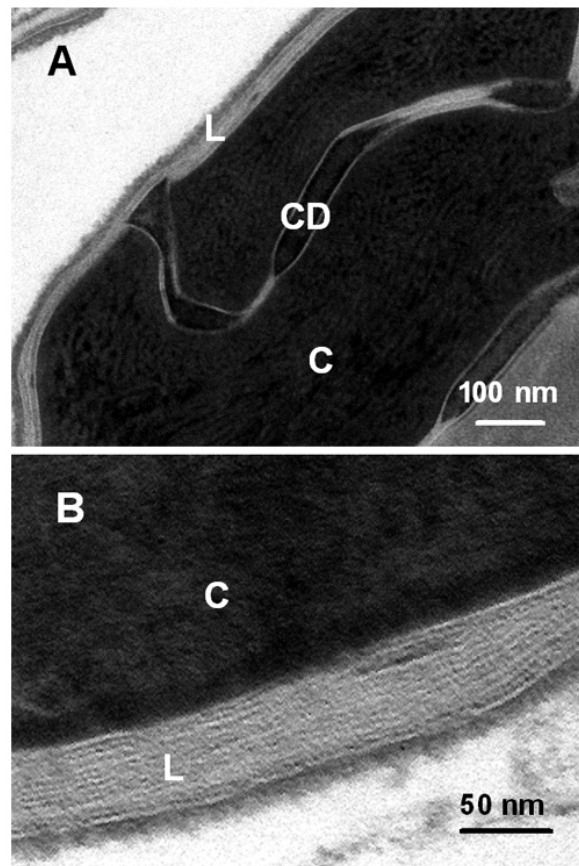
Individual curve-fitting Gaussian bands (dashed lines) and the result sum are represented as solid in the CH₂ scissoring range at 37°C. The curves correspond to control skin (A), skin treated with FFA bicellar systems (B), FFA ethanolic solution (C) and FFA commercial product (D).

FIGURE 3



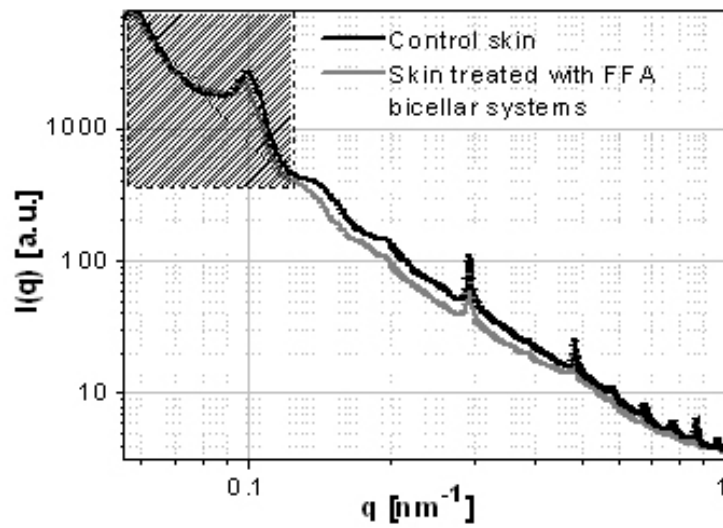
FSTEM micrographs of SC from control skin. Picture A: Overview of the SC. Picture B: Detailed micrograph of the lamellar structure. Symbols: corneocytes (C), corneodesmosomes (CD) and lipids (L).

FIGURE 4



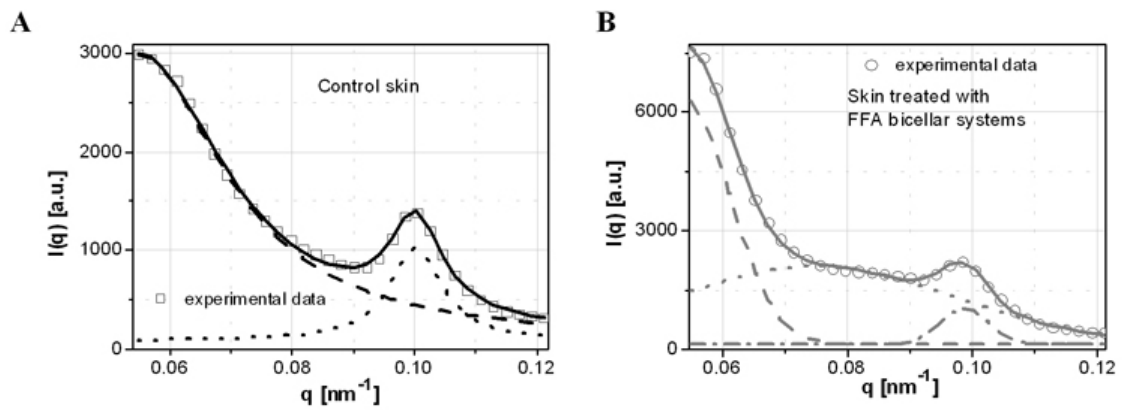
FSTEM micrographs of SC from skin treated with FFA bicellar systems. Picture A: Overview of the SC. Picture B: Detailed micrograph of the lamellar structure. Symbols: corneocytes (C), corneodesmosomes (CD) and lipids (L).

FIGURE 5



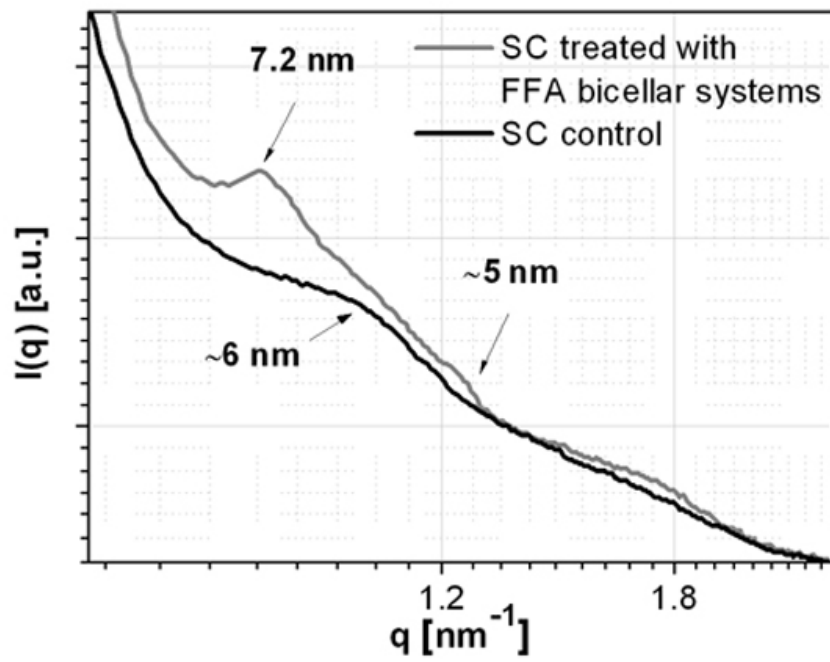
SAXS intensity profile as a function of the scattering vector modulus q of control skin and skin treated with FFA bicellar systems plotted as scattering intensity.

FIGURE 6



Curve fitting analysis of the SAXS profile at low q of the control skin (A) and skin treated with FFA bicellar systems (B).

FIGURE 7



SAXS profile at high q of the SC of control skin and skin treated with FFA bicellar systems.

Article 4

Bicellar systems as a new colloidal delivery strategy for skin

Colloid Surf B- Biointerfaces, 2012, 92, 322– 326.

Aquest treball avalua l'ús dels sistemes bicel·lars com a nous vectors per a l'alliberament controlat de compostos a través de la pell. Es van introduir dos principis actius diferents en els sistemes bicel·lars: un compost amfifílic com és el cas del DDEA i un compost lipofílic com el FFA.

Primerament, es va dur a terme la caracterització dels dos sistemes bicel·lars mitjançant DLS i Cryo-TEM. A continuació, es van fer estudis d'absorció percutània *in vitro* de les formulacions antiinflamatòries amb pell de porc.

La caracterització dels sistemes bicel·lars va mostrar que la mida de la partícula disminueix quan s'encapsula DDEA i augmenta quan FFA és inclòs en els sistemes de bicel·lars. Els estudis d'absorció percutània van demostrar menys penetració de DDEA i FFA a través de la pell quan els fàrmacs es van incloure en els sistemes bicel·lars que quan els fàrmacs es van aplicar en una solució aquosa, en el cas del DDEA, i en una solució etanòlica, en el cas del FFA. La reducció de la penetració cutànica va ser més pronunciada amb el FFA.

S'ha demostrat que els sistemes bicel·lars poden incloure tant compostos amfifílics com lipofílics i aquesta inclusió promou un efecte retardant de l'absorció percutània. Aquest efecte pot ser una estratègia prometedora per al lliurament de fàrmacs tòpicament sense ocasionar efectes tòxics sistèmics o per a aplicacions cosmètiques en les quals no es recomana la penetració dels compostos aplicats sobre la pell.



Bicellar systems as a new colloidal delivery strategy for skin

L. Rubio, G. Rodríguez, L. Barbosa-Barros, C. Alonso, M. Cócera, A. de la Maza, J.L. Parra, O. López*

Departament de Tecnologia Química i de Tensioactius, Institut de Química Avançada de Catalunya (I.Q.A.C.), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (C.S.I.C.), C/Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 July 2011

Received in revised form 7 October 2011

Accepted 6 December 2011

Available online 14 December 2011

Keywords:

Bicellar systems

In vitro percutaneous absorption

Diclofenac

Flufenamic acid

Dipalmitoyl-glycero-phosphatidylcholine

Dimyristoyl-glycero-phosphatidylcholine

Dihexanoyl-glycero-phosphatidylcholine

Cryo-transmission electron microscopy

ABSTRACT

The presented work evaluates the use of bicellar systems as new delivery vectors for controlled release of compounds through the skin. Two different active principles were introduced into the bicellar systems: diclofenac diethylamine (DDEA) and flufenamic acid (Ffa). Bicellar systems are discoidal aggregates formed by long and short alkyl chain phospholipids. Characterization of the bicellar systems by dynamic light scattering (DLS) and cryogenic transmission electron microscopy (Cryo-TEM) showed that particle size decreased when DDEA was encapsulated and increased when Ffa was included in the bicellar systems. Percutaneous absorption studies demonstrated a lower penetration of DDEA and Ffa through the skin when the drugs were included in the bicellar systems than when the drugs were applied in an aqueous solution (DDEA) and in an ethanolic solution (Ffa); the reduction in penetration was more pronounced with Ffa. These bicellar systems may have retardant effects on percutaneous absorption, which result in a promising strategy for future drug or cosmetic delivery applications.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Over the past few decades, there has been interest in exploring new techniques to modulate drug absorption through the skin [1–3]. These investigations into skin delivery highlight the need to obtain vehicles of appropriate sizes, high stability and biocompatibility. Bicelles are bilayered aggregates with a discoidal shape composed of long- and short-chain phospholipids. The long-chain lipids commonly used for bicelle formation are dimyristoyl and dipalmitoyl phosphatidylcholine (DMPC and DPPC), and the short-chain lipid most frequently used is dihexanoyl phosphatidylcholine (DHPC) [4]. The long-chain phospholipids of bicelles form a bilayer section that is surrounded by a rim of short-chain phospholipids (DHPC). These nanostructures are between 10 and 30 nm in diameter and approximately 5–7 nm thick [5]. Bicelles are used to orient membrane proteins that are inserted into the bilayer structure and to study the superficial interactions between proteins and the phospholipid bilayer [6]. The structure, composition and

nanodimensions of these systems make them applicable for use as delivery systems for topical applications. The use of bicellar systems for skin purposes has been explored previously, and results indicate that depending on the composition, these systems can work as skin permeabilizing agents or as agents that reinforce the lipid structures present in the intercellular domains of the outermost layers of the skin [7–9]. The most common bicellar systems are formed with DMPC and DHPC. In the present work, DPPC was selected instead of DMPC because it is the major phospholipid in biological membranes and would thus form bicelles of greater biological character. In addition, DPPC has a more favorable thermotropic behavior than DMPC. The primary transition temperatures (T_m) are 24.1 and 41.5 °C for DMPC [10] and DPPC [11], respectively. At the experimental temperature (37 °C), DPPC exists in a gel phase, similar to stratum corneum lipids (T_m approximately 60 °C) [12], thus it would maintain the native state of the stratum corneum. The use of DHPC over other conventional surfactants minimizes possible disruption of the barrier function of the skin.

In vitro percutaneous absorption studies are useful in identifying the depth that a given drug penetrates into the skin. *In vitro* studies using animal or human skin are an elegant tool to obtain data on the permeability of test substances through the skin and distribution across the different cutaneous compartments [13–15]. Additionally, these studies permit the evaluation of the effectiveness of some vehicles and permeability enhancers [16].

Diclofenac diethylamine (DDEA) and flufenamic acid (Ffa) are potent non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) with

Abbreviations: DHPC, 1,2-dihexanoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine; DMPC, 1,2 dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine; DPPC, 1,2 dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine; DLS, dynamic light scattering; Cryo-TEM, cryo-transmission electron microscopy; DDEA, diclofenac diethylamine; Ffa, flufenamic acid; NSAID, non-steroidal anti-inflammatory drug; PI, polydispersity index.

* Corresponding author Tel.: +34 93 400 61 00; fax: +34 93 204 59 04.
E-mail address: olga.lopez@cid.csic.es (O. López).

analgesic effects [17,18]. DDEA and Ffa may cause side effects such as gastrointestinal disorders when administered orally, and they may cause cutaneous lesions if administered by intramuscular injection. Thus, the identification of strategies to reduce toxicity and increase the pharmacological effects of these NSAIDs is very important. Ffa is insoluble in water, and the organic solvents capable of solubilizing it may damage the skin. We believe that the inclusion of DDEA and Ffa in bicellar systems may be a good alternative delivery vehicle.

The purpose of the presented work is to analyze the influence of DPPC/DHPC bicellar systems on the percutaneous absorption of DDEA and Ffa. Several physicochemical aspects of the nanostructures were investigated and percutaneous absorption studies were carried out. The results show that these new systems could be suitable vehicles for topical applications.

2. Experimental

2.1. Chemicals

DDEA was supplied by Novartis (Basel, Switzerland). Ffa, bovine serum albumin (BSA), phosphate buffered saline (PBS) and gentamicin were purchased from Sigma–Aldrich (St Louis, MO, USA). Dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) and dihexanoyl phosphatidylcholine (DHPC) were supplied by Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA). Sodium dihydrogen phosphate monohydrate and *ortho*-phosphoric acid 85% were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Methanol (HPLC Grade) and acetonitrile were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Purified water was obtained using an ultra-pure water system, Milli-Q plus 185 (Millipore, Bedford, USA).

2.2. Preparation of bicellar systems

Bicellar systems were formed by DPPC as the long-chain phospholipids and DHPC as the short-chain phospholipid. To obtain bicellar systems containing diclofenac, an appropriate amount of DPPC was weighed and mixed with a DHPC chloroform solution to obtain DPPC/DHPC in a molar ratio of 2:1 ($q=2$). This ratio was selected to obtain small bicelles, which are more appropriate for skin purposes. Previous works carried out by our group and others [7,19] have demonstrated that the molar ratio between the short-chain (DHPC) and the long-chain (DPPC) phospholipids control (among other factors) the size of the bicelles. A 2:1 molar ratio (DPPC/DHPC) is appropriate because a higher molar ratio ($q > 3$) induces the formation of large discoidal lipid aggregates; a lower molar ratio ($q < 1$) increases the proportion of DHPC and small, almost spherical structures, are formed. These structures lack enough bilayer to incorporate active principles [20]. A 2:1 molar ratio is also a good equilibrium between the short-chain and the long-chain components.

Chloroform was eliminated by rotoevaporation of the solvent until a lipid film was obtained. The lipid film was hydrated with an aqueous solution of DDEA 1.16% (w/v) to reach 20% (w/v) of total lipid concentration. The solution was sonicated until it became transparent. For the preparation of the flufenamic acid bicellar systems, 10 mg of Ffa was weighed and mixed with a DHPC chloroformic solution. An appropriate amount of DPPC was incorporated to the chloroformic solution. After removing the chloroform, the lipid film was dissolved in 1 ml of purified water to obtain a concentration of 1% Ffa (w/v) and a total lipid concentration of 20% (w/v). Samples were sonicated until a transparent solution was obtained. After sonication, the bicellar solution was equilibrated for 24 h before characterization and application to the skin.

2.3. Characterization of the bicellar systems

2.3.1. Dynamic light scattering technique

The hydrodynamic diameter (HD) and polydispersity index (PI) of the bicellar systems were measured using a Zetasizer nano S90 (Malvern Instruments, UK). This apparatus employs the dynamic light scattering (DLS) technique to determine submicron particle sizes. DLS measures the diffusion coefficient of the particles, which depends on Brownian movement. From the diffusion coefficient, the HD is obtained [21].

2.3.2. Cryo-transmission electron microscopy (Cryo-TEM)

DDEA and Ffa bicellar systems were visualized by Cryo-TEM. Vitrified specimens were prepared using a Vitrobot (FEI Company, Eindhoven, Netherlands). The samples (5–10 μl) were placed onto a glow-discharged holey carbon grid. The grid was blotted with filter paper, leaving thin sample films spanning the grid holes. The blotted samples were vitrified by plunging the grid into freezing liquid ethane (-196°C) and stored under liquid nitrogen prior to examination under the microscope [22]. The vitreous sample films were transferred to a microscope Tecnai F20 (FEI Company, Eindhoven, Netherlands) using a Gatan cryotransfer (Barcelona, Spain) cooled with liquid N_2 to a temperature between -170°C and -175°C . The films were visualized at 200 kV using low-dose imaging conditions. Approximately ten to thirty micrographs of each sample were saved. Different areas of the vitrified specimen were examined to obtain representative micrographs of the bicellar systems. Only representative micrographs are presented here.

2.3.3. pH measurements

pH measurements of the DPPC/DHPC/Ffa and DPPC/DHPC/DDEA aqueous solutions were performed with a Model 720 pH meter and a ROSS Model 8103 SC pH electrode (both from Orion Research, Cambridge, MA, USA).

2.4. In vitro percutaneous absorption studies

Pig skin from the unboiled back of Landrace large white pigs weighing between 30 and 40 kg was used in the study. The pig skin was provided by the Hospital Clínic of Barcelona, Spain. The excised skin was dermatomed to a thickness of $500 \pm 50 \mu\text{m}$ (Dermatome GA630, Aesculap, Tuttlingen, Germany). Discs of the dermatomed skin were obtained with an iron punch (2.5 cm inner diameter) and fit onto Franz-type diffusion cells. The skin discs were stored at -20°C until use.

Franz cells (Lara-Spiral, Courtenon, France) contained an upper donor compartment and a receptor chamber (3 mL of volume). The two parts were separated by the skin biopsy, leaving an exposed surface area of 1.86 cm^2 . A magnetic stir bar was introduced into the receptor chamber. The skin disc was mounted on the Franz cell with the stratum corneum (SC) side up. The receptor chamber was filled with a receptor fluid (RF), which was PBS (pH 7.4) in distilled water containing bovine serum albumin (1% for DDEA experiments and 4% for Ffa experiments) and 0.04% gentamicin sulfate; the solution was stirred continuously.

Franz cells were stored at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ in a circulating water bath (Julabo Labortechnik GmbH, Germany) to ensure that the skin surface was maintained at $32 \pm 1^\circ\text{C}$. The integrity of each skin sample was checked by determining the transepidermal water loss (TEWL) using a Tewameter TM210 (Courage-Khazaka, Köln, Germany). The diffusion experiment was initiated by applying 10 μl of DDEA or Ffa bicellar systems to the entire surface. After 24 h of exposure time, the test formulation remaining on the skin surface was removed with a specific wash. The skin surface was dried with a cotton swab. Water aliquots, micropipette tips, cotton swabs and the top of the cell were pooled, constituting the fraction of the active compound

remaining on the surface. The receptor fluid was removed from the receptor compartment and brought up to 5 ml in a volumetric flask. The SC of the treated skin area was removed by 8 successive tape-strippings using adhesive tape (D-Squame[®], CuDerm Inc., and Dallas, USA). The viable epidermis (E) was separated from the dermis (D) after heating the skin at 80 °C for a few seconds.

The DDEA in the different layers and in the washing solution was extracted with a solution of methanol:water (50:50) for 20 h; the Ffa was extracted with methanol. The quantity of the active principles in the different skin layers was determined by HPLC.

2.5. HPLC analysis

The chromatographic analyses were performed using Hitachi LaChrom Elite equipment (Darmstadt, Germany). The apparatus consisted of an L-2130 Pump, L-2200 autosampler, and L-2400 UV Detector. The system was operated using the Merck EZChrom Elite v3.1.3 software. The injection volumes (20 μ L) were eluted in a Lichrocart 250-4/Lichrosorb RP-18 (5 μ m) column (Merck, Germany) (in the case of DDEA) and in a Lichrocart 125-4/Lichrosorb RP-18 (5 μ m) column (in the case of Ffa) at room temperature. The mobile phases used were phosphate buffer (pH 2.5)/methanol (340/660, v/v) for DDEA, and phosphate buffer (pH 2.2)/methanol (250/750, v/v) for Ffa. The analytical methodologies were validated in terms of the calibration curve, limit of detection, limit of quantitation, and reproducibility.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of the bicellar systems

The structural characterization of the bicellar systems was carried out using DLS and Cryo-TEM.

The particle sizes of the bicellar systems were investigated by DLS and analyzed by the percentage of intensity displayed. The results for the DPPC/DHPC bicellar systems without drug at 25 °C showed that the diameter size of the particles ranged between 10 and 13 nm with a PI of 0.200. DPPC and DHPC self-assemble by electrostatic, hydrophobic/hydrophilic, π - π interactions, and hydrogen bonding, which results in the reorganization of a disordered system of molecules into an ordered assembly to reach a stable state. In water, DPPC alone has a tendency to form flat lamellae and vesicles, whereas DHPC tends to form small micelles that are spherical in shape [23,24]. To reach a stable state, the excess short-chain lipid (DHPC) accumulates on the edges due to the spontaneous curvature radius.

The incorporation of DDEA in the bicellar systems led to a drastic decrease in the particle size, showing principally small structures that were 2–4 nm in diameter and had a PI of approximately 0.250. When Ffa is included in the bicellar systems, three different size populations could be detected: small structures with a particle size of approximately 9 nm, large structures with diameters of approximately 50 nm, and a population of even larger aggregates of approximately 450–500 nm in size. The PI of the sample containing Ffa was high (0.526), as was expected for systems in which structures of different sizes coexist.

Fig. 1 shows Cryo-TEM micrographs of DPPC/DHPC bicellar systems alone (Fig. 1A), with DDEA (Fig. 1B) and with Ffa (Fig. 1C). In Fig. 1A, the micrograph shows discoidal bicelles in edge-on (white arrow) and face-on dispositions (white arrow) with sizes between 10 and 60 nm. In some cases, these disks are visualized in groups of two (white narrow). In Fig. 1B, structures with sizes smaller than 5 nm are observed, which is in agreement with the data reported by the DLS experiments. Fig. 1C displays discoidal bicelles with diameters between 50 and 90 nm in edge-on (white arrow)

and face-on dispositions (white arrow). Some of these bicelles formed lamellar stacks (white ellipse). Additionally, small structures (approximately 10 nm) can be observed. These results are compatible with the sizes obtained by DLS.

The size decrease from the effect of DDEA is logical, considering that surface-active drugs, such as non-steroidal anti-inflammatory compounds, have been reported to self-associate and bind model lipid membranes, causing partial disruption and solubilization. Several authors have described this behavior for diclofenac and other drugs [25–30]. DDEA may have a similar effect as DHPC on the discoidal structure of the bicellar systems, with a tendency to locate at the edges of the lamellar structure. This localization would induce a decrease in the molar ratio between the molecules in the bilayer and in the edges, thus the size of the bicellar systems would decrease, as they did in our experiments.

The presence of aggregates with different sizes in the sample containing Ffa could be due to the formation of aggregates of different compositions in this system. The small particles could be formed primarily by DHPC, which is a phospholipid capable of assembling into small spherical micelles [31]. The presence of large discoidal aggregates may be because Ffa is a lipophilic drug [32] and could be preferably included in the lipid bilayers, promoting an increase in the molar ratio; this result would induce an increase in the size, an opposite effect to that of DDEA. The larger diameter detected in these systems by DLS could be due to the strong interaction between the large discoidal structures that are visualized in Cryo-TEM as stacks of two or more disks.

Additionally, the pH of the systems containing the drugs was tested. The pH values of the DPPC/DHPC/Ffa and DPPC/DHPC/DDEA systems were approximately 5.5 and 7.1, respectively. A change in the structure of the bicellar systems is not foreseeable when these systems were in contact with the skin (pH 5.5). Struppe et al. reported that neutral bicelles are stable from pH 4 to pH 7 [33].

3.2. Bicelles as a drug delivery system

The analytical determination of both drugs was accurate and precise, with a quantitation limit of 1.692 and 0.194 μ g/ml for DDEA and Ffa, respectively. The method was sufficiently sensitive and reproducible for evaluation of both components.

Systems formed by DPPC/DHPC were able to incorporate 1.16% DDEA similar to other colloidal drug carrier systems such as liposomes, microemulsions, and mixed micelles [28–30,34–36]. This proportion was selected because it was similar to that used in commercial products containing diclofenac for transdermal applications. DPPC/DHPC systems were also able to incorporate 1% of Ffa. This drug is a lipophilic substance that has been included in vehicles based on polyacrylate gels and wool alcohol ointments at proportions of approximately 0.90–0.45% [18,37]. Notably, a higher amount of Ffa could be incorporated into the bicellar systems without mediation of any polymer and/or alcoholic component.

The percutaneous absorption profiles of DDEA vehiculated in the mentioned bicelles compared with DDEA in an aqueous solution (1.16%) (w/v) is shown in Fig. 2. The results are expressed as a percentage of the applied dose on the skin. Most of DDEA remained in the skin surface (results not shown). However, it is interesting to note that among all the skin layers, a higher percentage of DDEA was detected in the SC. This behavior is noted especially when the drug was applied in an aqueous solution. The inclusion of DDEA in bicelles decreases the percutaneous absorption of the drug compared to that of an aqueous solution of diclofenac.

