



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Desarrollo y caracterización de liposomas para aplicación tópica de fármacos

Martha Leticia Vázquez Gonzalez

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) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) 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 ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (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) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) 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 o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (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 and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) 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 nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those 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.

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMACIA

DESARROLLO Y CARACTERIZACION DE LIPOSOMAS PARA APLICACIÓN TÓPICA DE FÁRMACOS

MARTHA LETICIA VAZQUEZ GONZALEZ

2015

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

PROGRAMA DE DOCTORAT
Reserca, Control i Desenvolupament de Medicaments

DESARROLLO Y CARACTERIZACION DE LIPOSOMAS PARA APLICACIÓN
TÓPICA DE FÁRMACOS

Memòria presentada per Martha Leticia Vázquez González per optar al títol de doctor
per la universitat de Barcelona

Realitzada sota la direcció de:

Jordi Borrell Hernández
Ana Cristina Calpena Capmany

Martha Leticia Vázquez González

Tutor

Jordi Borrell Hernández

Martha Leticia Vázquez González, 2015

A mi madre y mi abuela

*Gracias por su alquimia,
que ha contribuido a mi propia transformación*

Resumen

La piel es el órgano más extenso y accesible del cuerpo, debido a ello la administración de fármacos por vía tópica para efectos locales o sistémicos ha sido ampliamente documentada. A pesar de todas las ventajas que la administración tópica de fármacos ofrece, la piel y su compleja estructura formada de múltiples capas, la cual le proporciona excelentes propiedades de barrera, hacen que la administración de medicamentos a través de esta vía sea un proceso complicado.

En las últimas décadas, con la finalidad de evadir la extraordinaria función de barrera del estrato córneo, se han empleado diversas estructuras nanoscópicas que han aumentado el espectro de fármacos susceptibles de ser administrados por vía tópica.

Estos hechos alientan la investigación en el desarrollo de formulaciones para mejorar la administración tópica de fármacos.

En la presente investigación, diseñamos formulaciones de liposomas para la administración tópica de fármacos, teniendo como hipótesis que la adición extemporánea de un *activador de membrana* en los liposomas, desestabiliza parcialmente las vesículas para que al contacto con la superficie de la piel humana promueva la liberación del principio activo y con ello aumente su biodisponibilidad.

Se estudiaron dos fármacos, el ibuprofeno y el ácido hialurónico (AH), y la eficacia de las formulaciones fue evaluada mediante ensayos *in vitro* y *ex vivo* con piel humana.

Posteriormente, para tener un conocimiento más profundo acerca de cómo las formulaciones desarrolladas aumentan la liberación de los fármacos, se utilizó el microscopio de fuerza atómica (AFM) y se observaron las estructuras que forman las formulaciones desarrolladas al ser aplicadas en la superficie de la piel humana.

Inicialmente, se utilizó fosfatidilcolina (PC) para producir los liposomas y en una segunda etapa de la investigación, se diseñó una composición biomimética con los

principales componentes del estrato córneo. En base a esta composición se siguió la estrategia de incorporar los fármacos previamente estudiados, en combinación con los surfactantes seleccionados. La eficacia de las formulaciones fue evaluada y se verificó que la adición de potenciadores de la permeación (PEs) a liposomas, mejora la permeación de AH e ibuprofeno a través de la piel humana.

En relación a las imágenes obtenidas mediante el AFM, se observó que la adición de PEs promueve claramente la formación de las estructuras planas, debido a las regiones, parecidas a bicapas o multicapas de lípidos, en coexistencia con liposomas no fusionados y/o intactos observadas.

Se estudiaron también las modificaciones de las propiedades elásticas que se producen en las formulaciones desarrolladas al ser aplicadas, lo que permitió correlacionar estas propiedades con la permeación del fármaco incorporado en los liposomas. Por lo tanto, la técnica empleada en el desarrollo del presente trabajo de investigación puede utilizarse como herramienta auxiliar en el desarrollo de sistemas nano vesiculares para administración transdérmica de fármacos.

Abstract

The skin is the extensive and most accessible organ of the body because of that, topical and systemic delivery of drugs are widely documented.

Even though all the advantages that topical drug delivery offers, the skin and their multilayered complex structure, provide excellent barrier properties which imply a complicated process to delivery of drugs through this administration via.

From the last decades, in order to avoid the *SC* barrier, several nanocarrier structures have been developed to accomplish the administration of drugs by topical via.

All of these facts encourage to investigating in the development of formulations to enhance drug delivery through the skin.

In the present study, we design liposomal formulations for topical delivery according the thermodynamic stability of the components.

Once obtained the adequate components, we started to develop liposomal formulations taking into account a preliminary hypothesis: the enhancement of the permeation of the drugs encapsulated in liposomes are relating with the ability to form planar bilayers.

We studied the permeation through artificial membranes and human skin of two molecules, ibuprofen and hyaluronic acid, when they were entrapped in liposomes.

To have a deeper knowledge about how the formulations developed are enhancing the liberation of drugs from the liposomes when applied to the human skin, the atomic force microscopy (AFM) was used.

Initially, phosphatidylcholine (PC) was used to produce the liposomes. In a second stage of the investigation, a biomimetic composition with the main components of the stratum corneum was designed. The efficacy of the formulations was evaluated and we

confirmed that the addition of permeation enhancers (PEs) to liposomes improves the permeation of AH and ibuprofen through human skin.

Regarding the images obtained by the AFM, it was observed that the addition of PEs clearly promotes the formation of planar structures due to the regions like bilayers or multilayers lipids, in coexistence with liposomes fused and /or intact observed.

Changes in the elastic properties that occur in the formulations developed to be applied is also studied, allowing to correlate these properties with the permeation of drug incorporated into liposomes. Therefore, the technique used in the development of this research can be used as an auxiliary tool in the development of nanovesicular systems for transdermal drug delivery.

Resum

La pell és l'òrgan més extens i accessible del cos, per aquesta raó l'administració de fàrmacs per via tòpica per a efectes locals o sistèmics ha estat àmpliament documentada. Malgrat tots els avantatges que l'administració tòpica de fàrmacs ofereix, la pell i la seva complexa estructura formada de múltiples capes, la qual li proporciona excel·lents propietats de barrera, fan que l'administració de medicaments a través d'aquesta via sigui un procés complicat.

En les últimes dècades, amb la finalitat d'evadir l'extraordinària funció de barrera de l'estrat corni, s'han emprat diverses estructures nanoscòpiques que han augmentat l'espectre de fàrmacs susceptibles de ser administrats per via tòpica.

Els fets esmentats anteriorment encoratgen la investigació en el desenvolupament de formulacions per millorar l'administració tòpica de fàrmacs.

En la present investigació, vam dissenyar formulacions de liposomes per a l'administració tòpica de fàrmacs, tenint com a hipòtesi que l'addició extemporània d'un activador de membrana en els liposomes, desestabilitza parcialment les vesícules perquè al contacte amb la superfície de la pell humana promogui l'alliberament del principi actiu i amb això augmenti la seva biodisponibilitat.

Es van estudiar dos fàrmacs, l'ibuprofèn i l'àcid hialurònic (AH), i l'eficàcia de les formulacions va ser avaluada mitjançant assaigs *in vitro* i *ex vivo* amb pell humana.

Posteriorment, per tenir un coneixement més profund sobre com les formulacions desenvolupades augmenten l'alliberament dels fàrmacs, es va utilitzar el microscopi de força atòmica (AFM) i es van observar les estructures que formen les formulacions desenvolupades en ser aplicades a la superfície de la pell humana.

Inicialment, es va utilitzar fosfatidilcolina (PC) per produir els liposomes i en una segona etapa de la investigació, es va dissenyar una composició biomimètica amb els principals components de l'estrat corni. En base a aquesta composició es va seguir l'estratègia d'incorporar els fàrmacs prèviament estudiats, en combinació amb els surfactants seleccionats.

L'eficàcia de les formulacions va ser avaluada i es va verificar que l'addició de potenciadors de la permeació (PEs) a liposomes millora la permeació d'AH i d'ibuprofèn a través de la pell humana.

En relació a les imatges obtingudes mitjançant l'AFM, es va observar que l'addició de PEs promou clarament la formació d'estructures planes, degut a les diferents regions, semblants a bicapes o multicapes de lípids, en coexistència amb liposomes no fusionats i/o intactes observats.