The results as a global percentage of percutaneous absorption (considering the amount of DDEA detected in E, D plus RF) show that the absorption of DDEA in an aqueous solution ($4.61 \pm 0.62\%$) is higher than in DPPC/DHPC bicelles ($2.78 \pm 1.62\%$). In this sense,

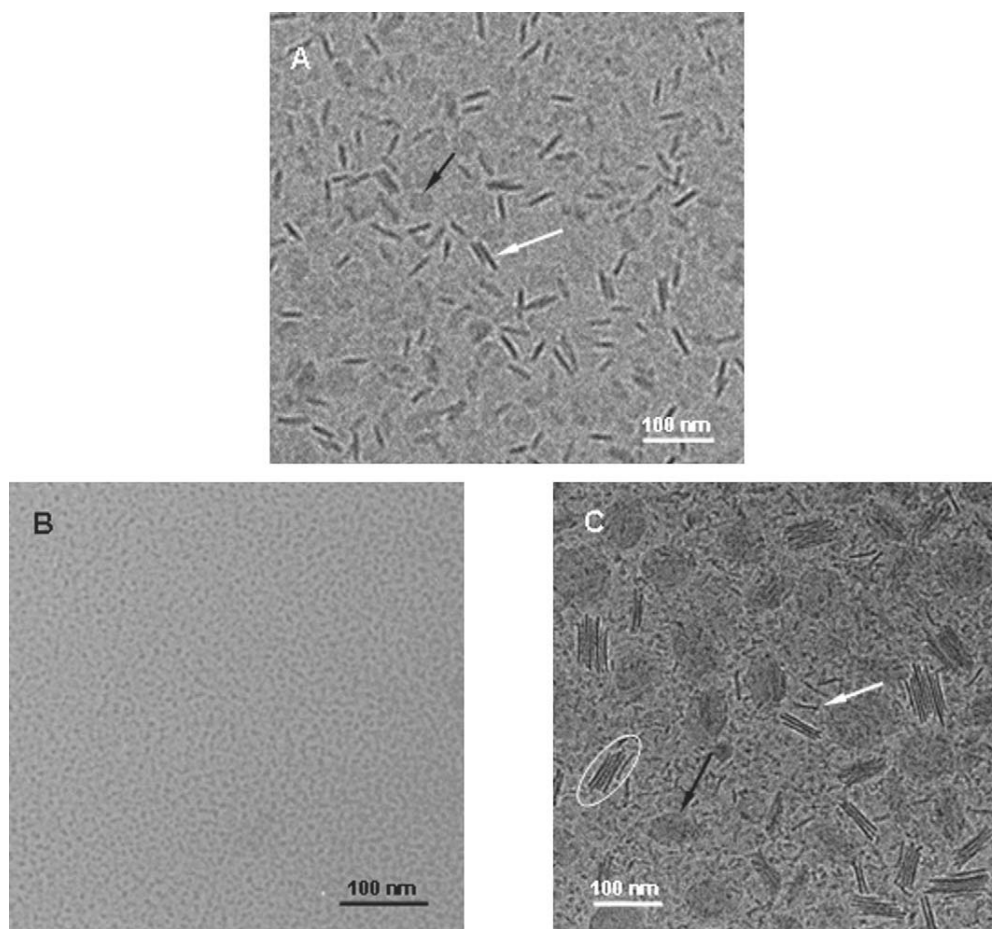


Fig. 1. (A) Cryo-TEM micrographs of DPPC/DHPC bicellar systems alone; (B) bicellar system with DDEA; (C) bicellar system with Ffa.

bicellar systems appear to retard the percutaneous absorption of DDEA.

Fig. 3 shows the percentage of percutaneous absorption through the different skin layers of Ffa in an ethanolic solution and incorporated into the DPPC/DHPC bicellar systems. The results in Fig. 3 show that the greatest degree of percutaneous absorption of Ffa occurs when it is in the ethanolic solution ($13.35 \pm 10.56\%$). When Ffa is encapsulated in DPPC/DHPC bicellar systems, its percutaneous absorption is reduced to a great extent ($2.01 \pm 0.43\%$), a

tendency similar to that described for DDEA. One of the advantages of bicellar systems is that they are more skin friendly than other vehicles such as ethanol because it is exclusively formed by phospholipids.

The results indicate that the inclusion of DDEA or Ffa in the bicellar system induces a retardant effect on their percutaneous absorption of both drugs. Retarders were described by Schaefer et al. [14] as agents that reduce the percutaneous absorption of compounds by augmenting the skin barrier function. Possibly,

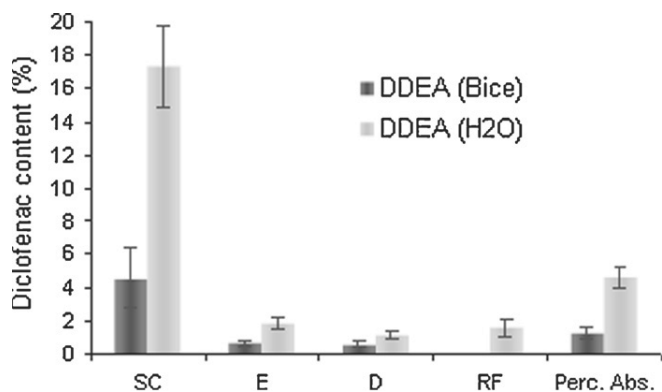


Fig. 2. Percutaneous absorption profiles of DDEA vehiculized in DPPC/DHPC bicelles and in an aqueous solution (mean values + S.D., $n = 6$). Distribution in the different layers of the skin: stratum corneum (SC), epidermis (E), dermis (D), receptor fluid (RF) and total percutaneous absorption (Perc. Abs.).

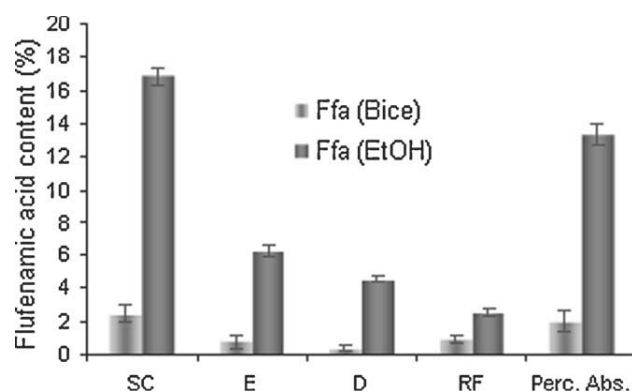


Fig. 3. Percutaneous absorption profiles of Ffa vehiculized in DPPC/DHPC bicelles and in an ethanolic solution (mean values + S.D., $n = 6$). Distribution in the different layers of the skin: stratum corneum (SC), epidermis (E), dermis (D), receptor fluid (RF) and total percutaneous absorption (Perc. Abs.).

lipids from bicelles interact with the SC lipids, modifying the order of the lipid bilayers and increasing the SC barrier nature. This retardant effect has also been described by other authors for certain compounds [38–40]. Given the physico-chemical characteristics of DDEA and Ffa, these drugs could prefer to remain in the lipid environment of the bicellar systems instead of in water. The drugs included in bicellar systems are retained, but with the 24 h exposure time, the drugs are able to slowly penetrate the skin. This result would explain the lower absorption values of the drugs included in the bicellar system compared with the drugs in aqueous or in ethanolic solutions. In the case of Ffa, the high absorption in the ethanolic solution is likely due to ethanol working as a permeability enhancer by disturbing the SC barrier function [41].

Comparing the results obtained for the two drugs included in the DPPC/DHPC bicellar systems, a higher penetration of DDEA ($2.78 \pm 1.62\%$) than Ffa ($2.01 \pm 0.43\%$) was observed. Taking into account the physicochemical characteristics of DDEA and Ffa, Ffa should penetrate further because it is more lipophilic than DDEA and has a lower molecular weight. However, this is not the case; Ffa penetrates less than DDEA. One of the causes could be that the nanostructures of Ffa bicellar systems are larger than DDEA bicelles.

In summary, the presented findings suggest retardation of percutaneous absorption when certain drugs as DDEA and Ffa are included in bicellar systems; the retardant effect was more pronounced effect in the case of Ffa. These results have obvious implications for agents that are required to reside at or in the skin surface and not penetrate sufficiently to elicit systemic effects. Some examples of these agents in different fields could be UV filters, pesticides and fentanyl, for purposes of preventing an overdose of the drug [38,39,42].

4. Conclusions

The presented work demonstrates that bicellar systems can incorporate an amphiphilic drug (DDEA) and a lipophilic drug (Ffa). This incorporation changes the particle size with respect to the original bicelles. These bicellar systems could inhibit the percutaneous absorption of DDEA and Ffa into the skin. The results of our work may be useful for the development of bicellar systems for drugs that have fast percutaneous absorption, as in the case of fentanyl, and to encapsulate cosmetic ingredients that should not penetrate deeply. Further investigations into the use of bicelles as delivery systems for other drugs or cosmetic ingredients with different physicochemical properties and applications, should be considered in future research.

Acknowledgments

This work was supported by funds from CICYT (CTQ 2010-16964), from Generalitat de Catalunya (2009 SGR 1212) and from European Social Fund (Programa Nacional de Potenciación de Recursos Humanos del Plan Nacional de I+D+I (2004–2008)). M. Cócera is funded by the JAE-DOC program from CSIC (co-funded by FSE).

References

- [1] B.W. Barry, *Eur. J. Pharm. Sci.* 14 (2001) 101.
- [2] P.L. Honeywell-Nguyen, J.A. Bouwstra, *Drug Discov. Today: Technol.* 2 (2005) 67.
- [3] A.C. Williams, *Transdermal and Topical Drug Delivery: From Theory to Clinical Practice*, Pharmaceutical Press, London, 2003.
- [4] I. Visscher, M.C. Stuart, J.B. Engberts, *Org. Biomol. Chem.* 4 (2006) 707.
- [5] R.R. Vold, R.S. Prosser, *J. Magn. Res. Ser. B* 113 (1996) 267.
- [6] R.S. Prosser, F. Evanics, J.L. Kitevski, M.S. Al-Abdul-Wahid, *Biochemistry* 45 (2006) 8453.
- [7] L. Barbosa-Barros, A. de la Maza, J. Estelrich, A.M. Linares, M. Feliz, P. Walther, R. Pons, O. Lopez, *Langmuir* 24 (2008) 5700.
- [8] L. Barbosa-Barros, A. De la Maza, P. Walther, J. Estelrich, O. Lopez, *J. Microsc.* 230 (2008) 16.
- [9] G. Rodriguez, L. Barbosa-Barros, L. Rubio, M. Cocera, C. Lopez-Iglesias, A. de la Maza, O. Lopez, *Colloids Surf.* 84 (2011) 390.
- [10] P.F. Almeida, W.L. Vaz, T.E. Thompson, *Biochemistry* 31 (1992) 6739.
- [11] M.R. Vist, J.H. Davis, *Biochemistry* 29 (1990) 451.
- [12] G.M. Golden, D.B. Guzek, A.H. Kennedy, J.E. McKie, R.O. Potts, *Biochemistry* 26 (1987) 2382.
- [13] OECD, Guideline 428: Skin Absorption: *In Vitro* Method, in: O.F.E.C.a. Development (Ed.), *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*, OECD Publishing, Paris, France, 2004, p. 8.
- [14] H. Schaefer, T.E. Redermeier, *Skin Barrier—Principles of Percutaneous Absorption*, Karger-Verlag, Basel, 1996.
- [15] P.M. Elias, K.R. Feingold, *Skin Barrier*, Taylor and Francis group, New York, 2006.
- [16] H.S. Gwak, I.K. Chun, *Int. J. Pharm.* 236 (2002) 57.
- [17] B.S. Galer, M. Rowbotham, J. Perander, A. Devers, E. Friedman, *J. Pain Symptom Manag.* 19 (2000) 287.
- [18] H. Wagner, K.H. Kostka, W. Adelhardt, U.F. Schaefer, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 58 (2004) 121.
- [19] L. van Dam, G. Karlsson, K. Edwards, *Biochim. Biophys. Acta* 1664 (2004) 241.
- [20] J.A. Whiles, R. Deems, R.R. Vold, E.A. Dennis, *Bioorg. Chem.* 30 (2002) 431.
- [21] R.F. Probst, *Physicochemical Hydrodynamics*, John Wiley & Sons, New York, 1994.
- [22] P.L. Honeywell-Nguyen, P.M. Frederik, P.H. Bomans, H.E. Junginger, J.A. Bouwstra, *Pharm. Res.* 19 (2002) 991.
- [23] L. Barbosa-Barros, C. Barba, G. Rodríguez, M. Cócera, L. Coderch, C. López-Iglesias, A. de la Maza, O. López, *Mol. Pharm.* 6 (2009) 1237.
- [24] H. Wang, J. de Joannis, Y. Jiang, J.C. Gaulding, B. Albrecht, F. Yin, K. Khanna, J.T. Kindt, *Biophys. J.* 95 (2008) 2647.
- [25] L.B. Lopes, M.V. Scarpa, G.V. Silva, D.C. Rodrigues, C.V. Santilli, A.G. Oliveira, *Colloids Surf.* 39 (2004) 151.
- [26] K. Kriwet, C.C. Müller-Goymann, *Pharmazie* 49 (1994) 187.
- [27] L.B. Lopes, M.V. Scarpa, N.L. Pereira, L.C. Oliveira, A.G. Oliveira, *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 42 (2006) 497.
- [28] T. Rades, C.C. Müller-Goymann, *Int. J. Pharm.* 159 (1997) 215.
- [29] S. Schreiber, S.V. Malheiros, E. de Paula, *Biochim. Biophys. Acta* 1508 (2000) 210.
- [30] W. Schutze, C.C. Müller-Goymann, *Pharm. Res.* 15 (1998) 538.
- [31] J.L. López-Fontán, P. Martínez-Landeira, C. Santamarina, J.M. Ruso, G. Prieto, F. Sarmiento, *Prog. Colloid Polym. Sci.* 122 (2003) 141.
- [32] M.J. Santander-Ortega, T. Stauner, B. Loretz, J.L. Ortega-Vinuesa, D. Bastos-Gonzalez, G. Wenz, U.F. Schaefer, C.M. Lehr, *J. Control Release* 141 (2010) 85.
- [33] J. Struppe, J.A. Whiles, R.R. Vold, *Biophys. J.* 78 (2000) 281.
- [34] R.R. Boinpally, S.L. Zhou, S. Poondru, G. Devraj, B.R. Jasti, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 56 (2003) 389.
- [35] S. Parsaee, M.N. Sarbolouki, M. Parnianpour, *Int. J. Pharm.* 241 (2002) 185.
- [36] J.H. Kweon, S.C. Chi, E.S. Park, *Arch. Pharm. Res.* 27 (2004) 351.
- [37] U. Jacobi, H. Taube, U.F. Schaefer, W. Sterry, J. Lademann, *J. Control Release* 103 (2005) 61.
- [38] J. Hadgraft, J. Peck, D.G. Williams, W.J. Pugh, G. Allan, *Int. J. Pharm.* 141 (1996) 17.
- [39] C.S. Asbill, B.B. Michniak, *PSTT* 3 (2000) 36.
- [40] J.Y. Fang, T.L. Hwang, Y.L. Leu, *Int. J. Pharm.* 250 (2003) 313.
- [41] H.Y. Thong, H. Zhai, H.I. Maibach, *Skin Pharmacol. Physiol.* 20 (2007) 272.
- [42] M.A. Frolich, A. Giannotti, J.H. Modell, *Anesth. Analg.* 93 (2001) 647.

Article 5

Barrier function of intact and impaired skin: Percutaneous penetration of caffeine and salicylic acid

Int. J. Dermatol., 2011, 50, 881–889.

En aquest treball s'avalua l'absorció percutània *in vitro* de dos compostos (cafeïna i àcid salicílic), amb l'objectiu d'estudiar la correlació existent entre el nombre progressiu de "tape-strips" aplicats a la pell i el seu TEWL, simulant una pell amb diferents nivells de deteriorament de la funció barrera. En general, les proves d'absorció percutània es realitzen mitjançant biòpsies de pell amb una condició fisiològica acceptable. No obstant això, sota diferents condicions patològiques, la funció de barrera de l'EC es veu afectada i, en conseqüència, el seu perfil d'absorció percutània. Per aquest motiu es va proposar fer aquest estudi.

La funció barrera de l'EC es va avaluar mitjançant una correlació entre el nombre d'aplicacions repetides de tires de cinta adhesiva sobre la pell (porcina *in vitro* i humana *in vivo*) i el seu TEWL. Aquesta funció barrera es va avaluar també a través d'estudis d'absorció percutània *in vitro* dels dos compostos, utilitzant cèl·lules de difusió de Franz i les diferents pells porcines amb desigual nivell de pertorbació de l'EC.

Una disminució progressiva de la funció de barrera de la pell ha estat detectada per TEWL tant *in vitro* com *in vivo* quan el nombre de "tape-strippings" en la pell augmenta. D'altra banda, l'absorció percutània dels compostos investigats augmenta d'una manera diferent quan augmenta el nombre de tires adhesives. L'àcid salicílic va presentar un increment lineal en funció de la pertorbació de la barrera cutània. En el cas de la cafeïna, l'absorció percutània va augmentar de manera exponencial. Els resultats indiquen que el deteriorament de la barrera de la pell augmenta sempre el comportament de penetració d'un compost donat, però, el balanç hidròfil-lipòfil dels compostos o formulacions utilitzades poden modificar en gran mesura el seu perfil de penetració, especialment quan s'utilitza una pell amb la funció barrera modificada.

Aquest protocol *in vitro* pot ser útil per simular d'una manera més realista el perfil d'absorció percutània d'alguns principis actius aplicats sobre la pell amb una funció barrera alterada i podria ser utilitzat per evitar, en certa mesura, l'ús *in vivo* d'animals d'experimentació en el camp dermofarmacèutic.

Pharmacology and therapeutics

Barrier function of intact and impaired skin: percutaneous penetration of caffeine and salicylic acidLaia Rubio¹, BChem, Cristina Alonso¹, PhD, Olga López¹, PhD, Gelen Rodríguez¹, BBiol, Luisa Coderch¹, PhD, Jaime Notario², MD, Alfonso de la Maza¹, PhD, and José L. Parra¹, PhD, MD¹Department of Chemical and Surfactants Technology, IQAC-CSIC, and ²Department of Dermatology, Bellvitge University Hospital, Barcelona, Spain**Correspondence**Laia Rubio, BChem
Department of Chemical Technology
IQAC-CSIC
C/ Jordi Girona, 18–26
08034 Barcelona
Spain
E-mail: laia.rubio@iqac.csic.es

Conflicts of interest: None.

Abstract**Background** Normally, percutaneous absorption tests are carried out using skin biopsies for an apparent and acceptable physiological condition. However, under different pathological conditions, the stratum corneum (SC) barrier function is impaired.**Methods** The barrier function of the SC was assessed by correlation between the number of repeated applications of tape strips on the skin and its transepidermal water loss (TEWL), as well as by *in vitro* percutaneous absorption studies of different compounds, using Franz diffusion cells and porcine skin previously stripped.**Results** A progressive diminution of the skin barrier function has been detected by TEWL both *in vitro* and *in vivo* as the number of skin tape strips increases. On the other hand, the percutaneous absorption of the compounds tested increases in a different way as the number of strips increases. Salicylic acid increases linearly depending on the barrier disturbance. However, percutaneous absorption of caffeine exponentially increased with barrier disturbance. Our results indicate that the barrier impairment of skin always increases the penetration behavior of a given compound; however, the hydrophilic–lipophilic balance of the compounds or formulations used could greatly modify its penetration profile, especially when a modified skin is used.**Conclusions** This *in vitro* protocol may be useful to simulate the percutaneous absorption profile of some drugs applied onto skin with an impaired SC barrier function and could be used to avoid, to some extent, the use of *in vivo* experimental animal models in the dermatopharmaceutical field.**Introduction**

The stratum corneum (SC) is the outermost layer of the skin. One of its most important roles is as the limiting barrier to water loss by evaporation, as well as its role as a barrier against the penetration of foreign physical, chemical, and pathogenic components from the environment.^{1–3} The physical state and organization of the SC, particularly its lipid intercellular matrix, provide adequate barrier function.^{4–6}

Percutaneous absorption can be studied using *in vitro* methods, as it is possible to maintain the barrier properties of the SC in excised skin.^{7–9} There is suitable evidence that *in vitro* data may be predictive for *in vivo* percutaneous absorption in both animals and humans.¹⁰ Furthermore, the usefulness of the pig skin as an experimental model for skin permeation in humans is widely

appreciated.¹¹ In fact, this *in vitro* strategy may be very useful to substitute or reduce *in vivo* animal experiments.

Normally, percutaneous absorption tests are carried out using skin biopsies for an apparent and acceptable physiological condition. However, under different pathological conditions, the SC barrier function is impaired. The skin pathologies most frequently cited are atopic dermatitis,¹² ichthyosis,¹³ psoriasis,¹⁴ and severe xerosis.¹⁵ In all these dermatological pathologies, a reduced skin barrier function has been detected owing to elevated transepidermal water loss (TEWL) values. The measurement of TEWL allows total water loss to be determined from viable epidermis and dermis, diffusing through the SC to the skin surface.¹⁶ The TEWL measurement *in vitro* is a good biophysical indicator of the integrity of barrier function.^{17,18} The relationship between TEWL, as a measurement of barrier function efficiency, and the

degree of barrier disruption after skin damage is generally accepted using different skin models.^{19–22}

In the literature, it has also been shown that a less than perfect SC (across which TEWL is elevated) is a more permeable barrier to drug permeation.²³ An overview about the existence of a correlation between TEWL and percutaneous absorption has been reported by Levin and Maibach.²⁴ The TEWL and percutaneous absorption rates increase when the integrity of the SC barrier is compromised. In general, the majority of earlier studies presented a quantitative correlation between TEWL and percutaneous absorption,^{25,26} although in a few, no quantitative correlation was observed.^{27,28}

Measurements of TEWL on previously stripped skin biopsies might be an interesting strategy to know, at a preliminary stage, the behavior of diseased skin during the percutaneous absorption process. A correlation has been reported between the decrease in barrier function as indicated by TEWL and increase in the percutaneous absorption of hydrocortisone;²⁵ this correlation was reconfirmed by a study on patients with widespread dermatitis.²⁹ Based on this idea, we tried to generalize the predictability of this model by evaluating the skin barrier function using the correlation between sequential tape stripping on SC and its TEWL. This barrier function was assessed by *in vitro* percutaneous absorption of two compounds (caffeine and salicylic acid) using porcine skin samples subjected to previous progressive impairment of the SC by sequential tape stripping. Salicylic acid is widely used in the treatment of many common dermatological conditions, owing to its keratolytic properties.³⁰ In addition, caffeine is well known for its anticellulite effect, but recent studies also use it as a treatment for psoriasis.³¹ These compounds with different octanol–water partition coefficient³² may be used in topical applications.

In this paper, a more realistic scenario should be envisaged using skin biopsies with a progressive deterioration of the SC barrier function, when an *in vitro* percutaneous absorption test is performed to develop a transdermal drug to be used on impaired skin.

Materials and methods

Materials

Salicylic acid (99%) was purchased from Aldrich (Gillingham, Dorset, UK). Caffeine (pure), bovine serum albumin, phosphate-buffered saline, and gentamicin were purchased from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). Methanol (high-performance liquid chromatography grade), sodium dihydrogen phosphate monohydrate, acetonitrile, and orthophosphoric acid (85%) were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Ethanol was obtained from Carlo Erba (Milan, Italy), and purified water was

obtained by an ultra-pure water system, Milli-Q plus 185 (Millipore, Bedford, MA, USA).

Methods

In vivo tape stripping of the skin and evaluation of its transepidermal water loss

A total of six volunteers were used for this study. Tape stripping was carried out using a different number of D-Squame (0–50 strips) by applying a constant pressure (80 g/cm²) for 5 seconds, in all the cases. Furthermore, the tearing-off direction was also varied by 90° for each strip. The TEWL was carried out using a Tewameter TM210 (Courage & Khazaka, Cologne, Germany) for 1 minute, and the mean value was determined. This study was approved by the Ethics Committee of the Bellvitge University Hospital, Barcelona, Spain.

In vitro tape stripping of the skin and evaluation of its transepidermal water loss

Pig skin obtained from the unboiled back of Landrace large white pigs weighing 30–40 kg was used for this study. The pig skin was provided by the Clínic Hospital of Barcelona, Spain. Bristles were removed carefully with an animal clipper, and subsequently the skin was washed with water. The excised skin was dermatomed to a thickness of 500 ± 50 µm (Dermatome GA630; Aesculap, Tuttlingen, Germany). The discs of the dermatomed skin were obtained using an iron punch (2.5 cm of inner diameter) in such a way that they fit into the Franz diffusion cells. The skin discs were stored at –20 °C and thawed immediately for subsequent usage.

Several skin discs with their SC undisturbed were positioned in a simple model of Franz static diffusion cells (Lara-Spiral, Courtenon, France). The Franz cells consisted of an upper donor compartment and a receptor chamber (3 ml of volume). These two parts were separated by the skin biopsy with an exposed surface area of 1.86 cm². A small magnetic stirring bar was introduced into the receptor chamber. Subsequently, the skin discs were mounted in the Franz cell, with the SC side on top. The receptor chamber was filled with a receptor fluid containing phosphate-buffered saline (pH 7.4) in distilled water, 1% bovine serum albumin, and 0.04% of gentamicin sulfate. The cells were placed in a circulating water bath (Julabo, Seelbach, Germany) to ensure that the surface skin was maintained at 32 °C. After stabilization of the cells for 1 hour, the measurement of TEWL was carried out for 1 minute, and the mean value was determined.

The same procedure was followed for the measurement of TEWL in the previously stripped skin discs. The *in vitro* stripping was carried out using D-Squame adhesive discs (CuDerm Corporation, Dallas, TX, USA). The adhesive tapes were applied in a sequential manner onto the skin discs (from 0 to 50). Each strip was applied onto the skin with a constant

pressure (80 g/cm²) for 5 seconds. For each repeated strip, the tearing-off direction was varied by 90° to obtain a homogeneous removal of the SC cell layers.

In vitro percutaneous absorption studies of previously stripped skin

The variably stripped skins were positioned in the Franz diffusion cells. Each active principle (caffeine or salicylic acid) was applied on the progressively stripped skin samples, and *in vitro* permeation studies were performed for 24 hours. The Franz cells were kept at 37 ± 1 °C by means of a thermostated water bath with a magnetic stirring. The receptor fluid was continuously stirred. In all the cases, the integrity of the skin was checked by TEWL. A minimum of six samples was required for each experimental assay.

The diffusion experiment was initiated by applying 10 µl of ethanol–water (1:1) solution of caffeine or salicylic acid (both about 3%, w/v) to the entire surface delimited by the upper cell. After an exposure time of 24 hours, the test formulation remaining on the skin surface was removed with a specific wash: first with 0.5 ml of sodium lauryl ether sulfate solution (at 0.5%, w/v) and then twice with distilled water (2 × 0.5 ml). Subsequently, the skin surface was dried with a cotton swab. Water aliquots from all the tips and cotton swabs used, as well as the top of the cell, were pooled, which constituted the fraction of active compound remaining on the surface. Subsequently, the receptor fluid was removed from the receptor compartment and brought to 5 ml in a volumetric flask. The SC of the treated area was removed by eight successive tape strippings, carried out under controlled conditions. The tape strips were grouped as strips 1–4 and strips 5–8, and were placed in glass vials. After that, the viable epidermis was separated from the dermis after heating the skin at 80 °C for a few seconds, and subsequently the dermis was cut into small pieces.

The amount of caffeine or salicylic acid in the different layers and washing solution was extracted with methanol–water (50:50) solution. After one night of contact with the solvent, all the samples were shaken for 30 minutes at room temperature, and the dermis, epidermis, and SC samples were sonicated for 15 minutes. Before the analytical determination of the samples, they were filtered through a 0.45-µm Acrodisc filter (Pall Gelman Sciences, Northampton, UK). Subsequently, the different compartments, for each active principle, were analyzed using high-performance liquid chromatography.

High-performance liquid chromatography analysis

The chromatographic analyses were performed using Hitachi LaChrom Elite equipment (Darmstadt, Germany). The apparatus consisted of an L-2130 Pump, L-2200 Autosampler, and L-2400 UV Detector. The system was operated using the software EZChrom Elite v3.1.6 (Scientific Software Inc.,

Pleasanton, CA, USA). The mobile phases used were 20 mM phosphate buffer (pH 2.5)/methanol (340/660, v/v) for caffeine, and 25 mM phosphate buffer (pH 2.33)/acetonitrile/methanol (650/200/150, v/v/v) for salicylic acid. The analytical methodologies were validated in terms of calibration curve, limit of detection, limit of quantitation, and reproducibility. Table 1 shows the analytical results obtained on validations.

Results

The use of *in vitro* methods and non-invasive techniques may be two suitable alternatives to the *in vivo* animal experiments. In the case of percutaneous absorption, an *in vitro* guideline has been adopted by the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD).⁸ On the other hand, TEWL measurements are considered a good indicator of the integrity of skin barrier function.^{20,33} It has been demonstrated that TEWL is predictive of the permeability barrier, and as such, can be used to develop suitable and realistic transdermal drug delivery systems, taking into account the physiological or pathological conditions of the skin.^{19,20,23,34} In this paper, the existing correlation between progressive SC tape stripping and TEWL variation were applied to the *in vitro* percutaneous absorption of two compounds that have different penetration profiles on intact skin. The conditions of compromised skin, particularly the impaired barrier function of SC were simulated to develop a suitable approach capable of predicting the drug penetration on a compromised skin.

Correlation between stratum corneum strips and transepidermal water loss

In Figure 1, the influence of the number of strips on TEWL measurements performed on pig skin discs *in vitro* and on the forearm of human volunteers *in vivo* is shown. The *in vitro* results showed that the TEWL value corresponding to the baseline (mean ± SD, *n* = 6), where no damage had been inflicted to the skin barrier, was 8.1 ± 2 g/m² per hour. During the first 10 strips, only a

Table 1 Analytical validation data obtained for the different compounds analyzed

	Caffeine	Salicylic acid
Detection limit (µg/ml)	0.402 µg/ml	0.376
Quantification limit (µg/ml)	0.804 µg/ml	0.762
Calibration curve	$A_{271nm} = 9194.1$ [conc]–1085.3	$A_{237nm} = 13889$ [conc]–15452
Linearity coefficient (<i>r</i> ²)	1	0.999
Repeatability (CV _{intra})	0.5%	1.4%
Intermediate precision (CV _{inter})	1.5%	2.7%

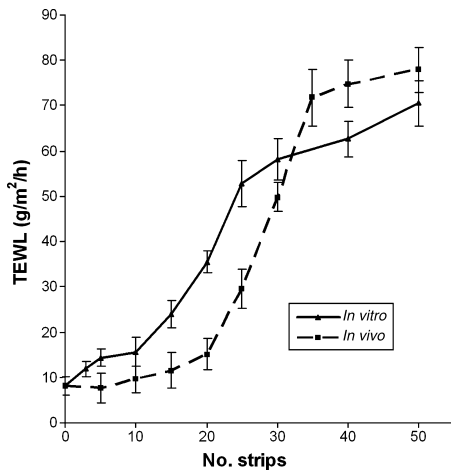


Figure 1 *In vitro* and *in vivo* transepidermal water loss (TEWL) values as a function of the number of strips. The measurement of the TEWL was carried out on *in vitro* pig skin biopsies and on *in vivo* human skin (mean ± SD, n = 6) previously stripped with different number of strips

minor increase in TEWL (15.6 ± 3.2 g/m² per hour) was observed, but when more tape strippings on the skin were performed, an increase in TEWL was observed up to 50 strips (70.5 ± 4.9 g/m² per hour). In evaluating the integrity of the skin *in vivo*, a similar TEWL trend with respect to the one obtained in the case of *in vitro* examination was detected. The TEWL value for baseline (mean ± SD, n = 6) was 8.8 ± 2.1 g/m² per hour. The first 20 strips caused a minor increase in TEWL (15.1 ± 3.4 g/m² per hour). However, 35 strips caused a major increase in TEWL (71.8 ± 6.2 g/m² per hour). From 35 to 50 strips, the increase in TEWL was insignificant (77.9 ± 6.2 g/m² per hour). This fact may indicate that the skin barrier had been removed to a great extent.

Correlation between stratum corneum strips and percutaneous absorption

Using the experimental strategy described earlier, the *in vitro* percutaneous absorption of the two compounds, caffeine and salicylic acid, was investigated using either intact skin discs or skin discs with varying degrees of barrier disturbance by a sequential number of tape strippings. In addition to their importance in topical applications, these two compounds were chosen owing to their completely different penetration profiles.

Percutaneous absorption was investigated first on intact skin. In Table 2, the content of each compound investigated in the different skin compartments, skin surface (excess), and receptor fluid are indicated when no tape strippings were performed on the skin. Furthermore, the global percentages of percutaneous absorption values for each compound are shown as well as the total recovery

found during the experiments. As it can be seen, the amount of caffeine permeated through the skin (E + D + RF) was rather low (3.57 ± 1.24%), while the percutaneous absorption of salicylic acid was much higher (34.48 ± 2.56%). This fact may be owing to the more lipophilic character of salicylic acid (logP = 2.06),³² in comparison with caffeine (logP = -0.07).³² Furthermore, earlier works also support the skin-penetration ability of salicylic acid on *in vivo* intact skin.^{34,35}

The same experimental procedure was followed with these two compounds applied onto skin that was previously submitted to progressive tape stripping. The amount of caffeine and salicylic acid in each compartment for the differently modified skin is presented in Figures 2 and 3, respectively.

Figure 2 shows that the first increment of percutaneous absorption of caffeine is between 10 and 25 strips, and it is important to observe the huge difference in the penetration profile of caffeine before and after 25 strips. On intact skin and on skin disturbed by sequential strips (from 3 to 25), caffeine is mainly observed at the surface, and after 25 strips, it is mainly detected in the receptor fluid. However, in the epidermis and dermis, the amount of caffeine always (except between 40 and 50 strips) remained negligible. On the other hand, an absolutely different skin penetration profile was obtained for salicylic acid (Fig. 3). As the number of tape strippings increased, the amount of salicylic acid progressively decreased at the surface and in the SC and increased in the receptor fluid. However, the amount of salicylic acid detected in the dermis and the rest of the epidermis was more significant than in the case of caffeine and sharply decreased after 25 strips.

It can be pointed out that the strong barrier effect of the SC until 25 strips may be responsible for the caffeine remaining mainly at the surface. However, from 25 strips, caffeine shows a low affinity towards the epidermis and dermis and, as a consequence, passes directly to the

Table 2 Percutaneous absorption profiles of caffeine and salicylic acid, using skin discs with a maintained barrier function (non-stripped)

% Recovered	Caffeine	Salicylic acid
Surface	95.09 ± 3.84	56.95 ± 2.78
Stratum corneum	2.11 ± 1.36	7.80 ± 1.72
Epidermis	0.26 ± 0.12	16.40 ± 0.73
Dermis	0.53 ± 0.23	2.70 ± 0.42
Receptor fluid	2.78 ± 2.12	15.38 ± 1.71
Percutaneous absorption	3.57 ± 1.24	34.48 ± 2.56
Total recovery	100.77 ± 1.92	99.28 ± 4.31

Mean values ± SD with n = 6.

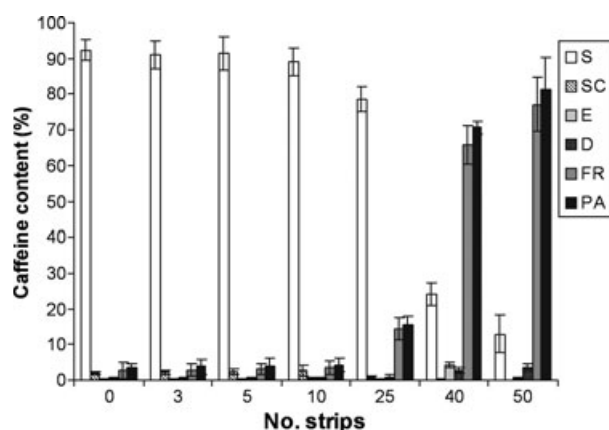


Figure 2 Percutaneous penetration of caffeine on intact and progressively impaired skin by application of strips. The figure shows the distribution of the active principle in the different skin compartments: S, surface; SC, stratum corneum; E, epidermis; D, dermis; RF, receptor fluid; PA, total percutaneous absorption

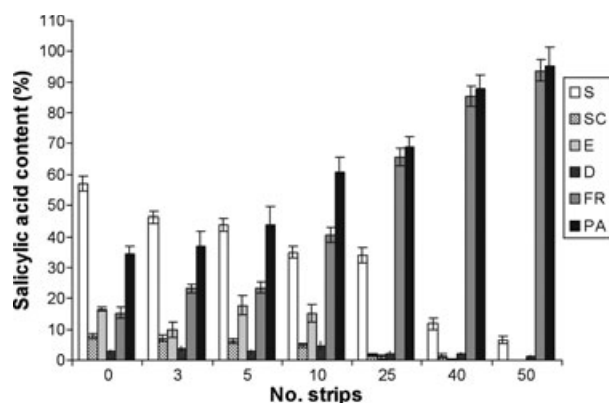


Figure 3 Percutaneous penetration of salicylic acid on intact and progressively tape stripped skin. The skin was impaired by progressive application of the strips. The figure shows the distribution of the active principle in the different skin compartments: S, surface; SC, stratum corneum; E, epidermis; D, dermis; RF, receptor fluid; PA, total percutaneous absorption

receptor fluid. On the contrary, salicylic acid has a high affinity towards all the skin layers, and the effect of tape stripping is more progressive. As it can be seen in Figure 3, the compound was practically absent in the SC, the rest of the epidermis, and the dermis after 25 strips.

Discussion

It is well known that the percutaneous absorption process of a given compound depends on many factors:

physicochemical characteristics, molecular size, partition coefficient, solubility, and thermodynamic activity, drug-binding, etc.^{2,10} Even though the physicochemical properties of the molecules or the formulations applied are generally accepted to influence the percutaneous absorption profile, it is important to determine their behavior on modified skin. Some researchers established the existence of a correlation between TEWL and percutaneous absorption of compounds of different physicochemical character;³⁴ however, the majority of authors have reported a different penetration behavior using compounds of different physicochemical character on intact skin, when compared with barrier-impaired skin.^{27,36–38}

The antipsoriatic, anti-eczematous, or other drugs employed to alleviate diseases of the skin are studied at a preliminary stage by *in vitro* percutaneous absorption test, using biopsies of healthy skin. However, these drugs should be applied onto skin biopsies using skin with an impaired barrier function. In this sense, it is possible to simulate the damage condition of a pathological skin, chemically disturbed using acetone²⁷ or sodium lauryl sulfate,^{36,37} or mechanically disturbed, through repeated tape stripping,^{19,20,38} needle puncture, or sandpaper abrasion.³⁹

With regard to a possible correlation between SC strips and TEWL, the variation found between the *in vivo* data (using human volunteers) and the *in vitro* porcine skin data could be due to skin structure variables (in particular, a different anatomical site) of both the tissues (Fig. 1). However, the tendency appreciated in that figure indicates a clear and progressive diminution of skin barrier function with the increasing number of strips. Moreover, the results confirm that TEWL measurements can also be used to carry out *in vitro* skin experiments in accordance with the results published by other authors.^{19,20,38}

On the other hand, the percutaneous absorption results shown in Figures 2 and 3 for salicylic acid and caffeine can be plotted against the number of strips (Fig. 4) or TEWL (Fig. 5) for the two compounds to determine their correlation and the influence of their physicochemical properties.

The percutaneous absorption profile of caffeine as a function of the number of strips (Fig. 4) or TEWL (Fig. 5) demonstrates low skin absorption values until 10 strips, similar to that obtained for non-stripped skin (see Table 2). However, the percentage of percutaneous absorption is observed to increase drastically from 25 to 50 strips, reaching a percentage of $81.2 \pm 9.2\%$. The evolution of the percentage values of percutaneous absorption for caffeine indicated in the two figures can be best fitted to an exponential equation as follows:

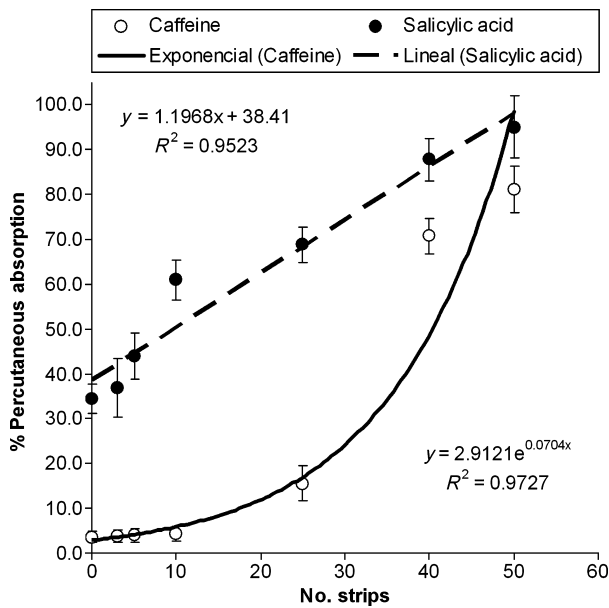


Figure 4 Percutaneous absorption of caffeine and salicylic acid as a function of the number of strips applied on the skin discs (mean ± SD, n = 6)

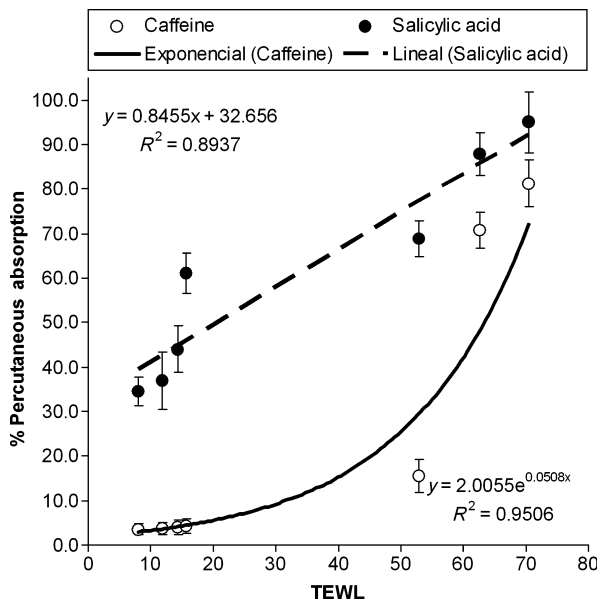


Figure 5 Percutaneous absorption of caffeine and salicylic acid as a function of the TEWL values (mean ± SD, n = 6)

$$\% PA = A \cdot \exp [B \cdot \text{No. Strips or TEWL}],$$

where % PA is the percentage of percutaneous absorption, A is the pre-exponential factor related to the physicochemical properties of caffeine, and B is related to the effect that provokes the disturbance of the barrier function in the percutaneous absorption. A similar exponential

equation has been described by Sekkat *et al.*,¹⁹ considering the relationship between the estimated steady-state drug flux (J_{ss}) and TEWL for caffeine and phenobarbital. In our case, the equations obtained for caffeine, both related to the number of strips or to TEWL, fit quite well with an exponential equation ($R^2 = 0.97$ and 0.95 , respectively).

However, another characterization was observed for salicylic acid. The first difference with respect to caffeine was that without performing any tape stripping on the *in vitro* skin used, the percentage of percutaneous absorption was observed to be very high ($34.5 \pm 3.2\%$), possibly owing to its lipophilic character. As the number of strips increased, the percentage of percutaneous absorption progressively increased, maintaining this behavior until the last experiment (50 strips). The final percutaneous absorption reached was $95 \pm 6.9\%$. In this case, percutaneous absorption, both related to the tape strips and TEWL, fit best with the following linear equation:

$$\% PA = a \cdot \text{No. Strips or TEWL} + b,$$

in which b is related to the physicochemical properties of salicylic acid, and a is related to the effect of barrier disturbance. The R^2 obtained with these two linear equations is related to the number of strips and TEWL ($R^2 = 0.95$ and 0.89 , respectively).

The completely different behavior between these two compounds may be taken into account for the percutaneous prediction of the drugs applied onto barrier-impaired skin. In our study, while salicylic acid demonstrated a much higher penetration on intact skin, a linear increase was found as a function of the barrier disturbance. However, this was not the case for caffeine, for which the low initial percutaneous absorption exponentially increased with the barrier disturbance. These results are in accordance with other studies carried out on skin previously damaged using acetone or sodium lauryl sulfate,^{27,36} in which the barrier control of the percutaneous absorption due to the SC was less pronounced in the case of lipophilic compounds (like salicylic acid). It must be pointed out that the penetration rates of caffeine and salicylic acid in our model using *in vitro* intact pig skin cannot be related to the results obtained *in vivo* in human skin 40 years ago.⁴⁰ It is important to indicate that these authors used acetone as a vehicle for the skin application and in our case we have used ethanol:H₂O (1:1). However, this is not an individual case. In fact, the results reported by other authors^{41,42} about the *in vivo*–*in vitro* correlation of the penetration rates of several compounds have been the subject of many discrepancies. As it is well known, not only the active principle but also the vehicle used are important factors to be taken into account in order to obtain reproducible results. In our opinion, it is very important to conduct skin absorption studies following strictly the OECD Guidelines.

On the other hand, the need to quantify (or, at least, to have some idea of the amount of) the SC removed is not clear. Herkenne *et al.*⁴³ published a paper considering the importance of some experimental aspects. Different tapes and different methods will inevitably strip the SC in a variable fashion making inter- and intralaboratory comparisons quite difficult. Several alternative attempts have been proposed, but no single method has achieved universal acceptance.

Our results indicate that the barrier impairment of the skin always increases the penetration behavior of a given compound; however, the hydrophilic-lipophilic balance of the compounds or formulations used could greatly modify its penetration profile, especially when a modified skin is used. It is clear that in the case of drugs to be applied on a skin with a compromised barrier function, a preliminary knowledge about their *in vivo* TEWL values is necessary, as reported by Simonsen and Fullerton³⁸ on atopic dermatitis. In fact, the skin permeation results obtained by these authors for fusidic acid and bethamethasone-17-valerate, using the stripped-skin model, were observed to be correlated with clinical findings. Based on TEWL measurements obtained *in vivo* for different types of damaged skin, the *in vitro* percutaneous absorption studies should be performed using skin discs simulating a similar disturbance of their SC barrier function, by tape stripping.

Very recently, Gattu and Maibach⁴⁴ have published a review considering the research carried out on percutaneous absorption by different authors using several methods of skin damage: mechanical, chemical, biocidal as well as *in vitro* tests with clinical disease. In general, all methods of damage resulted in some enhancement of percutaneous absorption of some molecules, most pronounced with hydrophilic molecules and less so with lipophilics. That enhancement was modest although very variable between the different authors implying that despite mechanical, chemical, biocidal-damaged, and clinical disease, not all barrier properties were removed. In our work, the increase of percutaneous absorption depends on the number of strips performed on the skin, and it is different for both compounds investigated. As an example, in the case of caffeine when 25 strips, are previously performed, the increase of percutaneous absorption with respect to the intact skin is about five times; however, in the case of salicylic acid when using 25 strips, the increase of percutaneous absorption is about two times. These results are in accordance with the results presented in that review⁴⁴ because for lipophilic molecules, as is the case for salicylic acid, the increase of the percutaneous absorption in damaged skin is minor. In any case, it is important to design precise reproducible *in vitro* skin damage models considering, in particular, how permeability was

measured. This can be a prerequisite to adopt in the future broad comparisons and even correlations to the *in vivo* studies.

Conclusions

Evaluation of SC integrity (intact or disturbed) can be controlled *in vitro* by the measurement of TEWL. By performing a sequential number of tape strippings on porcine skin discs, it is possible to progressively disturb SC barrier function. Moreover, by means of *in vitro* percutaneous absorption experiments, it is possible to observe the influence of a progressive disturbance of the SC on the percutaneous penetration of different compounds topically applied. In our study, caffeine and salicylic acid showed a completely different behavior on intact compared with progressively barrier-impaired skin. Salicylic acid showed a much higher penetration on intact skin, demonstrating a linear increase with the barrier disturbance. It seems that salicylic acid has a higher affinity towards all the skin layers and that the effect of tape stripping is progressive. However, this was not the case for caffeine, whose low initial percutaneous absorption exponentially increased with barrier disturbance. It is observed that the strong barrier effect of SC until 25 strips may be responsible for the caffeine remaining mainly in the SC. However, after a strong barrier disturbance, caffeine shows a low affinity towards the epidermis and dermis and, consequently, passes directly to the receptor fluid.

This *in vitro* protocol may be useful to simulate the percutaneous absorption profile of some drugs applied onto the skin with a progressive impaired SC barrier function. Moreover, this *in vitro* approach could avoid, to some extent, the use of *in vivo* experimental animal models.

Acknowledgment

The authors acknowledge the financial support of Ministerio de Educación y Ciencia of Spain and the European Social Fund (Programa de Personal Técnico de Apoyo [PTA2007-0335-I]).

References

- 1 Elias PM. Stratum corneum defensive functions: an integrated view. *J Invest Dermatol* 2005; **125**: 183–200.
- 2 Schaefer H, Redemeier TE. *Skin Barrier – Principles of Percutaneous Absorption*. Basel: Karger-Verlag, 1996.
- 3 Elias PM, Feingold KR. Stratum corneum barrier function: definitions and broad concepts. In: Elias PM, Feingold KR, ed. *Skin Barrier*. New York: Taylor and Francis Group, 2006: 1–4.

- 4 Bouwstra JA, Ponc M. The skin barrier in healthy and diseased state. *Biochim Biophys Acta* 2006; **1758**: 280–295.
- 5 Fartasch M. The nature of the epidermal barrier: structural aspects. *Adv Drug Deliv Rev* 1996; **18**: 273–282.
- 6 Kessner D, Ruettinger A, Kiselev MA, et al. Properties of ceramides and their impact on the stratum corneum structure. Part 2: stratum corneum lipid model systems. *Skin Pharmacol Physiol* 2008; **21**: 58–74.
- 7 Howes D, Guy R, Hadgraft J, et al. Methods for assessing percutaneous absorption – the report and recommendations of ECVAM workshop 13. *Altern Lab Anim* 1996; **24**: 81–106.
- 8 OECD. Guideline 428: skin absorption: in vitro method. In: Organisation for Economic Cooperation and Development, eds. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*. Paris: OECD, 2004: 1–8.
- 9 OECD. Guidance document for the conduct of skin absorption studies number 28. In: Organisation for Economic Cooperation and Development, eds. *OECD Series on Testing and Assessment*. Paris: OECD, 2004: 9–31.
- 10 Williams A. *Transdermal and Topical Drug Delivery: From Theory to Clinical Practice*. London: Pharmaceutical Press, 2003.
- 11 Simon GA, Maibach HI. The pig as an experimental animal model of percutaneous permeation in man: qualitative and quantitative observations – an overview. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2000; **13**: 229–234.
- 12 Imokawa G, Abe A, Jin K, et al. Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: an etiologic factor in atopic dry skin? *J Invest Dermatol* 1991; **96**: 523–526.
- 13 Paige DG, Morse-Fisher N, Harper JI. Quantification of stratum corneum ceramides and lipid envelope ceramides in the hereditary ichthyoses. *Br J Dermatol* 1994; **131**: 23–27.
- 14 Motta S, Monti M, Sesana S, et al. Abnormality of water barrier function in psoriasis. Role of ceramide fractions. *Arch Dermatol* 1994; **130**: 452–456.
- 15 Rawlings AV, Watkinson A, Rogers J. Abnormalities in stratum corneum structure, lipid composition and desmosome degradation in soap-induced winter xerosis. *J Soc Cosmet Chem* 1994; **45**: 203–220.
- 16 Rogiers V. EEMCO guidance for the assessment of transepidermal water loss in cosmetic sciences. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2001; **14**: 117–128.
- 17 Rogiers V, Balls M, Basketter D, et al. The potential use of non-invasive methods in the safety assessment of cosmetic products. The report and recommendations of an ECVAM/EEMCO workshop (ECVAM workshop 36). *Altern Lab Anim* 1999; **27**: 515–537.
- 18 Nangia A, Berner B, Maibach HI. Transepidermal water loss measurements for assessing skin barrier functions during in vitro percutaneous absorption studies. In: Bronaugh RL, Maibach HI, eds. *Percutaneous Absorption: Drugs-Cosmetics-Mechanisms-Methodology*. New York: Marcel Dekker, 1999: 587–594.
- 19 Sekkat N, Kalia YN, Guy RH. Porcine ear skin as a model for the assessment of transdermal drug delivery to premature neonates. *Pharm Res* 2004; **21**: 1390–1397.
- 20 Sekkat N, Kalia YN, Guy RH. Development of an in vitro model for premature neonatal skin: biophysical characterization using transepidermal water loss. *J Pharm Sci* 2004; **93**: 2936–2940.
- 21 Kalia YN, Nonato LB, Guy RH. The effect of iontophoresis on skin barrier integrity: non-invasive evaluation by impedance spectroscopy and transepidermal water loss. *Pharm Res* 1996; **13**: 957–960.
- 22 Kalia YN, Alberti I, Sekkat N, et al. Normalization of stratum corneum barrier function and transepidermal water loss in vivo. *Pharm Res* 2000; **17**: 1148–1150.
- 23 Rougier A, Lotte C, Maibach HI. In vivo relationship between percutaneous absorption and transepidermal water loss. In: Wester RC, Maibach HI, eds. *Percutaneous Absorption: Drug-Cosmetics-Mechanisms-Methodology*. New York: Marcel Dekker, 1999: 117–132.
- 24 Levin J, Maibach H. The correlation between transepidermal water loss and percutaneous absorption: an overview. *J Control Release* 2005; **103**: 291–299.
- 25 Aalto-Korte K, Turpeinen M. Transepidermal water loss and absorption of hydrocortisone in widespread dermatitis. *Br J Dermatol* 1993; **128**: 633–635.
- 26 Rougier A, Lotte C, Corcuff P, Maibach HI. Relationship between skin permeability and corneocyte size according to anatomic site, age and sex in man. *J Soc Cosmet Chem* 1988; **39**: 15–26.
- 27 Tsai JC, Sheu HM, Hung PL, Cheng CL. Effect of barrier disruption by acetone treatment on the permeability of compounds with various lipophilicities: implications for the permeability of compromised skin. *J Pharm Sci* 2001; **90**: 1242–1254.
- 28 Chilcott RP, Dalton CH, Emmanuel AJ, et al. Transepidermal water loss does not correlate with skin barrier function in vitro. *J Invest Dermatol* 2002; **118**: 871–875.
- 29 Aalto-Korte K, Turpeinen M. Pharmacokinetics of topical hydrocortisone at plasma level after applications once or twice daily in patients with widespread dermatitis. *Br J Dermatol* 1995; **133**: 259–263.
- 30 Bashir SJ, Dreher F, Chew AL, et al. Cutaneous bioassay of salicylic acid as a keratolytic. *Int J Pharm* 2005; **292**: 187–194.
- 31 Vali A, Asilian A, Khalesi E, et al. Evaluation of the efficacy of topical caffeine in the treatment of psoriasis vulgaris. *J Dermatolog Treat* 2005; **16**: 234–237.
- 32 Dias M, Hadgraft J, Lane ME. Influence of membrane-solute interactions on solute permeation in skin. *Int J Pharm* 2007; **340**: 65–70.