Es van estudiar també les modificacions de les propietats elàstiques que es produeixen en les formulacions desenvolupades en ser aplicades. Això va permetre correlacionar aquestes propietats amb la permeació del fàrmac incorporat als liposomes. Per tant, la nova tècnica obtinguda durant la realització del present treball de recerca pot ser utilitzada com a eina auxiliar en el desenvolupament de sistemes nano vesiculars per a l'administració transdèrmica de fàrmacs.

Contenido

Capítulo 1. Introducción: visión actual de la administración tópica de fármacos ...	1
1.1 Administración tópica de fármacos	1
1.2 Estructura de la piel: la principal barrera para la administración de fármacos..	3
1.2.1 Epidermis	4
1.2.2 Dermis	6
1.2.3 Hipodermis	7
1.3 Administración de fármacos a través de la piel: rutas para lograr el objetivo...	8
1.3.1 Vía transepidérmica.....	8
1.3.2 Vía apéndice	9
1.4 Estrategias para mejorar la administración tópica de fármacos.....	10
1.5 Liposomas: una estrategia para mejorar la permeación transdérmica	14
1.5.1 Desarrollo de sistemas vesiculares para administración tópica de fármacos	17
1.5.2 Mecanismos de acción de los liposomas para administración tópica	20
1.6 Fármacos vehiculizados en liposomas para administración tópica	24
1.6.1 Fármacos Antiinflamatorios.....	24
1.6.1.1 Ibuprofeno.....	26
1.6.2 Fármacos cicatrizantes y para el tratamiento de quemaduras	27
1.6.2.1 Ácido hialurónico	30
1.7 Caracterización topográfica de los sistemas vesiculares para administración tópica de fármacos	32
1.7.1 Microscopio de fuerza atómica	33
Capítulo 2. Objetivos.....	39

Capítulo 3. Resultados	43
3.1 Evaluación de la eficacia de los liposomas como sistemas de administración tópica de fármacos	45
3.2 Comprendiendo el fenómeno de interacción en superficies para mejorar la administración tópica de fármacos.....	59
3.3 Desarrollo de una formulación lipídica biomimética con la piel para mejorar la liberación de fármacos en función de parámetros termodinámicos.....	73
3.4 Desarrollo de formulaciones basadas en liposomas que biomimetizan el estrato córneo para mejorar la liberación de fármacos por vía tópica.....	91
Capítulo 4. Discusión general	112
Capítulo 5. Conclusiones	124
Capítulo 6. Bibliografía	127
Apendices	144
Aprendice A. Abreviaturas	144
Apéndice B. Contribuciones a congresos.....	146
Apéndice C. Agradecimientos.....	159

Capítulo 1.

Introducción: Visión actual de la administración tópica de fármacos



Introducción: Visión actual de la administración tópica de fármacos

1.1 Administración tópica de fármacos

Hoy en día las vías de administración de fármacos oral e intravenosa son las más comunes, sin embargo en las últimas décadas el desarrollo de nuevas tecnologías de liberación de principios activos se ha centrado en la administración tópica de fármacos. Esta vía ofrece diversas ventajas, entre las que se incluyen: eliminación del efecto del primer paso, reducción de las fluctuaciones de los niveles del fármaco a nivel plasmático, y presenta una buena aceptación por el paciente [1].

La administración tópica de fármacos ofrece la posibilidad de obtener efectos a nivel local o sistémico. La administración de fármacos en la piel para efectos locales se define como administración dérmica, y es principalmente utilizada para tratamientos dermatológicos, vacunas o aplicaciones cosméticas. Por otra parte, la administración transdérmica se refiere a la distribución del fármaco a nivel sistémico [2].

Sin embargo, es necesario desarrollar nuevas estrategias para mejorar la biodisponibilidad dérmica y transdérmica de los fármacos aplicados en la piel, debido a la capacidad que ésta posee para actuar como barrera.

Los principales factores para que un fármaco tenga efectos locales o sistémicos se basan en las características del principio activo farmacológico, el tejido (piel) y el vehículo [3].

Como la modificación de las propiedades fisicoquímicas de las moléculas son limitadas y las características fisicoquímicas de la piel pueden afectar a sus funciones fisiológicas, la mejor alternativa para mejorar la administración de fármacos en la piel consiste en modificar el vehículo.