- 33 Kalia YN, Nonato LB, Lund CH, Guy RH. Development of skin barrier function in premature infants. *J Invest Dermatol* 1998; **111**: 320–326.
- 34 Lotte C, Rougier A, Wilson DR, Maibach HI. In vivo relationship between transepidermal water loss and percutaneous penetration of some organic compounds in man: effect of anatomic site. *Arch Dermatol Res* 1987; **279**: 351–356.
- 35 Klimowicz A, Farfal S, Bielecka-Grzela S. Evaluation of skin penetration of topically applied drugs in humans by cutaneous microdialysis: acyclovir vs. salicylic acid. *J Clin Pharm Ther* 2007; **32**: 143–148.
- 36 Nielsen JB. Percutaneous penetration through slightly damaged skin. *Arch Dermatol Res* 2005; **296**: 560–567.
- 37 Nielsen JB, Nielsen F, Sorensen JA. Defense against dermal exposures is only skin deep: significantly increased penetration through slightly damaged skin. *Arch Dermatol Res* 2007; **299**: 423–431.
- 38 Simonsen L, Fullerton A. Development of an in vitro skin permeation model simulating atopic dermatitis skin for the evaluation of dermatological products. *Skin Pharmacol Physiol* 2007; **20**: 230–236.
- 39 Wu XM, Todo H, Sugibayashi K. Effects of pretreatment of needle puncture and sandpaper abrasion on the in vitro skin permeation of fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran. *Int J Pharm* 2006; **316**: 102–108.
- 40 Feldmann RJ, Maibach HI. Absorption of some organic compounds through the skin in man. *J Invest Dermatol* 1970; **54**: 399–404.
- 41 Franz TJ. Percutaneous absorption. On the relevance of in vitro data. *J Invest Dermatol* 1975; **64**: 190–195.
- 42 Franz TJ, Lehman PA, Raney SG. Use of excised human skin to assess the bioequivalence of topical products. *Skin Pharmacol Physiol* 2009; **22**: 276–286.
- 43 Herkenne C, Alberti I, Naik A, *et al.* In vivo methods for the assessment of topical drug bioavailability. *Pharm Res* 2008; **25**: 87–103.
- 44 Gattu S, Maibach HI. Enhanced absorption through damaged skin: an overview of the in vitro human model. *Skin Pharmacol Physiol* 2010; **23**: 171–176.

Article 6

Bicellar systems as vehicle for treatment of impaired skin

J. Control. Release - en revisió

En aquest treball s'avalua la utilitat potencial dels sistemes bicel·lars de DPPC/DHPC per retardar la penetració de fàrmacs a través de la pell quan aquesta té una permeabilitat molt alta degut a que la seva funció barrera està deteriorada, com és el cas de la majoria de patologies de la pell.

Per tal de simular *in vitro* pell amb la funció barrera deteriorada, s'ha dut a terme l'eliminació de diferents capes de l'EC mitjançant l'aplicació seqüencial de 25 tires de cinta adhesiva ("tape strips") a la pell porcina intacta. El principi actiu model utilitzat en aquest estudi ha estat el DDEA. Com a pas previ als estudis d'absorció percutània *in vitro*, s'ha realitzat una caracterització físico-química dels sistemes bicel·lars que contenen el fàrmac. Les tècniques emprades per a aquesta caracterització han estat el SAXS, el WAXS (ambdòs a 25, 32 i 37°C) i el DSC.

En la caracterització físico-química d'aquests sistemes, els resultats de SAXS indiquen una lleugera disminució en l'amplada de la bicapa amb l'augment de la temperatura i l'absència d'apilament dels sistemes bicel·lars. Els valors de WAXS són compatibles amb un empaquetament lateral ortoròmbic en les tres temperatures estudiades. El termograma obtingut per DSC indica una disminució de la T_m quan el fàrmac és introduït en les bicel·les de DPPC/DHPC. Durant els estudis d'absorció percutània *in vitro*, s'ha dut a terme la mesura del TEWL en la pell intacta i la pell amb disfunció de la barrera cutània abans i després de l'aplicació dels sistemes bicel·lars. Les dades obtingudes indiquen un augment del TEWL després de l'eliminació de diverses capes de l'EC i una disminució del TEWL després de l'aplicació durant 24h dels sistemes bicel·lars. En els estudis d'absorció percutània en pell porcina amb la funció barrera deteriorada, s'ha observat un retard en l'absorció del DDEA en sistemes bicel·lars comparat amb una solució aquosa de DDEA igual que va succeir amb pell nativa (Article 1).

L'ús de sistemes bicel·lars de DPPC/DHPC com a vehicle per a l'aplicació tòpica de DDEA sobre pell amb la funció barrera deteriorada inhibeix la penetració del DDEA a nivell sistèmic i sembla reparar, en certa mesura, la funció de barrera de l'EC. Com a conseqüència d'això, aquests sistemes podrien ser una bona estratègia alternativa per tractar tòpicament la pell patològica amb diferents fàrmacs.

Bicellar systems as vehicle for treatment of impaired skin

L. Rubio¹, C. Alonso¹, G. Rodríguez¹, M. Cócera¹, L. Coderch¹, A. de la Maza¹, J. L. Parra¹ and O. López¹

¹IQAC-CSIC, Department of Chemical and Surfactants Technology, Barcelona, Spain.

* Corresponding author: Laia Rubio, Department of Chemical and Surfactants Technology (IQAC-CSIC)
C/ Jordi Girona 18-26, 08034, Barcelona, Spain. Phone: 34-93400 61 00. Fax: 34-93204 59 04. E-mail:
laia.rubio@iqac.csic.es

Abstract

This study assesses the potential usefulness of the bicellar systems of DPPC / DHPC to retard the penetration of drugs into damaged skin which has a very high permeability due to its impaired barrier function. An *in vitro* model of skin with impaired barrier was carried out removing layers of the SC through the sequential application of 25 tape-strips to intact skin. The active principle used in this study was DDEA. As a preliminary step, a physico-chemical characterization of the DDEA bicellar systems at different temperatures with SAXS, WAXS and DSC techniques was performed. Subsequently, percutaneous absorption studies of bicellar systems into impaired skin were realized.

SAXS results indicated a slight decrease in the width of the bilayer with increasing temperature and the absence of stacking of the bicellar systems. WAXS patterns were compatible with an orthorhombic lateral packing in the nanoaggregates. The thermogram obtained by DSC indicated a decrease in T_m when the drug was included into the bicellar systems of DPPC/DHPC. *In vitro* percutaneous absorption studies detected a retardant effect of percutaneous absorption of DDEA when is vehiculized in the bicellar systems respect to an aqueous solution of the drug. The use of bicellar systems of DPPC/DHPC as a vehicle for topical application of DDEA on skin with impaired barrier function inhibits the penetration of DDEA to the systemic level and seems to repair, in some extent, the barrier function of the stratum corneum. These systems could be a good alternative strategy to treat topically pathological skin with different drugs.

Keywords:

Bicellar systems

Diclofenac diethylamine,

Impaired skin

SAXS-WAXS

DSC

In vitro percutaneous absorption

1. Introduction

Several skin diseases are characterized to have a compromised barrier function and to facilitate the appearance of some inflammations. An impaired skin barrier function often results in an increased transepidermal water loss (TEWL) and an enhanced percutaneous permeation [1, 2]. This fact not always is convenient, given that when topically applied an overdose of drug could reach to the systemic level. A commonly used *ex vivo* approach to study the effect of a distorted barrier on drug disposition in the skin is to remove the stratum corneum (SC) by tape stripping, which significantly increases the drug permeation through the skin[3]. This method has been used by our group to simulate the percutaneous absorption profile of some drugs applied onto the skin with a progressive impaired stratum corneum barrier function.[4]

Bicellar systems are aggregates formed by a mixture of long alkyl-chain and short alkyl-chain phospholipids in aqueous solution. The most common aggregates are named bicelles[5, 6], which exhibit an intermediate morphology between lipid vesicles and classical mixed micelles, combining some of the attractive properties of both structures. These systems offer advantages over micelles and liposomes due to their small dimensions and because they are lacking of surfactants on their bilayered structure[7, 8]. These characteristics allowed us to propose bicelles as delivery systems for topical purposes. In fact, very recent studies have used bicellar aggregates for percutaneous absorption of diclofenac[9] and flufenamic acid[10]. Those works described a retardant effect of the drug when is included in bicellar systems. This retardant effect could be very useful to minimize the penetration of drugs to systemic level on damaged skin.

In the present work we evaluate the usefulness of these systems to retard the penetration of drugs into skin whose permeability is very high because its barrier function is damaged. In order to simulate *in vitro* impaired skin, 25 strips to intact porcine skin have been carried out. The drug model used in these studies has been diclofenac diethylamine (DDEA). As a previous step to the percutaneous absorption studies, a characterization of bicellar systems containing the drug has been carried out using small-angle X-ray scattering (SAXS), wide-angle X-ray scattering (WAXS) and differential scanning calorimetry (DSC).

2. Materials and methods

2.1 Chemicals

Diclofenac diethylamine (DDEA) was supplied by Novartis (Basel, Switzerland). Dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) and dihexanoyl phosphatidylcholine (DHPC) were obtained from Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA). Methanol (HPLC Grade), sodium dihydrogen phosphate monohydrate and ortho-phosphoric acid 85% were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Purified water was obtained by an ultra-pure water system, Milli-Q plus 185 (Millipore, Bedford, USA).

2.2 Preparation of bicellar systems

Bicellar systems were formed with DPPC as long-chain alkyl phospholipids and DHPC as short-chain alkyl phospholipids. Bicelles with and without DDEA were prepared. The methodology used for the preparation of these systems was the same as that used in a previous work[9]. The concentration of DDEA included in the bicellar systems was 1.16%, the same that usually containing the commercial gel.

2.3 Characterization of the bicellar systems

2.3.1 X-ray scattering experiments (SAXS, WAXS)

X-ray scattering measurements were performed with a SAXS/WAXS S3 MICRO (Hecus GmbH, Graz, Austria). An X-ray radiation with a wavelength corresponding with the Cu K α line (1.542 Å) was used. The linear detector used was a PSD 50M (Hecus, Graz, Austria) which allows simultaneous sampling of diffraction data in the small- and the wide-angle region. Automatic temperature control was provided by a programmable Peltier unit (TCCS-3, Hecus GmbH, Graz, Austria) (precision better than ± 0.5 °C). The sample was injected into a flow-through glass capillary that was 1 mm in diameter (Hilgenberg GmbH, Malsfeld, Germany).

The scattering intensity I (in arbitrary units) was measured as a function of the scattering vector q (in reciprocal Å). The latter is defined as:

$$q = (4\pi \sin\theta)/\lambda,$$

where θ is the scattering angle and λ the wavelength of the radiation (1.542 Å). The position of the scattering peaks is directly related to the repeat distance of the molecular structure, as described by Bragg's law:[11]

$$2d \sin \theta = n\lambda$$

in which n and d are the order of the diffraction peak and the repeat distance, respectively. In the case of a lamellar structure, the various peaks are located at equidistant positions, then

$$q_n = 2\pi n/d$$

where q_n is the scattering vector modulus that indicates the position of the n^{th} order reflection.

2.3.2 Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Differential scanning calorimetry (DSC) measurements of DPPC/DHPC and DPPC/DHPC/DDEA systems were performed with a DSC 821E Mettler Toledo (Greifensee, Switzerland) calorimeter. Aliquots of 30 μL from the DPPC/DHPC and DPPC/DHPC/DDEA bicellar systems, corresponding to 4.356 mg and 4.074 mg of DPPC respectively, were placed in 40 μL aluminium DSC pans and hermetically sealed. Three heating/cooling cycles were performed in a temperature range between 0 and 60 $^{\circ}\text{C}$ at a constant scanning rate of 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. The data from the first scan were always discarded to avoid mixing artifacts. Due to the supercooling phenomenon only heating scans have been used throughout this work.[12] DSC curves were obtained and analyzed by STAR 9.2 Software (Mettler Toledo).

2.4 HPLC analysis of diclofenac

The quantitative determination of DDEA was performed by HPLC using a Hitachi LaChrom Elite equipment (Darmstadt, Germany). The apparatus consists of an L-2130 pump, L-2200 autosampler and an L-2400 UV detector. The system was operated from the software Merck EZChrom Elite v3.1.3. Then 20 μL of injection volume were eluted in a Lichrocart 250-4/Lichrosorb RP-18 (5 μm) column (Merck, Germany) at room temperature. DDEA was monitored by UV detection at 254 nm. A mobile phase consisting of a 66% methanol and 34% phosphate buffer (pH 2.5) was used at a flow rate of 1 ml/min. The area under the peak was used to calculate the concentration of

DDEA using external standards that showed linearity over the concentration range of 0.33 to 83 µg/ml. The intraday and interday variations of the method were less than 2%.

2.5 *In vitro* percutaneous absorption methodology using impaired skin

Following a conventional methodology, pig skin from the unboiled back of Landrace large white pigs weighing between 30–40 Kg is used. The pig skin was provided by the Clínic Hospital of Barcelona, Spain. The methodology used to obtain the skin biopsies was the same as used in previous works[4, 9].

Franz cells (Lara-Spiral, Courtenon, France) were used to perform the percutaneous absorption studies and PBS (pH 7.4) in distilled water, containing 1% of bovine serum albumin and 0.04% gentamicin sulphate was used as the receptor fluid (RF). Franz cells were kept at 37 ± 1 °C by means of a circulating water bath (Julabo Labortechnik GmbH, Germany) to ensure that the surface skin was maintained at 32 ± 1 °C. The integrity of each skin sample was checked by determining the transepidermal water loss (TEWL) using a Tewameter TM210 (Courage-Khazaka, Köln, Germany).

In this work, percutaneous absorption experiments were carried out using samples of impaired skin. The skin barrier impairment was induced by use of the tape stripping method. To do that, after checking the skin integrity, each intact biopsy was subjected to 25 sequential strips using D-Squame[®] tape discs (22 mm diameter, CuDerm Inc., Dallas, USA).). Each tape was applied to the skin surface using a specific device securing a standard pressure of 80 g/cm² (for 5 s) and removed from the test area in one gentle movement. For each repeated strip, the tearing-off direction was varied to obtain a homogeneous removal of the SC cell layers. After that, the skin biopsies were mounted to the Franz diffusion cells and after 1h, TEWL was measured to verify the impairment of the skins.

The diffusion experiment was initiated by applying to the entire surface, delimited by the upper cell, 10 µL of aqueous solution of DDEA or DDEA bicellar systems. After the exposure time (24h), TEWL was measured. Then, the test formulation remaining on the skin surface was removed. The receptor fluid was collected and brought up to 5 ml in a volumetric flask. The SC of the treated skin area was removed by 8 successive tape strips. After that, the viable epidermis was separated from the dermis after heating the skin at 80°C for a few seconds.

The amount of DDEA in the different layers and in the washing solution was extracted with a solution of methanol: water (50:50). Before the analytical determination by

HPLC, the samples were filtered through a 0.45 μm Acrodisc filter (Pall Gelman Sciences, Northampton, UK).

2.6 Statistical analysis

The percentage of DDEA content values in the different skin layers from the percutaneous absorption studies are expressed as the mean \pm standard deviation (SD) for six determinations. For group comparisons, analysis of variance (ANOVA) with a one-way layout was applied. The software used was the STATGRAPHICS plus 5. Significant differences in the mean values were evaluated by the Student's unpaired *t*-test. A *p* value of less than 0.05 was considered significant.

3. Results

3.1 Characterization of the bicellar systems

3.1.1 Structural study by X-ray diffraction

To elucidate the structural effects of the incorporation of DDEA on DPPC/DHPC bicelles, a series of SAXS/WAXS studies were carried out at three different temperatures (25, 32.5 and 37°C).

SAXS provides information on the larger structural units of a given sample. In our case, the lamellar repeat distance *d* was estimated from the analysis of the peaks by Bragg's law and was attributed to the bilayer thickness, as in the studies with liposomes and other bilayer models.[13, 14] Fig. 1A shows the SAXS patterns of the DDEA bicellar system at the three temperatures studied. At 25, 32 and 37°C, a broad band centred at $q=0.119 \text{ \AA}^{-1}$, $q=0.121 \text{ \AA}^{-1}$ and $q=0.122 \text{ \AA}^{-1}$ appeared, respectively, corresponding to the *d* values of 53, 52 and 51 \AA . Thus, these results show a slight decrease in the bilayer thickness of the DDEA bicellar systems when the temperature increases. Additionally, and considering the absence of multiple sharp peaks in the scattering patterns, we can deduce that these bicellar systems do not form lamellar sheets and/or stacks.

Scattering in the WAXS region reveals the lateral chain packing of the lipids. WAXS diffraction spectra for DDEA bicellar systems at 25, 32.5 and 37°C are shown in Fig. 1B. At the three temperatures investigated, two broad bands were observed; these bands were detected at *q* values of 1.49 and 1.65 \AA^{-1} , corresponding to a lipid chain-chain

distance (d_c) of 4.2 and 3.8 Å. These spacings are compatible with an orthorhombic packing such as other authors described [15, 16].

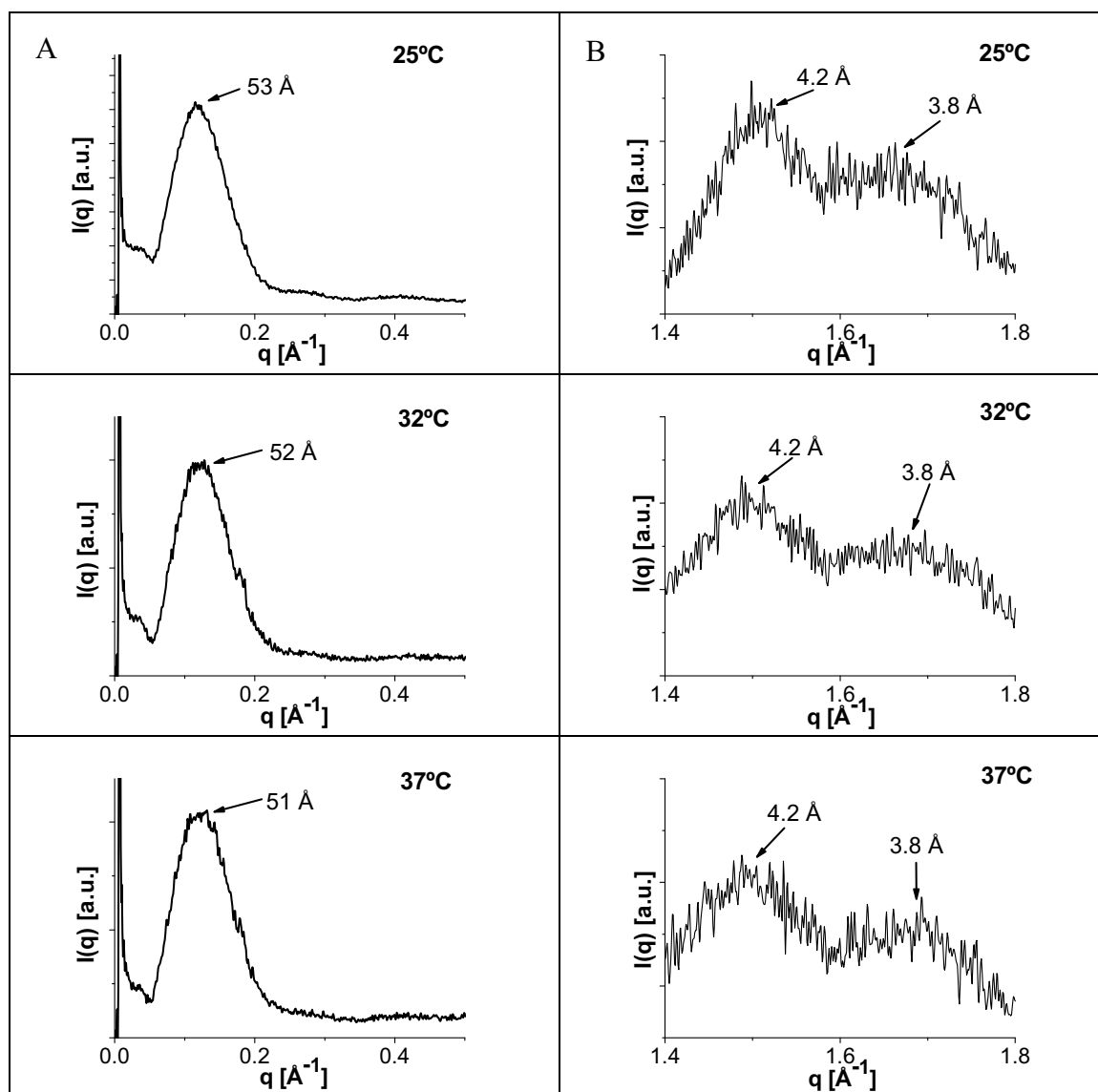


Fig. 1. SAXS (A) and WAXS (B) intensity profile versus the scattering vector modulus q of DPPC/DHPC/DDEA bicellar systems. The measurements were carried out at 25 °C, 32.5 °C and 37 °C.

3.1.2 Differential Scanning Calorimetry

The calorimetric analysis was performed in order to determine the heat flow associated with the lipid phase transitions of the long alkyl chain phospholipid in DPPC/DHPC bicelles with and without DDEA. When phosphatidylcholine systems are investigated, the more common phase transitions described in the literature are a subtransition corresponding to a change of phase from lamellar crystalline (L_c) to a tilted gel phase

($L_{\beta'}$), a pretransition from $L_{\beta'}$ to ripple phase or undulated-lamellar phase ($P_{\beta'}$) and a main transition from whatever of the previously mentioned phases to liquid crystalline phase (L_{α}). [17, 18] The temperature associated with this latter transition is the so called gel-to-liquid crystalline transition temperature, T_m [18]. DSC can be used to detect interactions between the DDEA and the DPPC forming the bicellar systems. It is well known that the inclusion of a new molecule in the phospholipid bilayers can modify the lipid packing mode provoking a change in the temperature and in some cases in the enthalpy (ΔH) of the different lipid phase transitions. [19, 20] The results of the experiments are shown in Fig. 2.

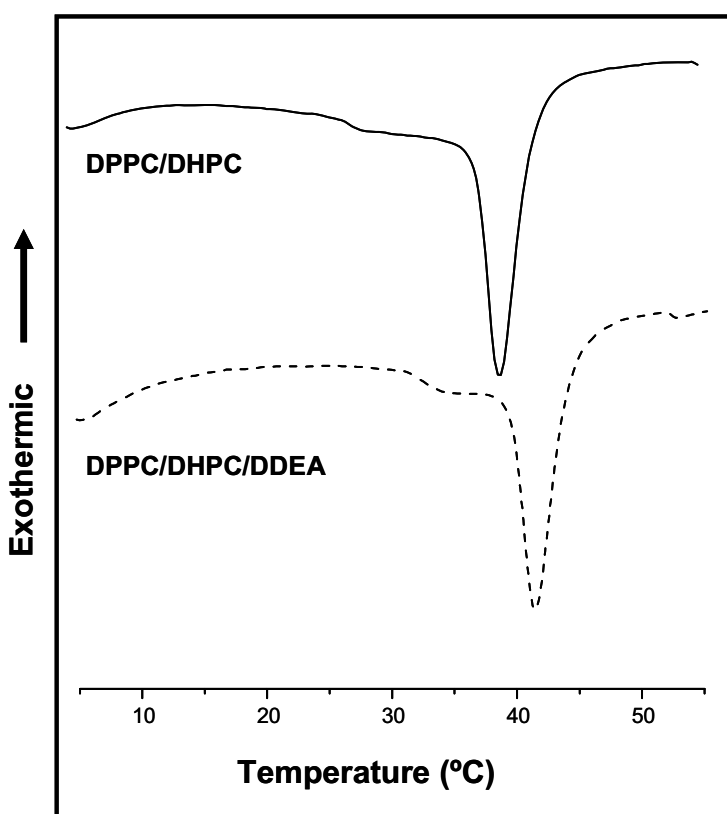


Fig. 2. DSC thermogram of DPPC bicellar systems with (solid line) and without (dashed line) DDEA.

The signals observed in the thermograms are only associated to DPPC because DSC thermograms of DHPC at this temperature range (results not shown) exhibited no peaks and the melting point of DDEA is 127 °C (out of the temperature range investigated). [21] A quantitative determination of all enthalpies was not feasible, due to the broadening peaks. Only the main transition enthalpies were determined giving approximate values owing to the overlapping of the peaks.

The thermogram for DPPC/DHPC bicelles shows a large peak and a small shoulder peak. The large peak at higher temperature (41.1 °C) corresponds to the main transition (T_m) associated to the P_β to L_α transition of the DPPC alkyl chains and has an associated enthalpy of about 16 KJ/mol. The small shoulder peak at around 35°C is compatible with the pretransition of the pure DPPC systems. The curve associated to the DPPC transitions when DDEA is included in the DPPC/DHPC bicelles present also a large peak and a small shoulder peak. The large peak associated to the main transition was detected at 39°C with an enthalpy value of about 18 KJ/mol. The small shoulder associated with the pretransition was detected at around 29 °C. It is noted that when DDEA is included in the DPPC/DHPC bicellar systems, the temperatures associated to the transitions decrease.

3.2 TEWL results before and after skin impairment

TEWL measurements before and after impairment of skin barrier by 25 tape strippings of the SC are shown in Fig. 3. Also, in this figure the TEWL values measured on damaged skin after topical application of DDEA bicellar systems are presented. The TEWL value of intact skin was 6.5 ± 1.3 g/m²/h and after 25 tape strippings this value increases up to 33.9 ± 6.5 g/m²/h. As it could be expected a clear increase of the TEWL was induced by the impairment of the SC barrier. When this damaged skin was treated with the DDEA bicellar systems a decrease of TEWL until 22.4 ± 7.5 g/m²/h was detected after 24h of exposure time. This result indicates certain restoring of the barrier function by effect of treatment with DDEA bicellar systems.

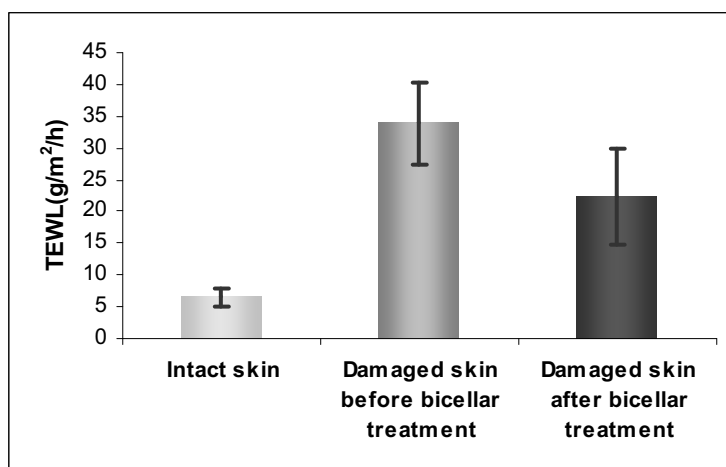


Figure 3. TEWL values of intact skin and damaged skin before and after of DDEA bicellar systems treatment. Bars are the TEWL values (mean of $n = 6$) and the errors bars are the standard deviations (S.D.).