Un gran número de formulaciones han sido utilizadas tradicionalmente para la administración tópica de fármacos entre las que se incluyen soluciones, emulsiones, ungüentos, pastas, polvos, etc. En primera instancia, estas formulaciones fueron

utilizadas para actuar a nivel local, sin embargo en la actualidad se persigue obtener un efecto sistémico. A finales de la década de los setenta, como resultado de una intensa investigación sobre la administración tópica para efectos sistémicos, comenzó la comercialización de los parches como una nueva formulación para la vía tópica [4].

Actualmente existen en el mercado más de 100 fármacos formulados como cremas o ungüentos y hay 19 que combinan diferentes estrategias para la administración transdérmica [5].

Como se ha expuesto anteriormente son muchos los beneficios que pueden obtenerse mediante la administración tópica, sin embargo existen aún diversos aspectos sobre el desarrollo farmacéutico de estos medicamentos que necesitan ser resueltos para obtener un mayor beneficio y convertirse en una real alternativa para la administración de fármacos.

El interés en desarrollar medicamentos de administración tópica se refleja en la cantidad de ensayos clínicos que actualmente se encuentran activos, tan solo en la FDA existen registrados 700 estudios enfocados hacia esta vía de administración [6]

1.2 Estructura de la piel: la principal barrera para la administración de fármacos

La piel es el órgano más grande en extensión y peso de nuestro cuerpo, el cual nos protege contra agentes mecánicos, microbiológicos, físicos y químicos. Está formado por tres capas, epidermis, dermis e hipodermis. En la figura 1 se muestra la estructura de la piel con sus principales componentes.

Como consecuencia de su estructura y al complejo sistema de organización de estas capas, la piel cumple con diversas funciones, entre las que se encuentran:

- Protección: actúa como barrera de interface entre los órganos internos y el medio ambiente.
- Regulación: mantiene la homeostasis como resultado de regular la pérdida de agua.
- Percepción: contiene terminales nerviosas sensoriales.

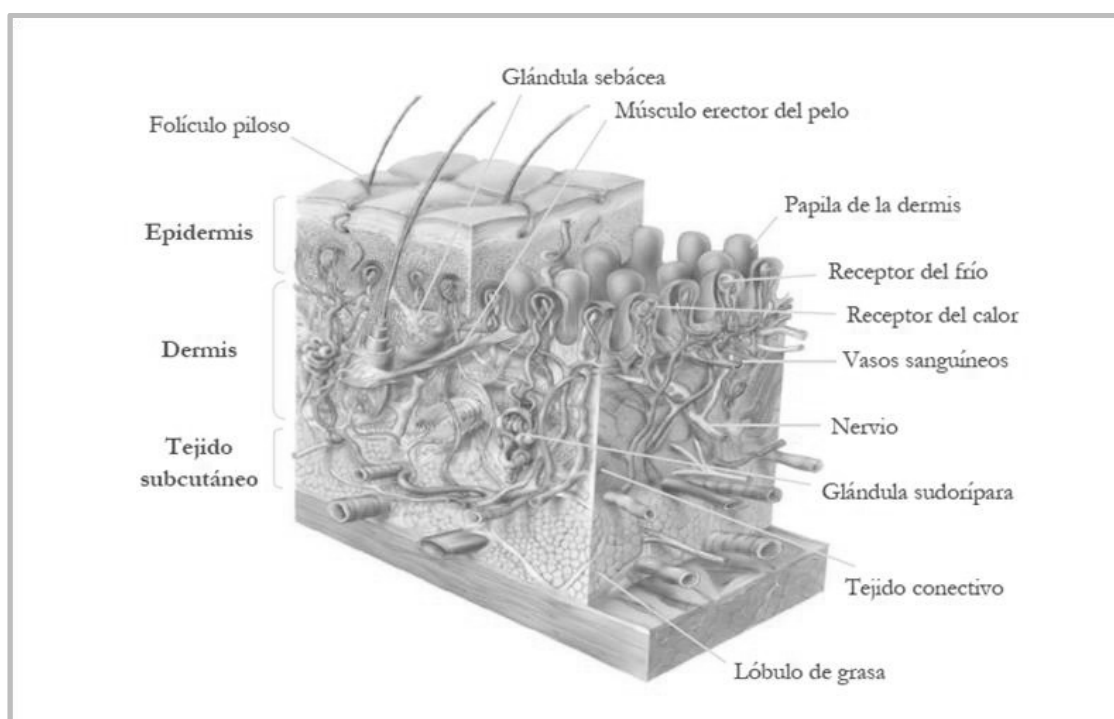


Figura 1. Estructura de la piel y sus principales componentes [7]