3.3 Percutaneous absorption studies

After 24h of exposure time, a lipidic film on the skin surface was visualized in samples treated with bicellar systems. The percutaneous absorption profiles of DDEA vehiculized in bicellar systems compared with DDEA in an aqueous solution (1.16%) (w/v) are shown in Fig. 4. This figure presents the distribution of DDEA in the different skin layers and in the receptor fluid (RF) after 24h of exposure time. The results are expressed as a percentage of the applied dose on the skin. In both vehicles, about 100 % of the DDEA applied was recovered.

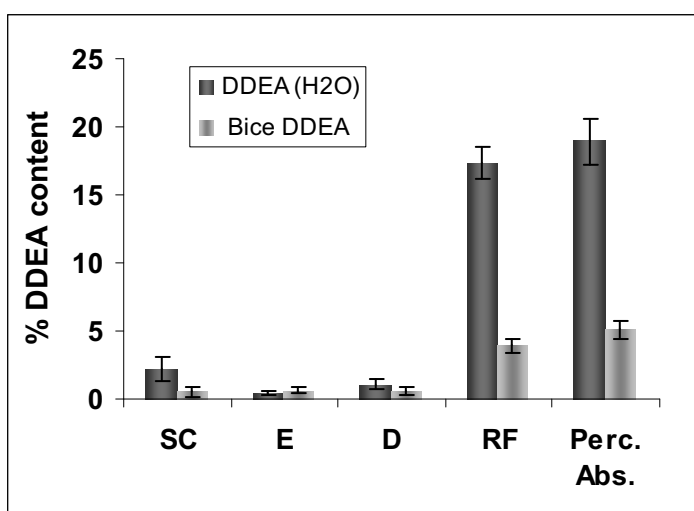


Fig. 4. Distribution of DDEA content in the different compartments after an skin exposure of 24h. Amounts detected in the stratum corneum (SC), epidermis (E), dermis (D), receptor fluid (RF) and the total percutaneous absorption (Perc. Abs.). Bars are the % of applied dose (mean of $n = 6$) and the errors bars are the standard deviations (S.D.).

Most DDEA remained in the skin surface in both cases (results not shown). In the case of SC, DDEA is more retained when is applied in the aqueous solution (2.20 ± 0.89 %) than when is vehiculized in bicellar systems (0.58 ± 0.37 %). However in the epidermis (E) the DDEA behaviour is the opposite, DDEA is more retained when is included in bicellar systems (0.63 ± 0.21 %) than when is dissolved in an aqueous solution (0.40 ± 0.15 %). In the dermis (D), the absorption of DDEA was again greater when the drug was applied in an aqueous solution (1.10 ± 0.35 %) than in the bicellar systems (0.53 ± 0.31 %). Regarding the RF, when DDEA was solubilized in water, the absorption was 17.40 ± 1.15 %, whereas vehiculized in bicellar systems was considerable lower 3.92 ± 0.49 %. The values obtained in the absorption of DDEA in SC and RF presented differences statistically significant when DDEA was vehiculized in both vehicles. In terms of global percutaneous absorption (considering the DDEA detected in E, D plus

RF), it seems that DDEA in water is able to penetrate through the skin with compromised barrier function 3 times more than DDEA vehiculized in bicelles.

Then, in these conditions, bicellar systems work as retarder of the percutaneous penetration of DDEA.

4. Discussion

4.1 DDEA bicellar systems characterization

In a recent work, we demonstrated the incorporation of DDEA in bicellar systems[9]. In that previous work, an initial characterization showed a decrease in the particle size of the DPPC/DHPC bicellar systems when DDEA was included. This phenomenon was explained considering that DDEA have a similar effect as DHPC in the discoidal structure, having a tendency to locate at the edges of the lamellar structure. The DHPC molecules displaced by DDEA would be incorporated in the bilayer structure together with DPPC molecules. Also, some molecules of DDEA could be incorporated in the lipidic bilayer due its amphiphilic nature as Lopes et al. [22] published when this active principle was encapsulated in soya phosphatidylcholine (PC) liposomes.

In the present work, a complementary characterization was carried out. SAXS bands at the three temperatures studied, indicated a decrease of the bilayer thickness (from about 58 Å to about 52 Å) compared with the results published recently about the SAXS bands of DPPC/DHPC bicellar systems [23]. This decrease can be due to the incorporation of DDEA or/and DHPC molecules in the lipid bilayer. In both cases this incorporation is corroborated by the DSC results. These results showed a decrease in the T_m of DPPC from 41.1 °C to 39°C and in the pre-transition temperature from 35°C to 29°C when DDEA is included in DPPC/DHPC bicellar systems. This decrease in the temperature indicates an alteration in the organization of the lipid gel state which can be produced by the inclusion of DDEA, DHPC or both in the DPPC bilayer. The decrease in the T_m was also reported by Manrique-Moreno et al. [24] in the study of the interaction of DDEA with dimyristoyl phosphatidylcholine (DMPC). That paper describes the ability of DDEA to alter the cooperativity of the phase transition inducing a decrease in T_m . Also, other works that published about the inclusion in bicellar systems of different substances as surfactants [25], cholesterol sulphate [26], ceramides [13, 27] and flufenamic acid [23] reported changes in the bicellar structures. Some of these papers explained a lowering of the T_m when a substance is included in the bilayer

structure of bicelles. In our case, it is possible that the hydrophilic part of DDEA interacts with the phospholipid headgroups forming in some cases hydrogen bonding while the hydrophobic part could interact with the hydrophobic lipid acyl chain region. The smaller size of the DDEA molecules compared with the DPPC molecules could create an extra space in the non-polar region of the lamellar bilayer. To fill these spaces, the acyl chains of DPPC have three possibilities: The first one could be a disorganization of the bilayer, but the WAXS results indicate an orthorhombic lateral packing like the results published for DPPC/DHPC bicellar systems without the drug [23]. This fact makes this hypothesis unlikely. Another explanation is that these “gaps” may be filled by the tilt of the hydrocarbon chains of the DPPC molecules, which would also explain the reduction in interlayer spacing detected by SAXS. This possibility agrees with other authors when describing interaction of amphiphilic drugs with liposomes [22, 28]. The last possibility is the inclusion of DDEA into the headgroup region. This fact would increase the area requirement of the headgroups and would lead an interdigitation of the acyl chains to decrease the mismatch of area requirements between heads and tails. This argument was reported by other authors to explain the reduction of the lamellar thickness produced for the incorporation of some anti-inflammatory drugs [29, 30]. Although both options, tilting and interdigitation are feasible, the interdigitation of the alkyl chains is energetically more favourable than a strong tilting of the chains [29].

The inclusion of DHPC in the DPPC bilayer promotes also the decrease in the T_m . DHPC has been described as a mild surfactant[31] and some authors have reported that most surfactants tend to shift the T_m of lipids to lower values[32]. Then, their addition to a gel membrane may ‘melt’ lipids. In the particular case of DPPC, some works referred this decrease of T_m by addition of $C_{12}EO_5$ [33], DPPC- $C_{12}EO_4$ [34], $C_{12}Gluc$ [35] and $C_{12}Malt$ [35]. The DHPC molecules displaced by DDEA would be incorporated in the lipidic bilayer together with DPPC molecules, with its polar head in contact with the aqueous medium and the apolar alkyl chains into the hydrophobic alkyl core. The polar heads of both DPPC and DHPC are the same and this fact explains the no differences in the WAXS results between DPPC/DHPC bicellar systems with and without the drug. Moreover, the decrease in the bilayer thickness is also explained due to the shorter alkyl chains of DHPC. This difference in the alkyl chain length could create an extra space as in the case of the DDEA inclusion explained above. This extra space in the alkyl chain region would induce an interdigitation or a bending of the

DPPC alkyl chains leading a decrease of the bilayer thickness as it can be see in the SAXS results.

These arguments support that some molecules of DDEA induce a displacement of DHPC from the edges to the DPPC bilayer. Also, other DDEA molecules are incorporated in the DPPC bilayer. In summary, the inclusion of DDEA induces the mixture of these components in the bicellar structure promoting the reduction of the T_m values and the bilayer thickness. This finding is in concordance with the small and spherical shape of these DPPC/DHPC/DDEA systems detected by transmission electron microscopy (TEM) and published in a previous work [9].

4.2 Topical application of DDEA bicellar systems in impaired skin

The simulation of *in vitro* impaired skin by tape stripping has been previously described by our group [4] and other authors [1, 3] due its accessibility and simplicity. This methodology induces and impairment of the SC increasing significantly the TEWL. Simonsen et al.[3] developed an *in vitro* skin permeation model simulating atopic dermatitis skin by applying 25 tape strips to intact skin, the barrier impairment was evaluated by TEWL. The skin permeation results obtained through this impaired skin were found to correlate with clinical findings. According to the results obtained in that work, we decided to use 25 strips to simulate *in vitro* impaired skin.

The application of bicelles containing DDEA on the *in vitro* impaired skin induced a certain occlusion of the skin with the corresponding diminution of the TEWL. This occlusion is due to a lipidic film formed after the evaporation of the water of the bicellar systems. This effect was also detected by other authors in the use of liposomes topical applied *in vivo* which reduces TEWL giving to the patient immediate relief from the discomfort associated with dry skin [36, 37]. The TEWL diminution envisaged in Fig. 3 can also be due to a certain restoration effect promoted by DDEA bicellar systems. This system (without drug) has demonstrated in previous papers to work as repairing agent of the SC lipid structure [7].

As regards to the percutaneous absorption studies, DDEA in bicelles has a favourable tendency to pass through the SC (proportion of DDEA in SC in very low, Fig. 4). This fact could be due to a higher affinity of DDEA with the lipids of the bicelle than with the intercellular lipids of the SC. This affinity can be explained by the hydrogen bonding possibly formed between DDEA and the phospholipids from bicelles. In the case of E and D layers, the content of DDEA detected when the drug is applied in both

vehicles is very similar. Therefore, the content of DDEA available in E and D does not decrease much when is vehiculized in bicellar systems.

In RF the content of DDEA in water is statistically very high as compared with DDEA in the bicellar system. This particular behaviour of DDEA vehiculized in water can be considered normal because the barrier function of the skin has been compromised due to the tape stripping and consequently the percutaneous absorption is enhanced [38]. Then, it is interesting the retardant effect of bicellar systems on the DDEA topical absorption in damaged skin. This behaviour is consistent with the work of Bouwstra et al[39] who reports that gel-state vesicles can inhibit drug permeation across the skin. Considering the DPPC/DHPC/DDEA T_m (39°C) and the temperature of application (32°C), DDEA bicellar systems were also applied on a gel state. In addition, the retardant effect detected on percutaneous absorption of DDEA included in a bicellar system may be justified by the preferential interaction of the active principle with the lipids constituent of the bicelles. This retardant effect of bicellar systems agrees with previous published data in which this effect was described when drugs are applied on native skin [40].

This retardant effect of bicelles (decreasing the percutaneous absorption) as well as their occlusive action on the skin surface (lowering the TEWL results) can be useful for the improvement of the therapeutic characteristics of DDEA when this drug is applied on impaired skin. This is specially interesting because, in most of the skin diseases, the skin inflammatory process induces a deterioration of the EC [41].

5. Conclusions

The use of DPPC/DHPC bicellar systems as vehicle for topical application of DDEA on impaired skin inhibits the penetration of DDEA to systemic level and seems to repair, in some extent, the barrier function. As a consequence, these systems may be a good alternative strategy to treat damaged skin with different drugs.

Acknowledgements

The authors acknowledge Ministerio de Educación y Ciencia, Spain (CTQ2010-16964) and Generalitat de Catalunya (2009 SGR 1212). This work was supported by European Social Fund (Programa Nacional de Potenciación de Recursos Humanos del Plan Nacional de I+D+I (2004-2008)). Mercedes Cócera is funded by JAE-Doc Program

from CSIC. Also, the authors wish to thank Jaume Caelles and Josep Carilla for expert assistance with the techniques used in this work.

References

- [1] S. Gattu, H.I. Maibach, Enhanced absorption through damaged skin: an overview of the in vitro human model, *Skin Pharmacol Physiol*, 23 (2010) 171-176.
- [2] J. Levin, H. Maibach, The correlation between transepidermal water loss and percutaneous absorption: an overview, *J Control Release*, 103 (2005) 291-299.
- [3] L. Simonsen, A. Fullerton, Development of an in vitro skin permeation model simulating atopic dermatitis skin for the evaluation of dermatological products, *Skin Pharmacol Physiol*, 20 (2007) 230-236.
- [4] L. Rubio, C. Alonso, O. López, G. Rodríguez, L. Coderch, J. Notario, A. de la Maza, J.L. Parra, Barrier function of intact and impaired skin: percutaneous penetration of caffeine and salicylic acid, *International Journal of Dermatology*, 50 (2011) 881-889.
- [5] J. Katsaras, T.A. Harroun, J. Pencer, M.P. Nieh, "Bicellar" lipid mixtures as used in biochemical and biophysical studies, *Naturwissenschaften*, 92 (2005) 355-366.
- [6] C.R. Sanders, 2nd, G.C. Landis, Reconstitution of membrane proteins into lipid-rich bilayered mixed micelles for NMR studies, *Biochemistry*, 34 (1995) 4030-4040.
- [7] L. Barbosa-Barros, A. de la Maza, J. Estelrich, A.M. Linares, M. Feliz, P. Walther, R. Pons, O. López, Penetration and growth of DPPC/DHPC bicelles inside the stratum corneum of the skin, *Langmuir*, 24 (2008) 5700-5706.
- [8] G. Rodríguez, L. Barbosa-Barros, L. Rubio, M. Cócera, C. López-Iglesias, A. de la Maza, O. López, Bicellar systems as modifiers of skin lipid structure, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 84 (2011) 390-394.
- [9] L. Rubio, C. Alonso, G. Rodríguez, L. Barbosa-Barros, L. Coderch, A. De la Maza, J.L. Parra, O. López, Bicellar systems for in vitro percutaneous absorption of diclofenac, *Int. J. Pharm.*, 386 (2010) 108-113.
- [10] L. Rubio, G. Rodríguez, L. Barbosa-Barros, C. Alonso, M. Cócera, A. de la Maza, J.L. Parra, O. López, Bicellar systems as a new colloidal delivery strategy for skin, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 92 (2011) 322-326.
- [11] W.L. Bragg, The Diffraction of Short Electromagnetic Waves by a Crystal, in: *Proceedings of the Cambridge Philosophical Society*, 1913, pp. 43-57.
- [12] R.A. Videira, M.C. Antunes-Madeira, V.M. Madeira, Perturbations induced by alpha- and beta-endosulfan in lipid membranes: a DSC and fluorescence polarization study, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 1419 (1999) 151-163.
- [13] L. Barbosa-Barros, A. de la Maza, C. López-Iglesias, O. López, Ceramide effects in the bicelle structure, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 317 (2008) 576-584.
- [14] O. López, M. Cócera, L. Campos, A. de la Maza, L. Coderch, J.L. Parra, Use of wide and small angle X-ray diffraction to study the modifications in the stratum corneum induced by octyl glucoside, *Colloids Surf., A*, 162 (2000) 123-130.
- [15] G.S. Pilgram, A.M. Engelsma-van Pelt, H.K. Koerten, J.A. Bouwstra, The effect of two azones on the lateral lipid organization of human stratum corneum and its permeability, *Pharm. Res.*, 17 (2000) 796-802.
- [16] G. Rodríguez, L. Barbosa-Barros, L. Rubio, M. Cócera, A. Díez, J. Estelrich, R. Pons, J. Caelles, A.D.I. Maza, O. López, Conformational Changes in Stratum Corneum Lipids by Effect of Bicellar Systems, *Langmuir*, 25 (2009) 10595-10603.

- [17] C. Huang, S. Li, Calorimetric and molecular mechanics studies of the thermotropic phase behavior of membrane phospholipids, *Biochim. Biophys. Acta, Rev. Biomembr.*, 1422 (1999) 273-307.
- [18] R. Koynova, M. Caffrey, Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines, *Biochim. Biophys. Acta, Rev. Biomembr.*, 1376 (1998) 91-145.
- [19] M. Lucio, F. Bringezu, S. Reis, J.L. Lima, G. Brezesinski, Binding of nonsteroidal anti-inflammatory drugs to DPPC: structure and thermodynamic aspects, *Langmuir*, 24 (2008) 4132-4139.
- [20] B. Pili, C. Bourgaux, H. Amenitsch, G. Keller, S. Lepetre-Mouelhi, D. Desmaele, P. Couvreur, M. Ollivon, Interaction of a new anticancer prodrug, gemcitabine-squalene, with a model membrane: coupled DSC and XRD study, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 1798 (2010) 1522-1532.
- [21] L.F. Manli Wang, Percutaneous absorption of diclofenac acid and its salts from emulgel, *AJPS*, 3 (2008) 131-141.
- [22] L.B. Lopes, M.V. Scarpa, G.V. Silva, D.C. Rodrigues, C.V. Santilli, A.G. Oliveira, Studies on the encapsulation of diclofenac in small unilamellar liposomes of soya phosphatidylcholine, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 39 (2004) 151-158.
- [23] L. Rubio, G. Rodriguez, C. Alonso, C. Lopez-Iglesias, M. Cocera, L. Coderch, A. De la Maza, J.L. Parra, O. Lopez, Structural effects of flufenamic acid in DPPC/DHPC bicellar systems, *Soft Matter*, (2011).
- [24] M. Manrique-Moreno, P. Garidel, M. Suwalsky, J. Howe, K. Brandenburg, The membrane-activity of Ibuprofen, Diclofenac, and Naproxen: a physico-chemical study with lecithin phospholipids, *Biochim Biophys Acta*, 1788 (2009) 1296-1303.
- [25] M. Kozak, L. Domka, S. Jurga, The effect of selected surfactants on the structure of a bicellar system (DMPC/DHPC) studied by SAXS, *J. Mol. Struct.*, 846 (2007) 108-111.
- [26] R.A. Shapiro, A.J. Brindley, R.W. Martin, Thermal Stabilization of DMPC/DHPC Bicelles by Addition of Cholesterol Sulfate, *J. Am. Chem. Soc.*, 132 (2010) 11406-11407.
- [27] L. Barbosa-Barros, A. De la Maza, P. Walther, J. Estelrich, O. López, Morphological effects of ceramide on DMPC/DHPC bicelles, *J. Microsc. (Oxford, U. K.)*, 230 (2008) 16-26.
- [28] I. Stoye, K. Schroder, C.C. Muller-Goymann, Transformation of a liposomal dispersion containing ibuprofen lysinate and phospholipids into mixed micelles - physico-chemical characterization and influence on drug permeation through excised human stratum corneum, *Eur J Pharm Biopharm*, 46 (1998) 191-200.
- [29] C. Nunes, G. Brezesinski, J.L. Lima, S. Reis, M. Lucio, Synchrotron SAXS and WAXS study of the interactions of NSAIDs with lipid membranes, *J Phys Chem B*, 115 (2011) 8024-8032.
- [30] C. Nunes, G. Brezesinski, J.L.F.C. Lima, S. Reis, M. Lucio, Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the structure of lipid bilayers: therapeutical aspects, *Soft Matter*, 7 (2011) 3002-3010.
- [31] H. Helmut, Short-chain phospholipids as detergents, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1508 (2000) 164-181.
- [32] H. Heerklotz, Interactions of surfactants with lipid membranes, *Quarterly Reviews of Biophysics*, 41 (2008) 205-264.
- [33] H. Pfeiffer, G. Klose, K. Heremans, C. Glorieux, Thermotropic phase behaviour of the pseudobinary mixtures of DPPC/C12E5 and DMPC/C12E5 determined by differential scanning calorimetry and ultrasonic velocimetry, *Chemistry and Physics of Lipids*, 139 (2006) 54-67.

- [34] B. Mädler, G. Klose, A. Möps, W. Richter, C. Tschierske, Thermotropic phase behaviour of the pseudobinary mixture DPPC/C12E4 at excess water, *Chemistry and Physics of Lipids*, 71 (1994) 1-12.
- [35] B. Carion-Taravella, S. Lesieur, J. Chopineau, P. Lesieur, M. Ollivon, Phase Behavior of Mixed Aqueous Dispersions of Dipalmitoylphosphatidylcholine and Dodecyl Glycosides: A Differential Scanning Calorimetry and X-ray Diffraction Investigation, *Langmuir*, 18 (2001) 325-335.
- [36] J. De Leeuw, H.C. De Vijlder, P. Bjerring, H.A.M. Neumann, Liposomes in dermatology today, *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 23 (2009) 505-516.
- [37] H. Lautenschlager, Liposomes in dermatological preparations. Part 1, *Cosmet Toiletries*, 105 (1990) 89-96.
- [38] D. Frank, Z. Hongbo, L. Harald, C. Myeong Jun, M. Howard, Effect of Tape Stripping on Percutaneous Penetration and Topical Vaccination, in: *Percutaneous Absorption*, Informa Healthcare, 2005, pp. 811-821.
- [39] J.A. Bouwstra, P.L. Honeywell-Nguyen, G.S. Gooris, M. Ponec, Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations, *Progress in Lipid Research*, 42 (2003) 1-36.
- [40] L. Rubio, G. Rodríguez, L. Barbosa-Barros, C. Alonso, M. Cócera, A. de la Maza, J.L. Parra, O. López, Bicellar systems as a new colloidal delivery strategy for skin, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 92 (2012) 322-326.
- [41] S. Rahman, M. Collins, C.M. Williams, H.L. Ma, The pathology and immunology of atopic dermatitis, *Inflamm Allergy Drug Targets*, 10 (2011) 486-496.

4. DISCUSSIÓ

4. DISCUSSIÓ

4.1 Caracterització físico-química dels sistemes bicel·lars

Inicialment, es van triar els nanoagregats de DMPC/DHPC i DPPC/DHPC com a nous sistemes de vehiculització; ambdós amb una relació molar entre el fosfolípid de cadena alquílica llarga i el de cadena alquílica curta, $q=2$, i una concentració lipídica del 20%. Els resultats de DLS (Taula 1 de l'article 1) van donar unes mides de partícula d'entre 14 i 15 nm en els dos casos. Per tant, tant els sistemes de DMPC/DHPC com els formats per DPPC/DHPC podien ser, en un principi, bons candidats per al seu ús com a vehicles, donada la seva composició lipídica i la seva mida de partícula. Però a mesura que han anat avançant les investigacions d'aquesta tesis, paral·lelament també s'anaven coneixent resultats de l'aplicació d'aquests sistemes bicel·lars *in vivo* descrits pel nostre grup d'investigació (Barbosa-Barros i cols, 2009). Dels resultats obtinguts en aquests estudis es pot treure la conclusió de que els sistemes bicel·lars de DPPC són millors per a l'aplicació tòpica que els de DMPC ja que aquests últims produïen més variació de paràmetres físico-químics de la pell que els de DPPC. A més, una altra explicació de la conveniència dels sistemes de DPPC davant dels de DMPC és que a temperatura fisiològica (aprox. 37 °C), el DPPC està en fase gel, ja que té una T_m de 41 °C (Reeves i cols, 2007), igual que els lípids de l'EC (T_m d'aproximadament 60 °C)(Golden i cols, 1987). En canvi, el DMPC té una T_m d'aproximadament 23 °C (Sternin i cols, 2001), i per tant a la temperatura en que es troba la pell els sistemes de DMPC/DHPC estan en fase líquida. Per aquest motiu, les bicel·les de DPPC no canvien ni de fase ni de morfologia a l'aplicar-se sobre la pell; en canvi, les bicel·les de DMPC sí que pateixen canvis de fase i morfològics.

4.1.1 Canvis estructurals i morfològics provocats en els sistemes bicel·lars per la inclusió d'un principi actiu

4.1.1.1 Incorporació del DDEA

La incorporació del DDEA en els sistemes bicel·lars va conduir a una disminució dràstica en la mida de partícula mesurada per DLS per ambdós sistemes, de 14,0 nm a 2,4 nm en el cas del DMPC/DHPC i de 15,2 nm a 2,8 nm en el cas dels sistemes de DPPC/DHPC (Taula 1 de l'article 1). Aquestes mides de partícules estan dins de l'interval de formació de sistemes bicel·lars ja que la mida mínima de les vesícules és de l'entorn de 20 nm (Cornell i cols, 1982). La disminució de la mida per efecte del DDEA es pot entendre considerant que els fàrmacs amb un cert caràcter tensioactiu, com els compostos antiinflamatoris no esteroides, es poden auto-associar a membranes unint-se a elles i causant una disrupció parcial d'aquestes. Aquesta explicació pot ser vàlida per als sistemes de

DPPC/DHPC i DMPC/DHPC ja que ambdós es consideren models de membrana. Diversos autors han descrit aquest comportament del DDEA i altres fàrmacs (Kriwet i Müller-Goymann, 1994; Lopes i cols, 2006; Lopes i cols, 2004b; Rades i Müller-Goymann, 1997; Schreier i cols, 2000; Schutze i Muller-Goymann, 1998). El DDEA podria tenir un efecte similar al del DHPC en l'estructura discoïdal de les bicel·les, mostrant una tendència a localitzar-se a les vores de l'estructura laminar. Aquest fet podria provocar una disminució en la relació molar entre les molècules de la bicapa i les de les vores, i, per tant, la seva mida de partícula es reduiria, com de fet va ocórrer en els nostres experiments. Tot sembla indicar que la morfologia discoïdal de les bicel·les es redueix per l'efecte de DDEA adoptant una estructura esfèrica similar a la descrita per les micel·les mixtes (Schutze i Muller-Goymann, 1998). El mecanisme d'incorporació del DDEA en les bicel·les és probablement similar al publicat per Lopes (Lopes i cols, 2004b), quan aquest principi actiu es va encapsular en liposomes de fosfatidilcolina de soja. La naturalesa amfifílica del DDEA permetria la seva incorporació en la bicapa lipídica. Aquesta incorporació seria possible donada la hidrofobicitat de l'anell diclofenil del fàrmac, que s'orienta cap al nucli hidròfob de les bicapes.

Els resultats de DLS i Cryo-TEM en el cas del DPPC/DHPC (Fig. 3 de l'article 1) concorden en la disminució de la mida dels sistemes bicel·lars quan el DDEA es incorporat en la seva estructura.

Les tècniques de SAXS, WAXS i DSC van permetre una caracterització exhaustiva dels sistemes bicel·lars compostos per DPPC/DHPC amb el DDEA incorporat (article 6).