1.2.1 Epidermis

La epidermis es la capa más externa de la piel, con un espesor que varía de 0,02 a 0,2 mm según la zona anatómica. En la figura 2 se muestra la estructura de la epidermis que está formada por el estrato córneo, estrato granular, estrato espinoso y estrato basal [8].

Es un tejido que se renueva constantemente debido al proceso de descamación. Este proceso ocurre por la constante división celular de las células madre en la capa basal que generan queratinocitos, mediante el proceso de maduración éstas células se diferencian originando células planas llamadas corneocitos [9]. En la Figura 2 se representan las diferentes capas que forman la epidermis.

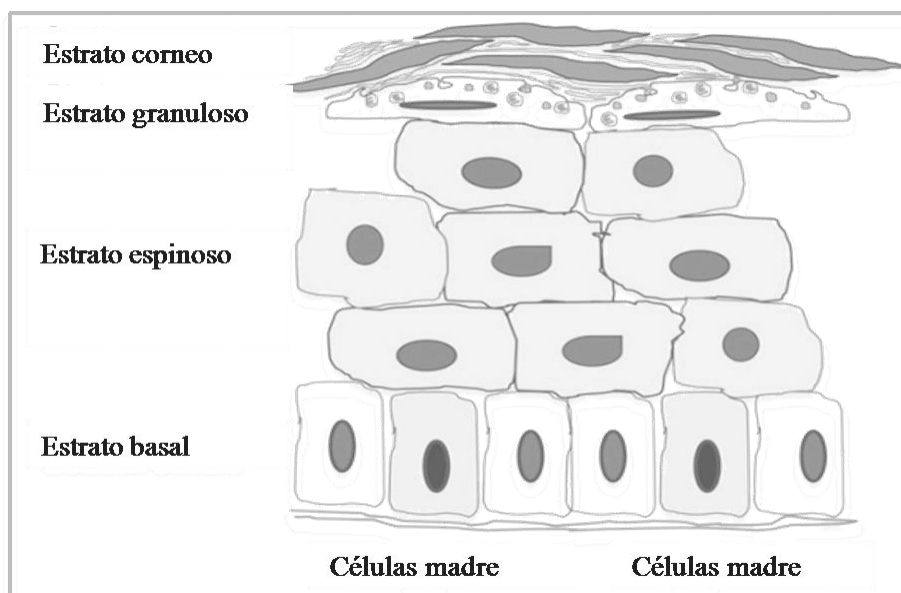


Figura 2. Esquema de la epidermis y sus cuatro capas. Modificado de [10]

La capa más externa de la epidermis es el estrato córneo, tal como se observa en el esquema de la figura 3 está formada por células muertas bien organizadas embebidas de queratina, rodeadas por una matriz lipídica; en su conjunto estos elementos forman la barrera “real” de la piel. Esta estructura es con frecuencia comparada con el modelo

llamado de ladrillo y cemento, *brick wall model* donde los corneocitos representan los ladrillos, y el cemento está representado por la región intercelular de dominios lipídicos [11].

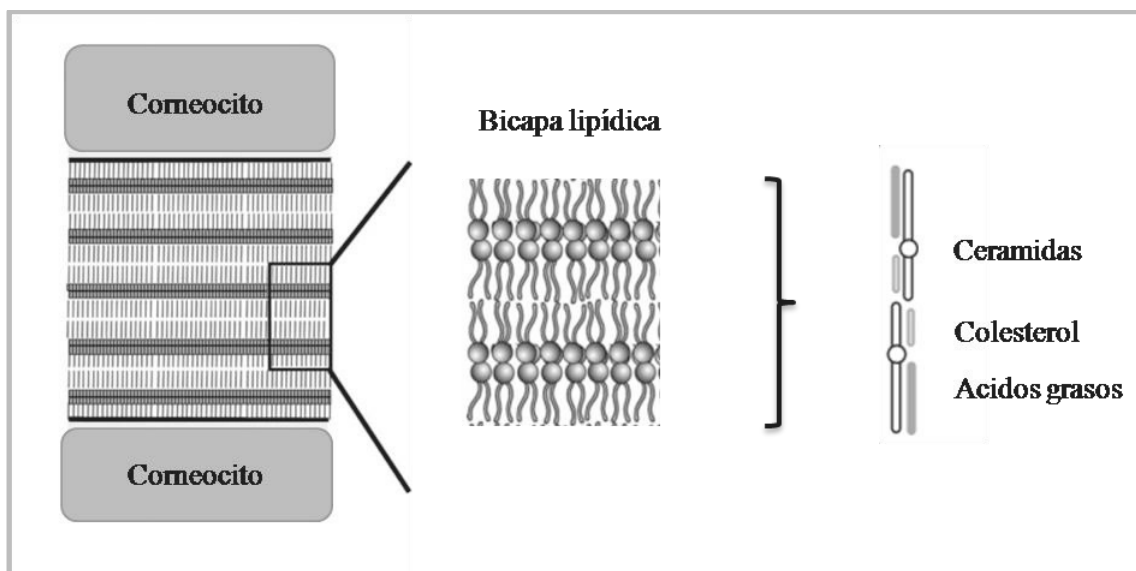


Figura 3. Representación de las estructuras que forman el estrato córneo: corneocitos y matriz lipídica.

Debido a que su composición y organización difiere notoriamente de otras membranas biológicas, la disposición molecular de estos lípidos es considerada de relevante importancia para la función de barrera de la piel [9]. La matriz lipídica del estrato córneo contiene aproximadamente cantidades equimolares de ceramidas, ácidos grasos y colesterol [12,13].

En el espacio intercelular del estrato córneo han sido identificadas al menos quince subclases de ceramidas [14–16]. Las moléculas de ceramidas se componen de un ácido graso unido a la esfingosina, las más comunes tienen cadenas hidrocarbonadas de entre 24 y 26 átomos de carbono. Estas ceramidas se forman principalmente de esfingosinas con longitudes de 18 a 22 átomos de carbono y tres diferentes ácidos grasos. Las combinaciones entre estos tipos de esfingosinas y ácidos grasos forman las principales estructuras de ceramidas en el estrato córneo. En la figura 4 se muestran las estructuras químicas de los lípidos presentes en el estrato córneo.