Les bandes obtingudes per SAXS (Fig. 1 de l'article 6) a les tres temperatures estudiades (25, 32 i 37 °C) indiquen una disminució del gruix de la bicapa (d'aproximadament 58 Å a aproximadament 52 Å) en comparació amb els resultats obtinguts per sistemes bicel·lars de DPPC/DHPC sense fàrmac (Fig. 6 de l'article 2). Aquesta disminució pot ser deguda a la incorporació de molècules de DDEA i/o de DHPC en la bicapa lipídica. En ambdós casos, aquesta incorporació es veu corroborada pels resultats de DSC (Fig. 2 de l'article 6). Els resultats obtinguts van mostrar una disminució en la T_m del DPPC de 41,1 °C a 39 °C i en la temperatura de pre-transició de 35 °C a 29 °C quan el DDEA s'inclou en sistemes bicel·lars de DPPC/DHPC. Aquesta disminució en la temperatura indica una alteració en l'organització de l'estat gel dels lípids que pot ser produïda per la inclusió del DDEA, el DHPC o tots dos a la bicapa de DPPC. La disminució de la T_m ja ha estat descrita per (Manrique-Moreno i cols, 2009) en l'estudi de la interacció de DDEA amb DMPC. Els resultats d'aquest estudi descriuen la capacitat del DDEA per alterar la cooperativitat de la transició de fase induint una disminució de la T_m . A més, altres articles publicats sobre la inclusió en els sistemes de bicel·lars de diferents substàncies com tensioactius (Kozak i cols, 2007), sulfat de colesterol

(Shapiro i cols, 2010) i ceramides (Barbosa-Barros i cols, 2008a; Barbosa-Barros i cols, 2008b) van descriure canvis en les estructures bicel·lars. Alguns d'aquests treballs expliquen la disminució de la T_m quan un compost és inclòs en l'estructura de la bicapa de les bicel·les. En el nostre cas, és possible que la part hidròfila del DDEA interactuï amb els caps polars dels fosfolípids formant en alguns casos enllaços per ponts d'hidrogen, mentre que la part hidròfoba pot interactuar amb la regió hidròfoba de la cadena alquílica dels lípids. La menor grandària de les molècules DDEA en comparació amb les molècules de DPPC podria crear un espai extra a la regió no polar de la bicapa laminar. Per omplir aquest espai, les cadenes alquíliques de DPPC tenen tres possibilitats: La primera podria ser una desorganització de la bicapa, però els resultats de WAXS (FIG: 1 de l'article 6) indiquen un empaquetament lateral ortoròmbic (OR) igual que els resultats obtinguts en l'article 2 pels sistemes bicel·lars de DPPC/DHPC sense el principi actiu. Aquest fet fa que aquesta hipòtesi sigui improbable. Una altra explicació és que aquest espai pot ser omplert per la inclinació de les cadenes hidrocarbonades de les molècules de DPPC, fet que també explicaria la reducció en l'amplada de la bicapa detectat per SAXS. Aquesta possibilitat està d'acord amb altres autors que descriuen la interacció de compostos amfifílics amb liposomes (Lopes i cols, 2004b; Stoye i cols, 1998). L'última possibilitat és la inclusió del DDEA a la regió del cap polar. Aquest fet augmentaria l'àrea de la regió polar i portaria una interdigitació de les cadenes alquíliques del DPPC per disminuir el desequilibri entre les necessitats d'espai dels caps polars i les cues hidrofòbiques de les molècules de DPPC de la bicapa. Aquest argument ha estat emprat per altres autors per explicar la reducció del gruix de la bicapa produïda per la incorporació d'alguns compostos antiinflamatoris (Nunes i cols, 2011a; Nunes i cols, 2011b). Encara que tant les opcions d'inclinació i interdigitació de les cadenes alquíliques del DPPC són factibles, la interdigitació és energèticament més favorable que una inclinació forta de les cadenes (Nunes i cols, 2011b).

La inclusió de molècules de DHPC a la bicapa de DPPC també pot promoure la disminució de la T_m . El DHPC ha estat descrit com un tensioactiu suau (Helmut, 2000) i alguns autors han descrit que la majoria dels tensioactius tendeixen a desplaçar la T_m dels lípids a valors més baixos (Heerklotz, 2008). Part de les molècules de DHPC desplaçades pel DDEA s'incorporarien a la bicapa lipídica juntament amb les molècules de DPPC, amb el seu cap polar de PC en contacte amb el medi aquós i les cadenes apolars incloses en el nucli hidròfob de la bicapa. Els caps polars del DPPC i del DHPC són els mateixos i aquest fet explica que no hi hagi diferències en els resultats de WAXS entre els sistemes bicel·lars de DPPC/DHPC amb i sense DDEA. D'altra banda, la disminució en el gruix de bicapa s'explicaria també a causa de que les cadenes alquíliques del DHPC són més curtes i aquesta diferència en la longitud de les cadenes podria crear un espai extra com en el cas de la inclusió del DDEA en la bicapa que s'ha explicat anteriorment. Aquest espai

addicional a la regió apolar induiria una interdigitació o flexió de les cadenes alquíliques del DPPC que conduiria a una disminució del gruix de la bicapa com es pot deduir dels resultats de SAXS.

Tots els arguments anteriorment descrits recolzen que algunes molècules de DDEA induirien un desplaçament de molècules de DHPC de les vores de les bicel·les a la bicapa de DPPC. A més, altres molècules de DDEA s'incorporarien a la bicapa de DPPC. En resum, la inclusió del DDEA en els sistemes bicel·lars de DPPC/DHPC indueix una reubicació dels tres components en les estructures bicel·lars promovent la reducció dels valors de T_m , del gruix de la bicapa i de la mida de les bicel·les. Aquesta troballa està en concordança amb la forma petita i esfèrica que tenen aquests sistemes de DPPC/DHPC/DDEA detectats per Cryo-TEM (articles 1 i 4).

4.1.1.2 Incorporació del FFA

En la caracterització físico-química dels sistemes bicel·lars de DPPC/DHPC/FFA s'han fet servir diverses tècniques complementaries. Aquestes tècniques han estat el DLS, la FFEM, el Cryo-TEM, el SAXS, el WAXS i la DSC.

En les investigacions realitzades en l'article 2 s'ha demostrat la incorporació d'un 1% de FFA en sistemes bicel·lars DPPC/DHPC. Aquesta incorporació modifica l'estructura discoïdal inicial. A més, la baixa solubilitat d'aquest fàrmac en aigua (0,03 mg/ml) (Hadgraft i cols, 2000) i la concentració inclosa en els sistemes (10 mg/ml) elimina la possibilitat de que el FFA es trobi en el medi aquós; per tant, la inclusió del fàrmac en el sistema bicel·lar era l'opció més probable.

Tenint en compte la incorporació del FFA en els dominis lipídics del sistema bicel·lar, podrien ser considerades dues possibles zones d'allotjament diferents: la polar, i els ambients apolars de la bicapa lipídica. El lloc d'incorporació depèn de l'estat de protonació del grup carboxílic de la FFA, que té un pKa d'aproximadament 4 (Lee i cols, 2010). En conseqüència, i atès que el pH dels sistemes que contenen FFA és d'aproximadament 5,5 (lleugerament més elevat que el pKa del FFA), es pot esperar una inclusió del fàrmac preferentment entre les cadenes apolars del DPPC. És interessant observar que el pH del sistema amb FFA és el mateix que el descrit per a la pell sana.

Per DLS (Fig. 1 de l'article 2), a 25 °C es va detectar un augment en la grandària de les estructures d'uns 9 nm a uns 138 nm degut a la incorporació del FFA. Se sap que, en aigua, el DPPC té una tendència a formar bicapes planes i vesícules, mentre que el DHPC tendeix a formar micel·les esfèriques petites (Wang i cols, 2008). Per tant, les grans estructures detectades per FFEM (Fig. 3 A i B de l'article 2) després de l'addició del FFA poden ser fragments de làmines, possiblement formades per una retirada parcial del DHPC de les bicel·les

discoïdals. Aquest desplaçament dels fosfolípids de cadena curta donaria lloc a la formació de làmines i fragments d'aquestes estructures enriquits en DPPC. També es van detectar per microscòpia, petites nanoestructures barrejades amb aquestes estructures laminars (Fig. 3A, B i Fig. 4B de l'article 2). El FFA és distribuït en dominis apolars de les làmines i molt probablement en les petites nanoestructures riques en DHPC.

El sistema DPPC/DHPC/FFA exhibeix modificacions estructurals i morfològiques per l'efecte de la temperatura. És interessant observar que no es van detectar canvis amb la temperatura (entre 25 i 37 °C) en els sistemes sense FFA. Treballs previs han descrit que les bicel·les discoïdals es converteixen en grans estructures quan la temperatura augmenta per sobre de la T_m del fosfolípid de cadena llarga (Sternin i cols, 2001). Encara que la T_m del DPPC disminueix (d'acord amb els resultats de DSC, Fig. 5 de l'article 2) quan el FFA és incorporat al sistema (38,9 °C), aquesta temperatura és propera però encara superior a la temperatura experimental (37 °C). Per tant, no s'espera un augment de grandària a causa de la temperatura. Per contra, els nostres resultats indiquen que, quan la temperatura experimental s'incrementa, disminueix la mida de les nanopartícules, com s'observa a partir dels resultats de microscòpia (Fig. 3 i 4 de l'article 2). En conseqüència, altres paràmetres a més de la temperatura també podrien causar modificacions en els sistemes bicel·lars, com ara la dilució, la composició i la relació molar dels fosfolípids (q).

El FFA és poc soluble en aigua, però la seva solubilitat augmenta per la presència de tensioactius no-iònics (Luengo i cols, 2006), com és el cas del DHPC. Les variacions en la solubilitat del FFA (en el rang de temperatures estudiat) probablement pot induir a les diferents distribucions del fàrmac entre el medi aquós i el sistema lipídic. Aquest fet promou la formació d'estructures amb diferents relacions molars que exhibeixen diferents mides i formes. A 25 °C, el FFA es probablement incorporat en gran mesura en les bicapes de DPPC, particularment, entre les cadenes alquíliques de DPPC (domini apolar). A 32,5 °C, una part de les molècules de FFA podria ser incorporat a les bicapes de DPPC soles, i una altra part es probablement inclosa als sistemes bicel·lars de DPPC/DHPC. A 37 °C, una part del FFA es inclòs en els agregats bicel·lars, i una altra part formant micel·les esfèriques, micel·les mixtes tubulars i micel·les tubulars ramificades amb DHPC i DPPC. Agregats similars es descriuen en sistemes compostos de DMPC i DHPC quan la q i la temperatura són incrementades (van Dam i cols, 2006). En el nostre cas, les transformacions estructurals semblen estar altament dominades per la incorporació del FFA en els agregats, atès que no es van observar canvis en el sistema sense el fàrmac.

Els resultats obtinguts per DLS són complementaris als de les altres tècniques estudiades. La diferència en la mida de les petites vesícules i les

estructures observades per FFEM i Cryo-TEM no és representativa ja que la tècnica FFEM només permet la visualització d'una rèplica de la zona de fractura de les estructures en un pla, no d'un volum d'una solució, com amb la tècnica de Cryo-TEM. Aquesta tècnica (Dubochet i cols, 1988) és particularment apropiada per a l'estudi de les transicions de fase de lípids ja que la vitrificació és ràpida i eficient. En FFEM, el protocol de fixació és el mateix que en Cryo-TEM, però, la fractura funciona de manera aleatòria i de preferència entre les dues capes de la bicapa lipídica. Aquest fet podria dificultar la visualització de les estructures transitòries. Les imatges obtingudes per Cryo-TEM són projeccions bidimensionals de totes les membranes en la dispersió, mentre que les imatges FFEM només mostren la projecció bidimensional de la superfície de fractura. Per tant, és més fàcil visualitzar estructures intermèdies de curta durada amb Cryo-TEM. Així, la caracterització de noves estructures es facilita utilitzant ambdues tècniques de microscòpia. El desavantatge de la Cryo-TEM és que les imatges de les estructures lipídiques en aigua es formen sovint amb un contrast relativament pobre. Per tant, la Cryo-TEM pot ser una excel·lent tècnica complementària a la FFEM perquè els diferents aspectes de la microestructura poden ser aclarits (Siegel i cols, 1994).

En la corba de DSC (Fig. 5 de l'article 2) dels agregats bicel·lars de DPPC/DHPC, es va detectar una transició principal pronunciada a 41,1 °C que està en concordança amb la fusió de les cadenes del DPPC pur (Reeves i cols, 2007). El pic típic de la pretransició del DPPC pur a 35 °C es detecta com una banda ampla en el nostre cas; aquest fet demostra que el DHPC influeix en la pretransició, provocant un cert eixamplament de la banda. Aquest eixamplament pot estar associat amb la formació d'agregats de diferents mides i acoblaments a causa de les diferents maneres d'interacció del DPPC amb el DHPC o amb si mateix. En els sistemes bicel·lars de DPPC/DHPC/FFA (Fig. 5 de l'article 2), es va observar una disminució en la temperatura de transició de fase (T_m) i un eixamplament d'aquest pic principal de transició respecte a les bicel·les de DPPC/DHPC. Aquest efecte d'eixamplament està d'acord amb els resultats obtinguts per Kyrikou (Kyrikou i cols, 2004) en la incorporació de d'antiinflamatoris no esteroides en les bicapes de membrana formades per DPPC. Chapman (Chapman, 1975) va publicar la relació existent entre la forma del pic en DSC i la interacció cooperativa entre les molècules de DPPC a la temperatura de transició de fase. Un pic agut es deriva d'una major interacció cooperativa entre les molècules de DPPC, mentre que un pic ample es deriva d'una menor cooperativitat. Per tant, l'addició del FFA provoca una disminució en la interacció cooperativa entre les molècules de DPPC. Addicionalment, el FFA va induir a una disminució en la T_m . En general, tenint en compte la interacció dels lípids amb altres molècules com ara diversos carotenoids (Kostecka-Gugala i cols, 2003), melatonina (Severcan i cols, 2005) o progesterona (Korkmaz i Severcan, 2005), la tendència és la desaparició de la pretransició, però, en el nostre cas, es va observar la formació d'un doble colze en lloc d'una

desaparició. Aquest doble colze podria correspondre a les transicions entre les fases $L_{\beta'}$ i P_{β} i/o la coexistència de totes dues. A 32,5 °C, les micrografies de FFEM mostren una fase ondulada i també una varietat d'altres estructures, fet que podria estar relacionat amb la coexistència de les fases $L_{\beta'}$ i P_{β} . La subtransició detectada per DSC pels sistemes bicel·lars amb FFA podria ser induïda per la formació de làmines de DPPC en les quals està exclòs el DHPC. Tenint en compte que aquesta subtransició no s'ha detectat en els sistemes sense FFA, es pot suposar que el fàrmac ha estat el responsable del desplaçament del DHPC de làmines de DPPC. La formació d'aquestes làmines es corrobora amb les micrografies de FFEM a 25 °C. El doble colze aparegut en la pretransició i la subtransició detectats reforcen la hipòtesi de la formació de nous complexos de DPPC, DHPC i FFA, o diferents combinacions dels tres. Les micrografies de les Fig. 3 i 4 de l'article 2 mostren imatges dels sistemes a 25, 32,5 i 37 °C. Considerant els resultats de DSC, s'esperen diferents fases a les tres temperatures estudiades; per tant, la gran varietat estructural observada en les micrografies concorda bastant bé amb les dades calorimètriques, i un argument similar és aplicable als resultats obtinguts per DLS.

En els resultats obtinguts per SAXS (FIG: 6 de l'article 2), els espectres del sistema de DPPC/DHPC van revelar una banda ampla característica de bicapes individuals de fosfolípids, sense estar apilades (Bolze i cols, 2000). Quan el FFA s'inclou en les bicel·les a 25 °C, es van detectar per SAXS la formació de piles de bicapes, la qual cosa concorda amb les micrografies de FFEM (Fig. 3 de l'article 2). A 32,5 i 37 °C, apareix un pic ample, el que indica l'absència d'apilament de les bicapes. Els resultats de WAXS (Fig. 7 de l'article 2) indiquen un desordre intern causat per la inclusió del FFA, que indueixen una transformació d'empaquetament lateral ortoròmbic (OR) a hexagonal (HEX). Aquest comportament del FFA també es reflecteix en un treball de Grage (Grage i cols, 2000), on es va estudiar la influència del FFA en bicapes de DMPC. El desordre en l'estructura dels sistemes DPPC/DHPC provocat per la inclusió del FFA és més evident a 37 °C ja que s'evidencia una transformació d'un empaquetament OR inicial a una fase mixta entre HEX i líquid cristal·lí.

Per tant, la inclusió de FFA en els sistemes bicel·lars indueix la formació de nous agregats, com ara grans estructures multilaminars i estructures ondulades, discoïdals o tubulars en funció de la temperatura. Encara que és difícil que els resultats de totes les tècniques coincideixin, ja que cada tècnica té les seves pròpies peculiaritats, creiem que cal investigar aquests sistemes tenint en compte les diferents perspectives ofertes per aquesta combinació de metodologies per a aconseguir una correcta interpretació dels resultats.

4.1.1.3 Comparativa dels canvis provocats per la inclusió del DDEA i del FFA en sistemes bicel·lars de DPPC/DHPC

La incorporació del DDEA en aquests sistemes bicel·lars provoca una reducció en la seva grandària sense tenir influència la temperatura detectada per DLS, sempre que es treballi per sota de la T_m del DPPC (41 °C). Per altra banda, els resultats de DLS en el cas de la inclusió del FFA indiquen un augment en la mida dels sistemes induït pel FFA.

Les micrografies obtingudes per Cryo-TEM corroboren la reducció de la mida de partícula quan el DDEA és inclòs en els sistemes bicel·lars de DPPC/DHPC. En el cas de la inclusió del FFA, les visualitzacions de les micrografies obtingudes per Cryo-TEM i FFEM indiquen la formació de diferents nanoagregats com làmines apilades, micel·les tubulars i d'altres, en funció de la temperatura.

Dels resultats de SAXS es pot deduir que la inclusió del DDEA en els sistemes bicel·lars provoca una disminució de l'amplada de la bicapa dels nanoagregats a les tres temperatures estudiades. Per altra banda, en la inclusió del FFA a 25 °C es detecta la formació de làmines apilades i a 32,5 i 37 °C no s'observa cap apilament ni reducció de l'amplada de la bicapa respecte als sistemes sense fàrmac. La tècnica de WAXS va detectar un empaquetament lateral OR igual que les bicel·les sense fàrmac en els cas dels sistemes DPPC/DHPC/DDEA. En el cas de la incorporació del FFA, el fàrmac indueix un desordre en l'empaquetament lateral d'OR a HEX.

Aquestes diferències en la modificació estructural i morfològica de les bicel·les inicials provocades pels dos fàrmacs són degudes a la diferent lipofilitat dels dos compostos ja que el DDEA és amfifílic i el FFA és lipofílic.

En ambdós casos s'ha detectat la inclusió del fàrmac, cosa que és important donat el seu possible ús en aplicacions tòpiques de fàrmacs.

Encara que les nanoestructures formades després de la inclusió dels fàrmacs són diferents, en ambdós casos es preserva una organització en bicapes que recorda l'organització lipídica de l'EC. Aquest fet fa pensar en la idoneïtat d'aquests sistemes per a usos dermatològics.

4.1.2 Capacitat encapsuladora dels sistemes bicel·lars

Els sistemes formats per DMPC/DHPC i DPPC/DHPC van ser capaços d'incorporar 1,16 % (w/v) (concentració comú del mateix fàrmac en el producte comercial) de DDEA d'una manera similar a altres sistemes col·loïdals com ara liposomes, microemulsions, micel·les mixtes, etc (Boinpally i cols, 2003; Kriwet i Müller-Goymann, 1994; Kweon i cols, 2004; Lopes i cols, 2006; Lopes i cols, 2004a; Parsaee i cols, 2002). Els sistemes bicel·lars amb DDEA van mostrar una aparença transparent sense separació de fases i/o precipitats. Aquests sistemes es van

mantenir estables durant almenys 1 setmana i van exhibir un aspecte de gel, que facilita la seva aplicació sobre la pell en comparació amb l'aplicació d'una solució aquosa de DDEA (molt més fluida).

Els sistemes lipídics de DPPC/DHPC han permès la inclusió d'un compost lipòfil, com és el cas del FFA, sense la necessitat d'utilitzar dissolvents orgànics emprats en els productes comercials i han demostrat que exhibeixen una versatilitat morfològica interessant. La concentració utilitzada ha estat de l'1%, similar a la utilitzada en el cas del DDEA. Visualment, els sistemes bicel·lars de FFA van mostrar diferències en l'aparença depenent de la temperatura. A 25 °C els sistemes tenien un aspecte lletós; a 32,5 °C, aquesta mostra era fluida i transparent del tot i a 37 °C es va tornar en translúcida. No es van apreciar precipitats en les mostres dels sistemes bicel·lars en qualsevol d'aquestes temperatures.

4.2 Estudis *in vitro* de l'aplicació tòpica dels sistemes bicel·lars en pell sana

S'han utilitzat dos tipus d'experiments per a estudiar l'aplicació tòpica dels sistemes bicel·lars. En el primer tipus, els sistemes bicel·lars han estat usats com a vehicles del DDEA (articles 1 i 4) o del FFA (articles 3 i 4). En el segon tipus, els sistemes bicel·lars sense fàrmac s'han usat com a modificadors de la barrera cutània abans de l'aplicació d'una solució aquosa de DDEA (article 1).

4.2.1 Sistemes bicel·lars com a vehicle del DDEA: influència de la composició lipídica dels sistemes

La inclusió de DDEA en bicel·les de DPPC/DHPC i DMPC/DHPC disminueix l'absorció percutània del fàrmac en comparació amb la d'una solució aquosa de DDEA (Fig. 4 de l'article 1). Aquesta troballa suggereix un efecte retardador de l'absorció percutània quan el fàrmac està inclòs en els sistemes bicel·lars. Aquest efecte seria interessant per ser aplicat en fàrmacs que tenen una absorció percutània massa ràpida, com és el cas del fentanil, per evitar una sobredosi a nivell sistèmic (Frölich i cols, 2001).

És evident que l'ús d'ambdós tipus de sistemes bicel·lars impedeix el pas del fàrmac a les capes més profundes de la pell. Aquest efecte inhibitori sobre la penetració a la pell va ser més marcat en el cas dels sistemes bicel·lars de DMPC/DHPC. La diferència de penetració a la pell del DDEA inclòs en bicel·les de DPPC i en bicel·les de DMPC podria ser a causa de la diferent temperatura de transició d'aquests dos fosfolípids. Com s'ha comentat abans, a la temperatura experimental el DPPC està en fase gel igual que els lípids de l'EC i el DMPC està en

fase cristall-líquid. El DMPC està en una fase diferent a la dels lípids de l'EC i, com a conseqüència, la penetració a través de la pell podria ser més difícil.

Es podria pensar que a causa de la menor dimensió de les bicel·les quan s'ha encapsulat el DDEA aquests sistemes podrien penetrar més fàcilment a través de la pell, cosa que no succeir en els nostres experiments. El motiu radica en el fet de que hi ha diferents factors que estan implicats en l'efecte potenciador/retardador d'un vehicle. Alguns d'aquests factors són la possible disrupció de l'organització dels lípids intercel·lulars de l'EC, l'afinitat del compost amb el vehicle i la rigidesa de l'estructura lipídica del vehicle (Gwak i Chun, 2002; Thong i cols, 2007). La incorporació del DDEA en el sistema bicel·lar pot provocar una certa rigidesa en les bicel·les. De fet, el fàrmac no està simplement dissolt en la regió lipòfila dels fosfolípids, sinó que probablement s'incorpora a la bicapa alineat amb els fosfolípids; a més, els grups carboxil del diclofenac podrien augmentar la rigidesa dels caps polars dels fosfolípids (Ferreira i cols, 2005; Seddon i cols, 2009). Aquesta rigidesa, dificultaria la penetració del DDEA través de la pell (Kriwet i Müller-Goymann, 1994). Una altra possible raó per a explicar aquesta baixa penetració podria estar relacionada amb la dificultat que té el DDEA a difondre fora dels sistemes bicel·lars.

4.2.2 Sistemes bicel·lars com a vehicle del FFA

Les investigacions dutes a terme amb bicel·les contenint FFA s'han dissenyat tenint en compte dos aspectes diferenciats. Per una part, s'ha estudiat la influència de diferents vehicles en l'absorció percutània del FFA i, per altra part, s'ha investigat la interacció potencial dels lípids dels sistemes bicel·lars amb el domini lipídic de l'EC.

4.2.2.1 Influència del vehicle en l'absorció percutània del FFA

Es van fer estudis d'absorció percutània del FFA vehiculitzat en sistemes bicel·lars de DPPC/DHPC, en una solució etanòlica i en el producte comercial (Fig. 4 de l'article 6).

Els resultats obtinguts van mostrar que l'absorció percutània va ser menor quan el fàrmac es va incloure en els sistemes bicel·lars i major quan el FFA estava dissolt en etanol.

Els alts valors d'absorció percutània obtinguts per a la dissolució etanòlica probablement estan relacionats amb el conegut efecte potenciador de la penetració d'aquest dissolvent. Merle (Merle i Baillet-Guffroy, 2009) va observar una reducció del gruix de l'EC associat a una solubilització dels lípids de l'EC per efecte de l'etanol. Aquest efecte sobre l'EC podria potenciar la permeabilitat de la pell. Un augment de la permeabilitat està associat, en la majoria dels casos, a una

fluïdificació dels lípids de l'EC que implica un major moviment de les cadenes alquíliques lipídiques en aquestes àrees (Williams i Barry, 2006). No obstant això, considerant els resultats d'ATR-FTIR, aquest fet no sembla ocórrer en les mostres tractades amb una solució etanòlica de FFA. La posició de les bandes simètriques i asimètriques d'"*stretching*" dels lípids de l'EC després del tractament amb una solució etanòlica de FFA va mostrar un lleuger ordenament de les cadenes alquíliques dels lípids intercel·lulars de l'EC en comparació amb la pell control, en comptes del desordre esperat. Aquests resultats concorden amb un treball previ de Bommannan (Bommannan i cols, 1991) que indica que encara que l'etanol pot extreure quantitats apreciables de lípids de l'EC, això no sembla induir un desordre en els lípids de l'EC. Els nostres resultats d'ATR-FTIR en la regió de l'"*scissoring*", indiquen un canvi del pic característic de l'empaquetament HEX a valors més baixos, fet que podria estar associat amb l'extracció d'alguns lípids de l'EC. El canvi en la composició lipídica induiria una certa pertorbació en la funció de barrera de l'EC, fet que s'evidencia en els nostres resultats d'absorció percutània com un augment de la permeabilitat de la pell. Els resultats obtinguts corroboren que l'extracció de lípids per l'etanol pot ser el mecanisme responsable potenciador de la permeabilitat de la pell, enlloc de l'alteració de l'ordre dels lípids intercel·lulars de l'EC.

L'absorció percutània del FFA inclòs en el producte comercial va ser menor que l'absorció percutània quan el fàrmac es va incloure en la solució etanòlica, encara que més gran que en el cas de FFA en sistemes bicel·lars. Això és probablement degut a la composició del producte comercial que, a part de FFA, conté un 2% d'àcid salicílic. Aquest compost és una molècula queratolítica capaç de provocar una descamació dels corneòcits reduint la funció barrera de l'EC (Bashir i cols, 2005; Dias i cols, 2007; Lebwohl, 1999). Els resultats d'ATR-FTIR van mostrar un millor ordenament dels lípids de l'EC quan es va aplicar el producte comercial de FFA en comparació amb la pell control. Aquest ordre aparent podria ser degut a excipients alcohòlics del producte comercial, com ara l'isopropanol i el polipropilè glicol, que podrien extreure part dels lípids de l'EC i podrien induir efectes similars a l'etanol sobre les bandes ATR-FTIR.

Quan el FFA està inclòs en els sistemes bicel·lars i s'aplica sobre la pell, els resultats de l'absorció percutània total indiquen uns valors més baixos comparats amb l'aplicació de FFA amb els dos altres vehicles. Aquests resultats suggereixen un efecte retardador de l'absorció percutània quan el fàrmac està inclòs en els sistemes de bicel·lars. El concepte de retardador va ser descrit per Schaefer (Schaefer i Redermeier, 1996) i està associat als agents que redueixen l'absorció percutània dels compostos mitjançant l'augment de la funció barrera de la pell. Possiblement, els lípids de les bicel·les interactuen amb els lípids de l'EC modificant l'organització de les bicapes lipídiques i augmentant la funció barrera

de l'EC. Aquest efecte també va ser descrit per alguns autors per a determinats compostos com ara alguns anàlegs de l'iminisulfurà (Asbill i Michniak, 2000; Kim i cols, 1999) i anàlegs del laurocapram N0915 (Asbill i Michniak, 2000; Hadgraft i cols, 1996). El DMPC també ha estat descrit com a retardant de l'absorció percutània del fàrmac furbiprofè en comparació amb altres compostos com ara àcids grassos insaturats i monoterpens cíclics capaços d'actuar com a potenciadors de l'absorció (Fang i cols, 2003). En l'article 3, l'efecte retardant del DMPC es va associar a la temperatura de transició de la fase gel a líquid ($T_m = 23\text{ °C}$) d'aquest fosfolípid, més gran que la descrita per a les altres molècules utilitzades en l'estudi. En el cas dels sistemes bicel·lars de FFA, la T_m estudiada per DSC en l'article 2 d'aquesta tesi és més gran ($38,9\text{ °C}$) que el descrit pel DMPC. Aquest fet implica que a la temperatura experimental, el sistema aplicat a la pell es troba en estat de gel. És ben sabut que en l'estat gel els fosfolípids no afecten, o fins i tot augmenten, la barrera lipídica de la pell (Fang i cols, 2003; Kirjavainen i cols, 1999), fet que en el nostre cas provoca una reducció de la penetració del fàrmac. L'efecte retardador dels sistemes bicel·lars de FFA està d'acord amb els resultats obtinguts en l'article 1 per als sistemes bicel·lars de DPPC/DHPC/DDEA on també es va observar aquest efecte retardant.

4.2.2.2 Interacció dels sistemes bicel·lars de FFA amb els lípids de l'EC

Les imatges de FSTEM de l'EC en la pell control i la pell tractada amb sistemes bicel·lars de FFA (Fig. 3 i 4 de l'article 3) van mostrar microestructures similars comparables a les publicades anteriorment per altres autors per a pell nativa (Cócera i cols, 2011; López i cols, 2001). L'estructura laminar ben organitzada dels lípids de l'EC que s'observa en ambdues mostres indica que no hi ha modificacions estructurals en l'EC induïdes pel tractament amb els sistemes bicel·lars de FFA. L'efecte de diferents sistemes bicel·lars sobre la microestructura de l'EC ha estat prèviament estudiat pel nostre grup. D'aquests estudis es va concloure que les bicel·les de DMPC/DHPC no promouen canvis en l'organització laminar dels lípids de l'EC (Barbosa-Barros i cols, 2008c; Barbosa-Barros i cols, 2009) mentre que les bicel·les de DPPC/DHPC indueixen la formació de vesícules en la zona dels lípids de l'EC (Barbosa-Barros i cols, 2009; Cócera i cols, 2011). Aquest diferent comportament pot ser degut a, com ja s'ha dit anteriorment, la diferent T_m associada als lípids de cadena alquílica llarga. Un altre factor a considerar és la capacitat dels sistemes bicel·lars d'augmentar la seva grandària quan el contingut d'aigua en els sistemes augmenta (Barbosa-Barros i cols, 2008a). Quan les bicel·les de DMPC/DHPC s'apliquen sobre la pell a temperatura fisiològica (37 °C), aquest sistema experimenta una transició de fase de gel a estat líquid. Aquest canvi indueix un augment en la grandària de les estructures bicel·lars que eviten el pas de bicel·les a través de l'EC. En el cas dels sistemes de DPPC/DHPC, amb una T_m

més elevada, el contacte amb la pell a 37 °C no promou la transició de fase, per tant no es produeix cap modificació de les seves dimensions permetent que aquests sistemes penetrin a través de l'EC i que a causa de la dilució provocada per l'aigua que hi ha a la pell les bicel·les creixin formant-se vesícules. En l'article 3, encara que els sistemes bicel·lars de FFA estan composts per DPPC i DHPC no es veuen canvis en la zona de lípids de l'EC. Això és a causa de que quan els sistemes de DPPC/DHPC inclouen FFA, es modifica la mida de les nanoestructures i el comportament fàsic del sistema. El nou sistema bicel·lar amb FFA forma agregats de major grandària que els detectats en el sistema sense FFA, com es pot veure en l'article 2. Això podria dificultar el pas a través de l'EC i és per això que no es detecten noves estructures lipídiques en l'EC després del tractament amb aquest tipus de sistemes bicel·lars amb el fàrmac.

Tot i l'absència de noves estructures laminars o vesiculars en les mostres de pell després del tractament amb aquests nanoagregats que contenen FFA, es va detectar un cert efecte en l'organització de lípids de l'EC. Per tant, es podria suposar que hi ha hagut una difusió parcial dels lípids i el FFA dels sistemes bicel·lars a l'EC. Els resultats d'ATR-FTIR i de SAXS van mostrar un ordenament dels lípids de l'EC en comparació amb la pell control que concorda amb l'efecte retardant de la permeabilitat descrit anteriorment. L'augment en l'ordre dels lípids de l'EC podria ser induït per la inclusió de DPPC del sistema bicel·lar a les bicapes lipídiques del teixit cutani. Aquest fosfolípid està en una fase gel ordenada a la temperatura experimental i podria promoure un ordenament addicional en l'estructura laminar de l'EC (Rodríguez i cols, 2009).

Els experiments de SAXS amb radiació sincrotró realitzats a mostres d'EC, control i tractades amb sistemes bicel·lars amb FFA, van mostrar un augment de l'espaiat d corresponent a la fase de periodicitat curta ("*Short Periodicity Phase*", SPP) de les fases laminars de l'EC descrites per Bouwstra (Bouwstra i cols, 1991). Aquest espaiat d és la suma del gruix de la bicapa lipídica i el gruix d'una capa adjacent d'aigua interlaminar (de Jager i cols, 2005). L'augment de la distància d dels lípids de l'EC quan la pell es tracta amb sistemes bicel·lars de FFA pot ser explicat per la incorporació d'aigua entre les bicapes, o la incorporació dels lípids DPPC en fase de gel. Aquest fet corrobora la interacció dels lípids de les bicel·les amb l'EC. La major intensitat de la banda corresponent al SPP en el cas de l'EC tractat, en referència al control, indica un augment de l'ordenació de l'estructura lipídica de l'EC. En qualsevol cas, amb els resultats obtinguts no s'ha detectat una extracció dels lípids de l'EC després del tractament amb els sistemes bicel·lars; per contra, es pot veure un enriquiment d'aquests lípids per efecte del tractament i, considerant els resultats de l'absorció percutània, també un reforç de la funció barrera de l'EC.

4.2.3 Els sistemes bicel·lars com a potenciadors de la permeabilitat de la pell

Malgrat que les bicel·les amb fàrmac (DDEA i FFA) inhibeixen la penetració d'aquest, els estudis *in vivo* de Barbosa-Barros (Barbosa-Barros i cols, 2008c) van mostrar un augment del TEWL després d'una aplicació tòpica consecutiva de bicel·les fosfolípídiques. En l'article 1 es va investigar l'efecte de les bicel·les sobre la funció barrera de la pell i el seu possible efecte potenciador sobre l'absorció percutània *in vitro* del DDEA. Amb aquesta finalitat, es va realitzar un tractament previ de les mostres de pell porcina amb sistemes bicel·lars de DMPC/DHPC o de DPPC/DHPC seguit d'una aplicació tòpica d'una solució aquosa de DDEA.

Els resultats globals dels estudis d'absorció percutània (Fig. 5 de l'article 1) indiquen que un tractament previ de la pell amb bicel·les promou l'absorció percutània del DDEA en solució aquosa. No hi va haver diferències significatives en el percentatge d'absorció percutània entre el pretractament amb bicel·les de DMPC i amb bicel·les de DPPC, tot i que hi ha estudis de microscòpia que han mostrat cadascun d'aquests sistemes pot canviar de manera diferent la microestructura de l'EC (Barbosa-Barros i cols, 2008c; Barbosa-Barros i cols, 2008d; Barbosa-Barros i cols, 2009; Rodríguez i cols, 2009), com ja s'ha comentat en l'apartat 4.2.2.2.

L'efecte potenciador dels sistemes bicel·lars sobre l'absorció percutània del DDEA podria ser degut a una interacció inicial de les bicel·les amb l'EC que podria causar una desorganització dels lípids intercel·lulars, responsables de la funció barrera de l'EC. Aquest fet facilitaria l'absorció del DDEA a través de la pell. La interacció dels fosfolípids específics de bicel·les amb els lípids de l'EC seria el mecanisme responsable de l'efecte detectat. Però com que aquest mecanisme seria diferent en el cas de les bicel·les de DMPC que en el de les bicel·les de DPPC, els resultats obtinguts semblen indicar que altres factors, a més dels canvis microestructurals de l'EC, han de participar en la penetració del DDEA, ja que els dos tipus de bicel·les produeixen un efecte similar a nivell d'absorció.

4.3 Disseny d'una metodologia de simulació *in vitro* de pell amb la funció barrera deteriorada

Normalment, els estudis d'absorció percutània *in vitro* es duen a terme utilitzant biòpsies de pell amb una condició fisiològica acceptable. No obstant això, sota diferents condicions patològiques de la pell, la funció de barrera de l'EC està deteriorada. Per tant, el desenvolupament d'un model *in vitro* de pell amb la funció barrera deteriorada podria ser convenient per a predir, en condicions experimentals més realistes, la biodisponibilitat, l'eficàcia clínica i els possibles

efectes de toxicitat sistèmica en el desenvolupament de compostos per al tractament de patologies de la pell.

És ben sabut que el procés d'absorció percutània d'un compost depèn de molts factors: les seves característiques fisicoquímiques, la grandària molecular, el coeficient de partició, la solubilitat i l'activitat termodinàmica, la unió fàrmac-vehicle, etc. (Elias i Feingold, 2006; Schaefer i Redermeier, 1996). Encara que les propietats fisicoquímiques de les molècules o de les formulacions aplicades són els factors que són generalment acceptats a l'hora d'influir en el perfil d'absorció percutània, és important determinar el seu comportament en pell amb la funció barrera modificada. Alguns investigadors van establir l'existència d'una correlació entre el TEWL i l'absorció percutània de compostos amb diferents propietats físico-químiques (Lotte i cols, 1987); però, la majoria dels autors han observat un comportament de penetració diferent utilitzant compostos amb desigual caràcter físico-químic sobre la pell intacta comparat amb la utilització de pell amb la barrera deteriorada (Nielsen, 2005; Nielsen i cols, 2007; Simonsen i Fullerton, 2007; Tsai i cols, 2001).

Els anti-psoriàsics, els fàrmacs anti-eczematosos, o d'altra índole que s'empren per alleujar les malalties de la pell s'avaluen, en una fase preliminar, mitjançant proves d'absorció percutània *in vitro*, utilitzant biòpsies de pell sana. No obstant això, aquests fàrmacs s'haurien d'aplicar en biòpsies de pell amb un deteriorament de la funció de barrera per obtenir un perfil d'absorció percutània més real. En aquest sentit, és possible simular la condició de deteriorament de la barrera cutània de la pell patològica, alterant aquesta funció químicament utilitzant acetona (Tsai i cols, 2001) o lauril sulfat de sodi (SLS) (Nielsen, 2005; Nielsen i cols, 2007; Tsai i cols, 2001), o mecànicament mitjançant "tape-stripping" (Sekkat i cols, 2004a; 2004b; Simonsen i Fullerton, 2007), punçons amb microagulles (Gomaa i cols, 2010), o abrasió amb paper de vidre (Wu i cols, 2006).

Pel que fa a una possible correlació entre el nombre de tires adhesives ("tape-strips") aplicades a la pell i el TEWL, la variació trobada entre les dades *in vivo* (utilitzant voluntaris humans) i les dades de pell porcina *in vitro* podria ser deguda a les variables estructurals de la pell (en particular, al diferent lloc anatòmic utilitzat) d'ambdòs teixits (Fig. 1 de l'article 5). No obstant això, la tendència apreciada en els dos casos indica una disminució clara i progressiva de la funció barrera de la pell amb l'augment del nombre de tires adhesives aplicades. A més, els resultats confirmen que les mesures de TEWL també es poden utilitzar per dur a terme experiments en la pell *in vitro* d'acord amb els resultats publicats per altres autors (Sekkat i cols, 2004a; 2004b; Simonsen i Fullerton, 2007).

D'altra banda, els resultats de penetració de l'àcid salicílic i la cafeïna (Fig. 2 i 3 de l'article 5) en els diferents compartiments cutanis respecte el nombre de tires adhesives aplicades a la pell mostren un comportament diferent en els dos

compostos, encara que en ambdós casos hi ha un augment de la penetració dels fàrmacs quan s'augmenta el deteriorament de la funció barrera de la pell. Si l'absorció percutània total es representa en funció del nombre de tires adhesives (Fig. 4 de l'article 5) o el TEWL (Fig. 5 de l'article 5), l'evolució dels valors del percentatge global d'absorció percutània compleixen diferents funcions en cada cas.

L'equació que millor s'adapta en el cas de la cafeïna és una funció exponencial del tipus:

$$\% \text{ A.P.} = A \times B \times \exp [\text{Nombre Tires o TEWL}]$$

On % A.P. és el percentatge d'absorció percutània, A és el factor pre-exponencial relacionat amb les propietats físico-químiques de la cafeïna, i B està relacionat amb l'efecte que provoca l'alteració de la funció de barrera en l'absorció percutània. Una equació exponencial similar ha estat descrita per Sekkat (Sekkat i cols, 2004b), tenint en compte la relació entre el flux del fàrmac en l'estat d'equilibri ("*estimated steady-state flux*", J_{ss}) i el TEWL per a la cafeïna i el fenobarbital. En el nostre cas, les equacions obtingudes per a la cafeïna, tant en relació amb el nombre de tires aplicades com amb el TEWL, encaixen bastant bé amb una equació exponencial (coeficients de correlació, $R^2 = 0,97$ i $0,95$, respectivament)

En els cas de l'àcid salicílic l'equació que millor descriu el comportament d'aquest fàrmac és una funció lineal del tipus:

$$\% \text{ A.P.} = a \times \text{Nombre Tires o TEWL} + b,$$

On a està relacionada amb l'efecte de la pertorbació de la barrera cutània i b està relacionat amb les propietats físico-químiques de l'àcid salicílic. El R^2 obtingut amb les dues equacions lineals relacionades amb el nombre de tires aplicades i el TEWL són $0,95$ i $0,89$, respectivament.

En el cas de l'àcid salicílic, l'increment de l'absorció percutània respecte al deteriorament de la funció barrera de la pell és menor que en el cas de la cafeïna. Aquests resultats estan d'acord amb altres estudis duts a terme sobre la pell prèviament danyada utilitzant acetona o SLS (Nielsen, 2005; Tsai i cols, 2001) en què el control de l'absorció percutània a causa de la funció barrera de l'EC va ser menys pronunciat en el cas de compostos lipofílics (com l'àcid salicílic).

Els nostres resultats indiquen que el deteriorament progressiu de la funció barrera de la pell augmenta sempre el comportament de penetració d'un compost donat, però, el balanç hidròfil-lipòfil dels compostos o formulacions utilitzades podria modificar en gran mesura el seu perfil de penetració, especialment quan s'utilitza una pell amb la funció barrera deteriorada. És evident que en el cas de fàrmacs que han de ser aplicats sobre una pell amb una funció de barrera compromesa, cal un coneixement preliminar dels valors de TEWL *in vivo*, com van reportar Simonsen i Fullerton en el cas de dermatitis atòpica (Simonsen i Fullerton, 2007). De fet, els resultats d'absorció percutània obtingut per aquests autors per a l'àcid fusídic i la betametasona-17-valerat, utilitzant pell amb la funció barrera deteriorada mitjançant "tape-stripping", es correlacionaven amb els resultats clínics. Basant-se en el valors de TEWL obtinguts *in vivo* per a diferents tipus de pell danyada, els estudis *in vitro* d'absorció percutània s'han de fer utilitzant els biòpsies de pell simulant una pertorbació similar de la funció de barrera de l'EC mitjançant un nombre diferent de cintes adhesives aplicades sobre la pell nativa.

Recentment, Gattu (Gattu i Maibach, 2010) ha publicat una revisió tenint en compte la recerca duta a terme per diferents investigadors sobre l'absorció percutània utilitzant diversos mètodes mecànics i químics per disminuir *in vitro* la funció barrera de la pell. En general, en tots els mètodes avaluats, l'absorció percutània d'algunes molècules augmenta. Aquest augment és més pronunciat amb molècules hidròfiles i menys amb lipòfiles. En el nostre treball, l'augment de l'absorció percutània depèn del nombre de tires adhesives aplicades sobre la pell i és diferent per a ambdós compostos investigats. Com un exemple, en el cas de la cafeïna, quan es van aplicar 25 tires sobre la pell, l'increment de l'absorció percutània respecte a la pell intacta va ser d'aproximadament 5 vegades, però, en el cas de l'àcid salicílic utilitzant les mateixes condicions l'augment de l'absorció percutània va ser d'aproximadament 2 vegades. Aquests resultats estan d'acord amb els resultats presentats en la revisió escrita per Gattu ja que per a les molècules lipòfiles, com és el cas de l'àcid salicílic, l'augment de l'absorció percutània en la pell danyada és menor. En qualsevol cas, és important dissenyar models *in vitro* precisos i reproduïbles de pell amb la funció barrera deteriorada.

4.4 Ús dels sistemes bicel·lars com a vehicle en l'aplicació de DDEA sobre pell *in vitro* simulant una condició patològica

Com s'han vist en els articles 1, 3 i 4, els sistemes bicel·lars tenen un comportament retardant en l'absorció de fàrmacs com el DDEA i el FFA. És per aquest motiu que es va pensar en la utilització d'aquests sistemes en l'aplicació en pell amb una disfunció de la barrera cutània.

La simulació de la pell *in vitro* amb la funció barrera deteriorada a causa de l'aplicació seqüencial de tires adhesives sobre pell intacta ha estat descrit prèviament en l'article 5 i també per altres autors (Gattu i Maibach, 2010; Simonsen i Fullerton, 2007) per la seva accessibilitat i senzillesa. Aquesta metodologia induïx el deteriorament progressiu de l'EC augmentant significativament el TEWL.

L'aplicació *in vitro* de DDEA vehiculitzat en sistemes bicel·lars de DPPC/DHPC sobre pell porcina amb la funció barrera deteriorada va induir una certa oclusió amb la corresponent disminució del TEWL. Això és a causa de la formació d'una pel·lícula lipídica formada després de l'evaporació de l'aigua dels sistemes bicel·lars. Aquest efecte també va ser detectat per altres autors en l'ús de liposomes aplicats tòpicament *in vivo* observant una reducció del TEWL i donant al pacient un alleujament immediat de les molèsties associades a la pell seca (De Leeuw i cols, 2009; Lautenschlager, 1990). La disminució del TEWL observada en la Fig. 3 de l'article 6 també pot ser deguda a un cert efecte de restauració de la pell promoguda pels sistemes bicel·lars de DDEA. Les bicel·les de DPPC/DHPC sense fàrmac han demostrat en treballs previs que poden actuar com a agents de reparació de l'estructura dels lípids de l'EC (Barbosa-Barros i cols, 2008d).

Pel que fa als estudis d'absorció percutània, el DDEA vehiculitzat en els sistemes bicel·lars té una tendència favorable a passar a través de l'EC. En la Fig. 4 de l'article 6 es pot veure que el percentatge de retenció del DDEA en l'EC és molt baix, fet que pot ser degut a una major afinitat del DDEA amb els lípids de les bicel·les que amb els lípids intercel·lulars de l'EC. Aquesta afinitat pot ser explicada per un enllaç per ponts d'hidrogen entre el DDEA i els lípids dels sistemes bicel·lars. En l'epidermis i la dermis el contingut de DDEA detectat quan el fàrmac s'aplica en els sistemes bicel·lars o en solució aquosa és molt similar. Per tant, el contingut de DDEA disponible a l'epidermis i la dermis no disminueix quan es vehiculitza en els sistemes bicel·lars. El contingut de DDEA detectat en el fluid receptor quan s'aplica aquest compost en solució aquosa és estadísticament més elevat que en el cas del DDEA vehiculitzat en sistemes bicel·lars.

És interessant apreciar també l'efecte retardant dels sistemes de bicel·lars sobre l'absorció percutània del DDEA. Aquest comportament és coherent amb el treball de Bouwstra (Bouwstra i cols, 2003) el qual explica que les vesícules en estat gel poden inhibir la penetració de fàrmacs a través de la pell. Tenint en compte que la T_m dels sistemes DPPC/DHPC/DDEA observada per DSC és de 39 °C i la temperatura de la superfície de la pell és d'uns 32 °C, els sistemes bicel·lars amb DDEA també es van aplicar en estat de gel. L'efecte retardant dels sistemes bicel·lars concorda amb els resultats obtinguts anteriorment en els articles 1 i 3 en l'aplicació de DDEA i FFA vehiculitzats en sistemes bicel·lars i aplicats en pell sana.

Aquest efecte retardant dels sistemes bicel·lars, així com la seva acció oclusiva sobre la superfície de la pell pot ser útil per a la millora de les característiques terapèutiques del DDEA quan aquest fàrmac s'aplica sobre una pell patològica. Això pot ser especialment interessant perquè en la majoria de les patologies de la pell el procés d'inflamació indueix un deteriorament de la funció barrera de l'EC (Rahman i cols, 2011). Per tant, l'aplicació dels sistemes bicel·lars podria millorar aquesta funció barrera de l'EC i a més fomentar l'acció antiinflamatòria del principi actiu utilitzat.

5. CONCLUSIONS

5. CONCLUSIONS

1- Els sistemes bicel·lars formats per DPPC/DHPC tenen una mida de partícula d'uns 15 nm i una forma discoïdal. Els resultats de SAXS i WAXS indiquen un amplada de bicapa de 58 Å i un empaquetament lateral OR, respectivament i independents de la temperatura.

2- Els sistemes bicel·lars de DMPC/DHPC i de DPPC/DHPC són capaços d'incorporar el DDEA, un compost amfifílic. Aquesta incorporació ocasiona una disminució del seu tamany de partícula, detectat per DLS, en ambdós casos. Els resultats de SAXS dels sistemes DPPC/DHPC/DDEA indiquen una disminució de l'amplada de la bicapa quan el fàrmac és inclòs. La tècnica de WAXS va detectar un empaquetament lateral OR igual que les bicel·les sense fàrmac.

3- Durant els assajos d'absorció percutània s'ha apreciat un efecte retardant en l'absorció del DDEA quan aquest està inclòs en sistemes bicel·lars respecte a una solució aquosa del fàrmac. Aquest efecte és lleugerament més acusat quan el fàrmac està vehiculitzat en els sistemes bicel·lars de DMPC/DHPC que en els sistemes de DPPC/DHPC.

4- L'aplicació prèvia de bicel·les sense fàrmac sobre la pell, seguida de l'addició del DDEA en solució aquosa, promou l'absorció percutània del fàrmac.

5- Els sistemes bicel·lars de DPPC/DHPC són capaços d'incorporar FFA, un compost lipofílic, sense l'ús de solvents orgànics comunament emprats en productes comercials amb aquest fàrmac. La seva incorporació als sistemes bicel·lars indueix un augment del tamany de l'estructura, detectat per DLS, que depèn de la temperatura. S'ha visualitzat la formació de nous agregats, com grans estructures multilaminars, estructures ondulades, discoïdals o tubulars, en funció de la temperatura. Els resultats de SAXS indiquen que a 25 °C aquests nanoagregats formen làmines apilades i a 32,5 i 37 °C no es detecta cap apilament ni reducció del tamany de la bicapa respecte als sistemes sense fàrmac. Dels resultats de WAXS es va deduir que la incorporació del FFA indueix un desordre en l'empaquetament lateral passant d'ortoròmbic (OR) a hexagonal (HEX).

6- En termes d'absorció percutània, els sistemes bicel·lars amb FFA també tenen un efecte retardant. Aquest efecte és més acusat que en el cas del DDEA degut, probablement, al major tamany d'aquests sistemes.

7- S'ha comprovat que els sistemes bicel·lars amb FFA no modifiquen l'estructura laminar dels lípids de l'EC ni, per tant, la seva funció barrera.

8- S'ha dissenyat un protocol *in vitro* d'absorció percutània utilitzant com a compostos de referència l'àcid salicílic i la cafeïna, que permet simular el comportament d'una pell patològica amb la seva funció barrera deteriorada. Aquest mètode d'absorció percutània contempla unes condicions més realistes per obtenir un perfil d'absorció percutània més rigorós en el cas d'una pell patològica.

9- Utilitzant aquest protocol específic d'absorció percutània, s'ha pogut constatar que els sistemes bicel·lars que contenen DDEA poden exercir un efecte protector sobre la funció barrera de la pell. A més, l'efecte retardant dels sistemes bicel·lars podria afavorir l'acció antiinflamatòria del DDEA a nivell de l'epidermis i la dermis i disminuiria el possible efecte toxicològic a nivell sistèmic.

Considerant conjuntament aquestes conclusions es pot deduir que els sistemes bicel·lars poden ser bones estratègies de vehiculització de principis actius per a la seva aplicació tòpica.

6. BIBLIOGRAFIA

6. BIBLIOGRAFIA

- Ainbinder, D., Touitou, E., 2005. Testosterone ethosomes for enhanced transdermal delivery. *Drug Deliv.* 12, 297-303.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2002. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, New York.
- Almgren, M., Edwards, K., Karlsson, G., 2000. Cryo transmission electron microscopy of liposomes and related structures. *Colloids Surf., A* 174, 3-21.
- Asbill, C.S., Michniak, B.B., 2000. Percutaneous penetration enhancers: local versus transdermal activity. *PSTT* 3, 36-41.
- Barbosa-Barros, L., de la Maza, A., López-Iglesias, C., López, O., 2008a. Ceramide effects in the bicelle structure. *Colloids Surf., A* 317, 576-584.
- Barbosa-Barros, L., De la Maza, A., Walther, P., Estelrich, J., López, O., 2008b. Morphological effects of ceramide on DMPC/DHPC bicelles. *J. Microsc. (Oxford, U. K.)* 230, 16-26.
- Barbosa-Barros, L., Barba, C., Cócera, M., Coderch, L., López-Iglesias, C., de la Maza, A., López, O., 2008c. Effect of bicellar systems on skin properties. *Int. J. Pharm.* 352, 263-272.
- Barbosa-Barros, L., de la Maza, A., Estelrich, J., Linares, A.M., Feliz, M., Walther, P., Pons, R., López, O., 2008d. Penetration and growth of DPPC/DHPC bicelles inside the stratum corneum of the skin. *Langmuir* 24, 5700-5706.
- Barbosa-Barros, L., Barba, C., Rodríguez, G., Cócera, M., Coderch, L., López-Iglesias, C., de la Maza, A., López, O., 2009. Lipid nanostructures: self-assembly and effect on skin properties. *Mol. Pharmaceutics* 6, 1237-1245.
- Barbosa-Barros, L., Rodríguez, G., Barba, C., Cócera, M., Rubio, L., Estelrich, J., López-Iglesias, C., de la Maza, A., López, O., 2012. Bicelles: Lipid nanostructured platforms with potential dermal applications. *Small* 8, 807-818.
- Barry, B.W., 1983. Properties that influence percutaneous absorption. In: Dekker, M. (Ed.), *Dermatological formulations: percutaneous absorption*, New York, pp. 145-233.
- Bashir, S.J., Dreher, F., Chew, A.L., Zhai, H., Levin, C., Stern, R., Maibach, H.I., 2005. Cutaneous bioassay of salicylic acid as a keratolytic. *Int. J. Pharm.* 292, 187-194.
- Boinpally, R.R., Zhou, S.L., Poondru, S., Devraj, G., Jasti, B.R., 2003. Lecithin vesicles for topical delivery of diclofenac. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 56, 389-392.

- Bolze, J., Fujisawa, T., Nagao, T., Norisada, K., Saito, H., Naito, A., 2000. Small angle X-ray scattering and ^{31}P NMR studies on the phase behavior of phospholipid bilayered mixed micelles. *Chem. Phys. Lett.* 329, 215-220.
- Bommannan, D., Potts, R.O., Guy, R.H., 1991. Examination of the effect of ethanol on human stratum corneum in vivo using infrared spectroscopy. *J. Control. Release* 16, 299-304.
- Boncheva, M., Damien, F., Normand, V., 2008. Molecular organization of the lipid matrix in intact Stratum corneum using ATR-FTIR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 1778, 1344-1355.
- Bouwstra, J.A., Gooris, G.S., van der Spek, J.A., Bras, W., 1991. Structural investigations of human stratum corneum by small-angle X-ray scattering. *J. Invest. Dermatol.* 97, 1005-1012.
- Bouwstra, J.A., Dubbelaar, F.E., Gooris, G.S., Ponec, M., 2000. The lipid organisation in the skin barrier. *Acta Derm. Venereol. Suppl. (Stockh)* 80, 23-30.
- Bouwstra, J.A., Honeywell-Nguyen, P.L., Gooris, G.S., Ponec, M., 2003. Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. *Progr. Lipid Res.* 42, 1-36.
- Bragg, W.L., 1913. The diffraction of short electromagnetic waves by a crystal, *Proceedings of the Cambridge Philosophical Society*, pp. 43-57.
- Cleary, G.W., 2003. Transdermal and transdermal-like delivery system opportunities: today and the future. *Drug Delivery Technol.* 3, 35-40.
- Cócera, M., Rodríguez, G., Rubio, L., Barbosa-Barros, L., Benseny-Cases, N., Cladera, J., Sabes, M., Fauth, F., de la Maza, A., López, O., 2011. Characterisation of skin states by non-crystalline diffraction. *Soft Matter* 7, 8605-8611.
- Cornell, B.A., Fletcher, G.C., Middlehurst, J., Separovic, F., 1982. The lower limit to the size of small sonicated phospholipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 690, 15-19.
- Chapman, D., 1975. Phase transitions and fluidity characteristics of lipids and cell membranes. *Q. Rev. Biophys.* 8, 185-235.
- de Jager, M.W., Gooris, G.S., Ponec, M., Bouwstra, J.A., 2005. Lipid mixtures prepared with well-defined synthetic ceramides closely mimic the unique stratum corneum lipid phase behavior. *J. Lipid Res.* 46, 2649-2656.
- De Leeuw, J., De Vijlder, H.C., Bjerring, P., Neumann, H.A.M., 2009. Liposomes in dermatology today. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 23, 505-516.
- Dias, M., Hadgraft, J., Lane, M.E., 2007. Influence of membrane-solvent-solute interactions on solute permeation in skin. *Int. J. Pharm.* 340, 65-70.

- Dubochet, J., Adrian, M., Chang, J.J., Homo, J.C., Lepault, J., McDowell, A.W., Schultz, P., 1988. Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Q. Rev. Biophys.* 21, 129-228.
- Egelhaaf, S.U., Wehrli, E., Müller, M., Adrian, M., Schurtenberger, P., 1996. Determination of the size distribution of lecithin liposomes: A comparative study using freeze fracture, cryoelectron microscopy and dynamic light scattering. *J. Microsc. (Oxford, U. K.)* 184, 214-228.
- El Maghraby, G.M., Williams, A.C., Barry, B.W., 1999. Skin delivery of oestradiol from deformable and traditional liposomes: mechanistic studies. *J. Pharm. Pharmacol.* 51, 1123-1134.
- Elias, P.M., 1988. Structure and function of the stratum corneum permeability barrier. *Drug Develop, Res*, 13, 97-105.
- Elias, P.M., 1991. Epidermal barrier function: intercellular lamellar lipid structures, origin, composition and metabolism. *J. Control. Release* 15, 199-208.
- Elias, P.M., Feingold, K.R., 2006. Skin barrier. Taylor and Francis group, New York.
- Fang, J.Y., Hwang, T.L., Leu, Y.L., 2003. Effect of enhancers and retarders on percutaneous absorption of flurbiprofen from hydrogels. *Int. J. Pharm.* 250, 313-325.
- Ferreira, H., Lucio, M., Lima, J.L., Matos, C., Reis, S., 2005. Effects of diclofenac on EPC liposome membrane properties. *Anal. Bioanal. Chem.* 382, 1256-1264.
- Fluhr, J.W., Feingold, K.R., Elias, P.M., 2006. Transepidermal water loss reflects permeability barrier status: validation in human and rodent in vivo and ex vivo models. *Exp. Dermatol.* 15, 483-492.
- Forslind, B., 1994. A domain mosaic model of the skin barrier. *Acta Derm. Venereol.* 74, 1-6.
- Forslind, B., Engstrom, S., Engblom, J., Norlen, L., 1997. A novel approach to the understanding of human skin barrier function. *J. Dermatol. Sci.* 14, 115-125.
- Frölich, M.A., Giannotti, A., Modell, J.H., 2001. Opioid overdose in a patient using a fentanyl patch during treatment with a warming blanket. *Anesth. Analg.* 93, 647-648.
- Fuchs, J., Groth, N., Herrling, T., 2000. In vitro and in vivo assessment of the irritation potential of different spin traps in human skin. *Toxicology* 151, 55-63.
- Galer, B.S., Rowbotham, M., Perander, J., Devers, A., Friedman, E., 2000. Topical diclofenac patch relieves minor sports injury pain: results of a multicenter controlled clinical trial. *J. Pain Symptom Manage.* 19, 287-294.

- Gattu, S., Maibach, H.I., 2010. Enhanced absorption through damaged skin: an overview of the in vitro human model. *Skin Pharmacol. Physiol.* 23, 171-176.
- Golden, G.M., Guzek, D.B., Kennedy, A.H., McKie, J.E., Potts, R.O., 1987. Stratum corneum lipid phase transitions and water barrier properties. *Biochemistry* 26, 2382-2388.
- Gomaa, Y.A., Morrow, D.I., Garland, M.J., Donnelly, R.F., El-Khordagui, L.K., Meidan, V.M., 2010. Effects of microneedle length, density, insertion time and multiple applications on human skin barrier function: assessments by transepidermal water loss. *Toxicol. In Vitro* 24, 1971-1978.
- Grage, S.L., Gauger, D.R., Selle, C., Pohle, W., Richter, W., Ulrich, A.S., 2000. The amphiphilic drug flufenamic acid can induce a hexagonal phase in DMPC: a solid state ³¹P- and ¹⁹F-NMR study. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2, 4574-4579.
- Gwak, H.S., Chun, I.K., 2002. Effect of vehicles and penetration enhancers on the in vitro percutaneous absorption of tenoxicam through hairless mouse skin. *Int. J. Pharm.* 236, 57-64.
- Hadgraft, J., 2001. Skin, the final frontier. *Int. J. Pharm.* 224, 1-18.
- Hadgraft, J., 2004. Skin deep. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 58, 291-299.
- Hadgraft, J., Plessis, J.d., Goosen, C., 2000. The selection of non-steroidal anti-inflammatory agents for dermal delivery. *Int. J. Pharm.* 207, 31-37.
- Hadgraft, J., Peck, J., D.G., W., Pugh, W.J., Allan, G., 1996. Mechanisms of action of skin penetration enhancers/retarders: Azone and analogues. *Int. J. Pharm.* 141 17-25.
- Heerklotz, H., 2008. Interactions of surfactants with lipid membranes. *Quarterly Reviews of Biophysics* 41, 205-264.
- Helmut, H., 2000. Short-chain phospholipids as detergents. *Biochim. Biophys. Acta* 1508, 164-181.
- Huang, C., Li, S., 1999. Calorimetric and molecular mechanics studies of the thermotropic phase behavior of membrane phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta* 1422, 273-307.
- Jensen, L.B., Petersson, K., Nielsen, H.M., 2011. In vitro penetration properties of solid lipid nanoparticles in intact and barrier-impaired skin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 79, 68-75.
- Keough, K.M., Davis, P.J., 1979. Gel to liquid-crystalline phase transitions in water dispersions of saturated mixed-acid phosphatidylcholines. *Biochemistry* 18, 1453-1459.

- Kim, N., El-Khalili, M., Henary, M.M., Strekowski, L., Michniak, B.B., 1999. Percutaneous penetration enhancement activity of aromatic S, S-dimethyliminosulfuranes. *Int. J. Pharm.* 187, 219-229.
- Kirjavainen, M., Urtti, A., Valjakka-Koskela, R., Kiesvaara, J., Mönkkönen, J., 1999a. Liposome-skin interactions and their effects on the skin permeation of drugs. *Eur. J. Pharm. Sci.* 7, 279-286.
- Kirjavainen, M., Mönkkönen, J., Saukkosaari, M., Valjakka-Koskela, R., Kiesvaara, J., Urtti, A., 1999b. Phospholipids affect stratum corneum lipid bilayer fluidity and drug partitioning into the bilayers. *J. Control. Release* 58, 207-214.
- Kirjavainen, M., Urtti, A., Jääskeläinen, I., Suhonen, T.M., Paronen, P., Valjakka-Koskela, R., Kiesvaara, J., Mönkkönen, J., 1996. Interaction of liposomes with human skin in vitro--the influence of lipid composition and structure. *Biochim. Biophys. Acta* 1304, 179-189.
- Korkmaz, F., Severcan, F., 2005. Effect of progesterone on DPPC membrane: evidence for lateral phase separation and inverse action in lipid dynamics. *Arch. Biochem. Biophys.* 440, 141-147.
- Korting, H.C., Stolz, W., Schmid, M.H., Maierhofer, G., 1995. Interaction of liposomes with human epidermis reconstructed in vitro. *Br. J. Dermatol.* 132, 571-579.
- Kostecka-Gugala, A., Latowski, D., Strzalka, K., 2003. Thermotropic phase behaviour of alpha-dipalmitoylphosphatidylcholine multibilayers is influenced to various extents by carotenoids containing different structural features--evidence from differential scanning calorimetry. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* 1609, 193-202.
- Koynova, R., Caffrey, M., 1998. Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines. *Biochim. Biophys. Acta* 1376, 91-145.
- Kozak, M., Domka, L., Jurga, S., 2007. The effect of selected surfactants on the structure of a bicellar system (DMPC/DHPC) studied by SAXS. *J. Mol. Struct.* 846, 108-111.
- Kriwet, K., Müller-Goymann, C.C., 1994. Mutual interactions between diclofenac diethylamine and phospholipids - investigation on the microstructure of the arisen systems. *Pharmazie* 49, 187-191.
- Kweon, J.H., Chi, S.C., Park, E.S., 2004. Transdermal delivery of diclofenac using microemulsions. *Arch. Pharm. Res.* 27, 351-356.
- Kyrikou, I., Hadjikakou, S.K., Kovala-Demertzi, D., Viras, K., Mavromoustakos, T., 2004. Effects of non-steroid anti-inflammatory drugs in membrane bilayers. *Chem. Phys. Lipids* 132, 157-169.

- Lasch, J., Laub, R., Wohlrab, W., 1992. How deep do intact liposomes penetrate into human skin? *J. Control. Release* 18, 55-58.
- Lautenschlager, H., 1990. Liposomes in dermatological preparations. Part 1. *Cosmet. Toiletries* 105, 89-96.
- Lebwohl, M., 1999. The role of salicylic acid in the treatment of psoriasis. *Int. J. Dermatol.* 38, 16-24.
- Lee, Y., Kim, I.H., Kim, J., Yoon, J.-H., Shin, Y.H., Jung, Y., Kim, Y.M., 2010. Evaluation of dextran-flufenamic acid ester as a polymeric colon-specific prodrug of flufenamic acid, an anti-inflammatory drug, for chronotherapy. *J. Drug Targeting* 0, 1-8.
- Lopes, L.B., Scarpa, M.V., Pereira, N.L., Oliveira, L.C., Oliveira, A.G., 2006. Interaction of sodium diclofenac with freeze-dried soya phosphatidylcholine and unilamellar liposomes. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 42, 497-504.
- Lopes, L.B., Scarpa, M.V., Silva, G.V., Rodrigues, D.C., Santilli, C.V., Oliveira, A.G., 2004a. Studies on the encapsulation of diclofenac in small unilamellar liposomes of soya phosphatidylcholine. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 39, 151-158.
- Lopes, L.B., Scarpa, M.V., Silva, G.V., Rodrigues, D.C., Santilli, C.V., Oliveira, A.G., 2004b. Studies on the encapsulation of diclofenac in small unilamellar liposomes of soya phosphatidylcholine. *Colloids Surf., B* 39, 151-158.
- López, O., Cócera, M., Campos, L., de la Maza, A., Coderch, L., Parra, J.L., 2000. Use of wide and small angle X-ray diffraction to study the modifications in the stratum corneum induced by octyl glucoside. *Colloids Surf., A* 162, 123-130.
- López, O., Cócera, M., Walther, P., Wehrli, E., Coderch, L., Parra, J.L., de la Maza, A., 2001. Liposomes as protective agents of stratum corneum against octyl glucoside: a study based on high-resolution, low-temperature scanning electron microscopy. *Micron* 32, 201-205.
- López, O., Cócera, M., López-Iglesias, C., Walter, P., Coderch, L., Parra, J.L., de la Maza, A., 2002. Reconstitution of liposomes inside the intercellular lipid domain of the stratum corneum. *Langmuir* 18, 7002-7008.
- Lotte, C., Rougier, A., Wilson, D.R., Maibach, H.I., 1987. In vivo relationship between transepidermal water loss and percutaneous penetration of some organic compounds in man: effect of anatomic site. *Arch. Dermatol. Res.* 279, 351-356.
- Luengo, J., Weiss, B., Schneider, M., Ehlers, A., Stracke, F., König, K., Kostka, K.H., Lehr, C.M., Schaefer, U.F., 2006. Influence of nanoencapsulation on human skin transport of flufenamic acid. *Skin Pharmacol. Physiol.* 19, 190-197.
- Manrique-Moreno, M., Garidel, P., Suwalsky, M., Howe, J., Brandenburg, K., 2009. The membrane-activity of Ibuprofen, Diclofenac, and Naproxen: a physico-

- chemical study with lecithin phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta* 1788, 1296-1303.
- Merkus, H.G., 2009. Dynamic Light Scattering. In: Scarlett, B. (Ed.), *Particle Size Measurements*. Springer Pijnacker, pp. 299-317.
- Merle, C., Baillet-Guffroy, A., 2009. Physical and chemical perturbations of the supramolecular organization of the stratum corneum lipids: In vitro to ex vivo study. *Biochim. Biophys. Acta* 1788, 1092-1098.
- Mezei, M., Gulasekharan, V., 1980. Liposomes: a selective drug delivery system for the topical route of administration. Lotion dosage form. *Life Sci.* 26, 1473-1477.
- Nielsen, J.B., 2005. Percutaneous penetration through slightly damaged skin. *Arch. Dermatol. Res.* 296, 560-567.
- Nielsen, J.B., Nielsen, F., Sorensen, J.A., 2007. Defense against dermal exposures is only skin deep: significantly increased penetration through slightly damaged skin. *Arch. Dermatol. Res.* 299, 423-431.
- Norlén, L., 2001. Skin barrier structure and function: the single gel phase model. *J. Invest. Dermatol.* 117, 830-836.
- Nounou, M.M., El-Khordagui, L.K., Khalafallah, N.A., Khalil, S.A., 2008. Liposomal formulation for dermal and transdermal drug delivery: Past, present and future. *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.* 2, 9-18.
- Nunes, C., Brezesinski, G., Lima, J.L., Reis, S., Lucio, M., 2011a. Synchrotron SAXS and WAXS study of the interactions of NSAIDs with lipid membranes. *J. Phys. Chem. B* 115, 8024-8032.
- Nunes, C., Brezesinski, G., Lima, J.L.F.C., Reis, S., Lúcio, M., 2011b. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the structure of lipid bilayers: therapeutical aspects. *Soft Matter* 7, 3002-3010.
- OECD, 2004a. Guideline 428: Skin absorption: In vitro method. In: OECD (Ed.), *OECD Guidelines for the testing of chemicals*, Paris, pp. 8.
- OECD, 2004b. Guidance document for the conduct of skin absorption studies number 28. In: OECD (Ed.), *OECD series on testing and assessment*, Paris.
- Ongpipattanakul, B., Francoeur, M.L., Potts, R.O., 1994. Polymorphism in stratum corneum lipids. *Biochim. Biophys. Acta* 1190, 115-122.
- Paolino, D., Lucania, G., Mardente, D., Alhaique, F., Fresta, M., 2005. Ethosomes for skin delivery of ammonium glycyrrhizinate: in vitro percutaneous permeation through human skin and in vivo anti-inflammatory activity on human volunteers. *J. Control. Release* 106, 99-110.

- Papahadjopoulos-Sternberg, B., 2010. Freeze-fracture electron microscopy on domains in lipid mono- and bilayer on nano-resolution scale. *Methods Mol. Biol.* 606, 333-349.
- Parsaee, S., Sarbolouki, M.N., Parnianpour, M., 2002. In-vitro release of diclofenac diethylammonium from lipid-based formulations. *Int. J. Pharm.* 241, 185-190.
- Pedersen, T.B., Sabra, M.C., Frokjaer, S., Mouritsen, O.G., Jorgensen, K., 2001. Association of acylated cationic decapeptides with dipalmitoylphosphatidylserine-dipalmitoylphosphatidylcholine lipid membranes. *Chem. Phys. Lipids* 113, 83-95.
- Pereira-Lachataignerais, J., Pons, R., Amenitsch, H., Rappolt, M., Sartori, B., López, O., 2006. Effect of sodium dodecyl sulfate at different hydration conditions on dioleoyl phosphatidylcholine bilayers studied by grazing incidence X-ray diffraction. *Langmuir* 22, 5256-5260.
- Pierre, M., dos Santos Miranda Costa, I., 2011. Liposomal systems as drug delivery vehicles for dermal and transdermal applications. *Arch. Dermatol. Res.* 303, 607-621.
- Plewig, G., Jansen, T., Schurer, N.Y., 1997. Stratum corneum. *Hautarzt* 48, 510-521; quiz 520.
- Potts, R.O., Francoeur, M.L., 1990. Lipid biophysics of water loss through the skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 3871-3873.
- Qiu, Y., Gao, Y., Hu, K., Li, F., 2008. Enhancement of skin permeation of docetaxel: a novel approach combining microneedle and elastic liposomes. *J. Control. Release* 129, 144-150.
- Rades, T., Müller-Goymann, C.C., 1997. Investigations on the micellisation behaviour of fenoprofen sodium. *Int. J. Pharm.* 159, 215-222.
- Rahman, S., Collins, M., Williams, C.M., Ma, H.L., 2011. The pathology and immunology of atopic dermatitis. *Inflamm. Allergy Drug Targets* 10, 486-496.
- Reeves, M.D., Schawel, A.K., Wang, W., Dea, P., 2007. Effects of butanol isomers on dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes. *Biophys. Chem.* 128, 13-18.
- Rodríguez, G., Rubio, L., Cócera, M., Estelrich, J., Pons, R., de la Maza, A., López, O., 2010. Application of bicellar systems on skin: diffusion and molecular organization effects. *Langmuir* 26, 10578-10584.
- Rodríguez, G., Barbosa-Barros, L., Rubio, L., Cócera, M., Díez, A., Estelrich, J., Pons, R., Caelles, J., Maza, A.D.I., López, O., 2009. Conformational changes in stratum corneum lipids by effect of bicellar systems. *Langmuir* 25, 10595-10603.

- Sanders, C.R., Schwonek, J.P., 1992. Characterization of magnetically orientable bilayers in mixtures of dihexanoylphosphatidylcholine and dimyristoylphosphatidylcholine by solid-state NMR. *Biochemistry* 31, 8898-8905.
- Schaefer, H., Redermeier, T.E., 1996. *Skin barrier: Principles of percutaneous absorption*. Karger-Verlag, Basel, 310 pp.
- Schreier, S., Malheiros, S.V., de Paula, E., 2000. Surface active drugs: self-association and interaction with membranes and surfactants. Physicochemical and biological aspects. *Biochim. Biophys. Acta* 1508, 210-234.
- Schutze, W., Muller-Goymann, C.C., 1998. Phase transformation of a liposomal dispersion into a micellar solution induced by drug-loading. *Pharm. Res.* 15, 538-543.
- Seddon, A.M., Casey, D., Law, R.V., Gee, A., Templer, R.H., Ces, O., 2009. Drug interactions with lipid membranes. *Chem. Soc. Rev.* 38, 2509-2519.
- Sega, M., Garberoglio, G., Brocca, P., Cantu, L., 2007. Microscopic structure of phospholipid bilayers: comparison between molecular dynamics simulations and wide-angle X-ray spectra. *J. Phys. Chem. B* 111, 2484-2489.
- Sekkat, N., Kalia, Y.N., Guy, R.H., 2004a. Porcine ear skin as a model for the assessment of transdermal drug delivery to premature neonates. *Pharm. Res.* 21, 1390-1397.
- Sekkat, N., Kalia, Y.N., Guy, R.H., 2004b. Development of an in vitro model for premature neonatal skin: biophysical characterization using transepidermal water loss. *J. Pharm. Sci.* 93, 2936-2940.
- Senzui, M., Tamura, T., Miura, K., Ikarashi, Y., Watanabe, Y., Fujii, M., 2009. Study on penetration of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles into intact and damaged skin in vitro. *J. Toxicol. Sci.* 35, 107-113.
- Severcan, F., Sahin, I., Kazanci, N., 2005. Melatonin strongly interacts with zwitterionic model membranes--evidence from Fourier transform infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* 1668, 215-222.
- Shapiro, R.A., Brindley, A.J., Martin, R.W., 2010. Thermal Stabilization of DMPC/DHPC Bicelles by Addition of Cholesterol Sulfate. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 11406-11407.
- Siegel, D.P., Green, W.J., Talmon, Y., 1994. The mechanism of lamellar-to-inverted hexagonal phase transitions: a study using temperature-jump cryo-electron microscopy. *Biophys. J.* 66, 402-414.

- Simon, G.A., 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.
- Simonsen, L., Fullerton, A., 2007. Development of an in vitro skin permeation model simulating atopic dermatitis skin for the evaluation of dermatological products. *Skin. Pharmacol. Physiol.* 20, 230-236.
- Sternin, E., Nizza, D., Gawrisch, K., 2001. Temperature dependence of DMPC/DHPC mixing in a bicellar solution and its structural implications. *Langmuir* 17, 2610-2616.
- Stoye, I., Schroder, K., Muller-Goymann, C.C., 1998. Transformation of a liposomal dispersion containing ibuprofen lysinate and phospholipids into mixed micelles - physico-chemical characterization and influence on drug permeation through excised human stratum corneum. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 46, 191-200.
- Struppe, J., Vold, R.R., 1998. Dilute bicellar solutions for structural NMR work. *J. Magn. Reson.* 135, 541-546.
- Thong, H.Y., Zhai, H., Maibach, H.I., 2007. Percutaneous penetration enhancers: an overview. *Skin Pharmacol. Physiol.* 20, 272-282.
- Trotta, M., Peira, E., Carlotti, M.E., Gallarate, M., 2004. Deformable liposomes for dermal administration of methotrexate. *Int. J. Pharm.* 270, 119-125.
- Tsai, J.C., Sheu, H.M., Hung, P.L., Cheng, C.L., 2001. Effect of barrier disruption by acetone treatment on the permeability of compounds with various lipophilicities: implications for the permeability of compromised skin. *J. Pharm. Sci.* 90, 1242-1254.
- van Dam, L., Karlsson, G., Edwards, K., 2006. Morphology of magnetically aligning DMPC/DHPC aggregates-perforated sheets, not disks. *Langmuir* 22, 3280-3285.
- Van den Bergh, B.A., Swartzendruber, D.C., Bos-Van der Geest, A., Hoogstraate, J.J., Schrijvers, A.H., Boddé, H.E., Junginger, H.E., Bouwstra, J.A., 1997. Development of an optimal protocol for the ultrastructural examination of skin by transmission electron microscopy. *J. Microsc.* 187 (Pt 2), 125-133.
- Visscher, I., Stuart, M.C., Engberts, J.B., 2006. The influence of phenyl and phenoxy modification in the hydrophobic tails of di-n-alkyl phosphate amphiphiles on aggregate morphology. *Org. Biomol. Chem.* 4, 707-712.
- Vold, R.R., Prosser, R.S., 1996. Magnetically oriented phospholipid bilayered micelles for structural studies of polypeptides. Does the ideal bicelle exist? *J. Magn. Res. ser B* 113, 267-271.

- Walters, K.A., Roberts, M.S., 2002. The structure and function of skin. In: Walters, K.A. (Ed.), *Dermatological and transdermal formulations*. Marcel Dekker, New York-Basel pp. 1-40.
- Wang, H., de Joannis, J., Jiang, Y., Gaubing, J.C., Albrecht, B., Yin, F., Khanna, K., Kindt, J.T., 2008. Bilayer edge and curvature effects on partitioning of lipids by tail length: atomistic simulations. *Biophys. J.* 95, 2647-2657.
- Warner, T.D., Giuliano, F., Vojnovic, I., Bukasa, A., Mitchell, J.A., Vane, J.R., 1999. Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 7563-7568.
- Williams, A.C., Barry, B.W., 2006. Chemical permeation enhancement. In: Touitou, E., Barry, B.W. (Eds.), *Enhancement in drug delivery*. CRC Press.
- Wu, X.M., Todo, H., Sugibayashi, K., 2006. Effects of pretreatment of needle puncture and sandpaper abrasion on the in vitro skin permeation of fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran. *Int. J. Pharm.* 316, 102-108.