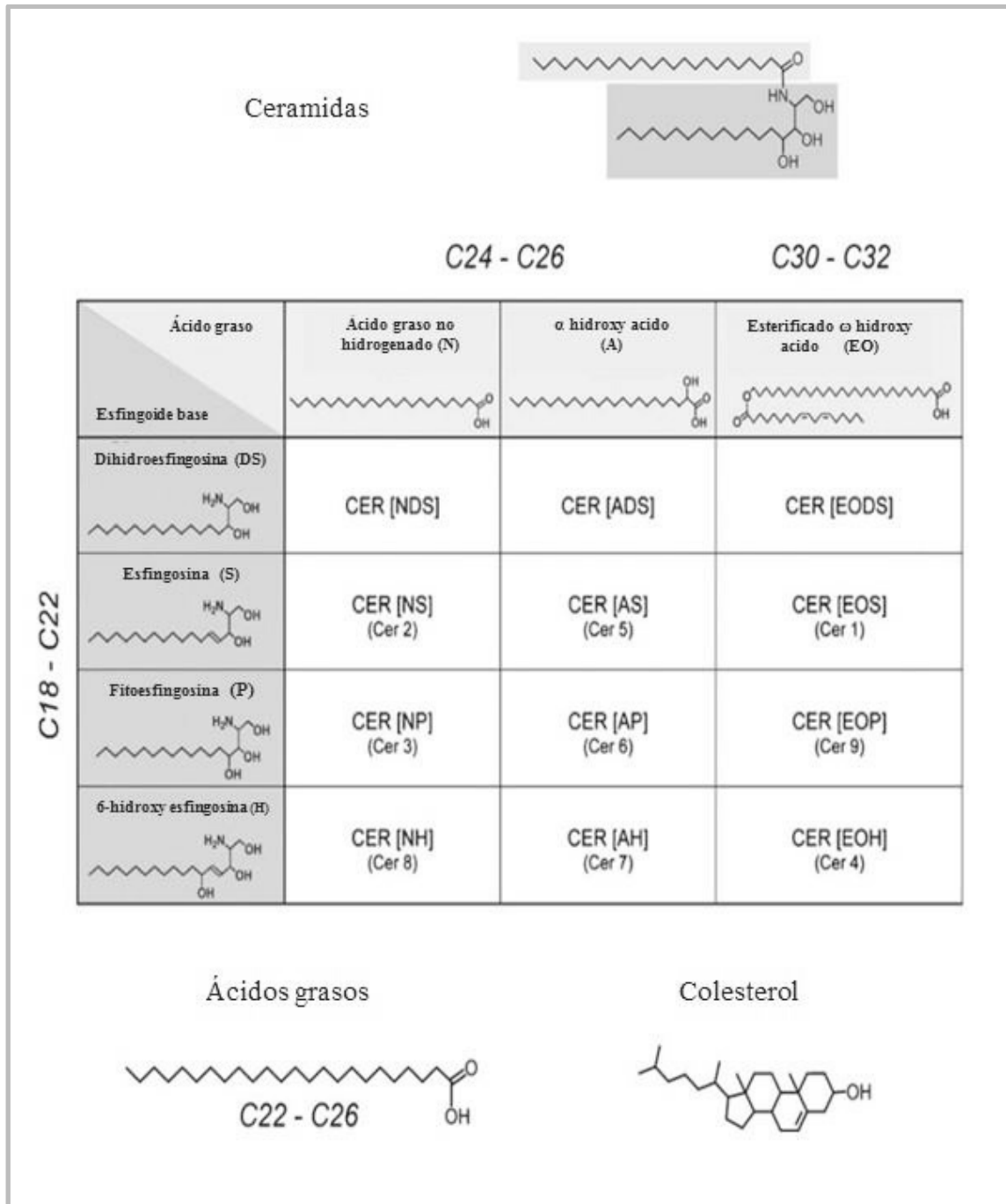


Figura 4. Estructuras químicas de los lípidos presentes en el estrato córneo [17]

1.2.2 Dermis

Es la vía de entrada de fármacos a la circulación sistémica después de haber atravesado la epidermis, es un tejido altamente irrigado con un grosor de 1 a 5 mm. Está formado por vasos sanguíneos y linfáticos. Los principales tipos de células que forman

la dermis son: fibroblastos que se encargan de producir el tejido conectivo, mastocitos que están involucrados en las respuestas inmune e inflamatoria y melanocitos, implicados en la producción de melanina.

La amplia red vascular que contiene, provee a la piel de nutrientes y para el resto del cuerpo brinda un papel importante en la regulación de la presión, temperatura y dolor debido a los corpúsculos sensoriales que posee [18].

1.2.3 Hipodermis

Es la capa más profunda de la piel, se le llama también tejido subcutáneo. La hipodermis ofrece protección contra golpes mecánicos, aísla el cuerpo del frío y calor externos y participa activamente en el metabolismo y almacenamiento de energía [19].

Está formada por una red de células adiposas interconectadas por fibras de colágeno y elastina, así como macrófagos y fibroblastos. En esta capa se originan las glándulas sebáceas y los folículos pilosos.

Haciendo un resumen sobre las características de las diferentes capas que forman la piel, podemos establecer que la dermis e hipodermis, son las barreras más eficientes para los agentes mecánicos y térmicos, mientras que la epidermis constituye la principal barrera para los agentes químicos.

1.3 Vías de administración de fármacos a través de la piel: rutas para lograr el objetivo

En las últimas décadas, ha existido un constante debate en relación a las posibles rutas de permeación de fármacos a través de la piel, no obstante está bien aceptado que para cualquier molécula que se aplica en este tejido existen dos principales vías de permeación: la transepidérmica y la apendicular. En la Figura 5 se muestra una representación esquemática de éstas vías de permeación. Sin embargo, también se ha considerado que podrían estar actuando en paralelo algunos otros mecanismos de permeación.

La principal controversia está relacionada en que, siendo la piel una estructura de compleja naturaleza y heterogeneidad, es sorprendente que el principal proceso de permeación de fármacos se describa a través de la ecuación básica que expresa la primera ley de Fick [20].

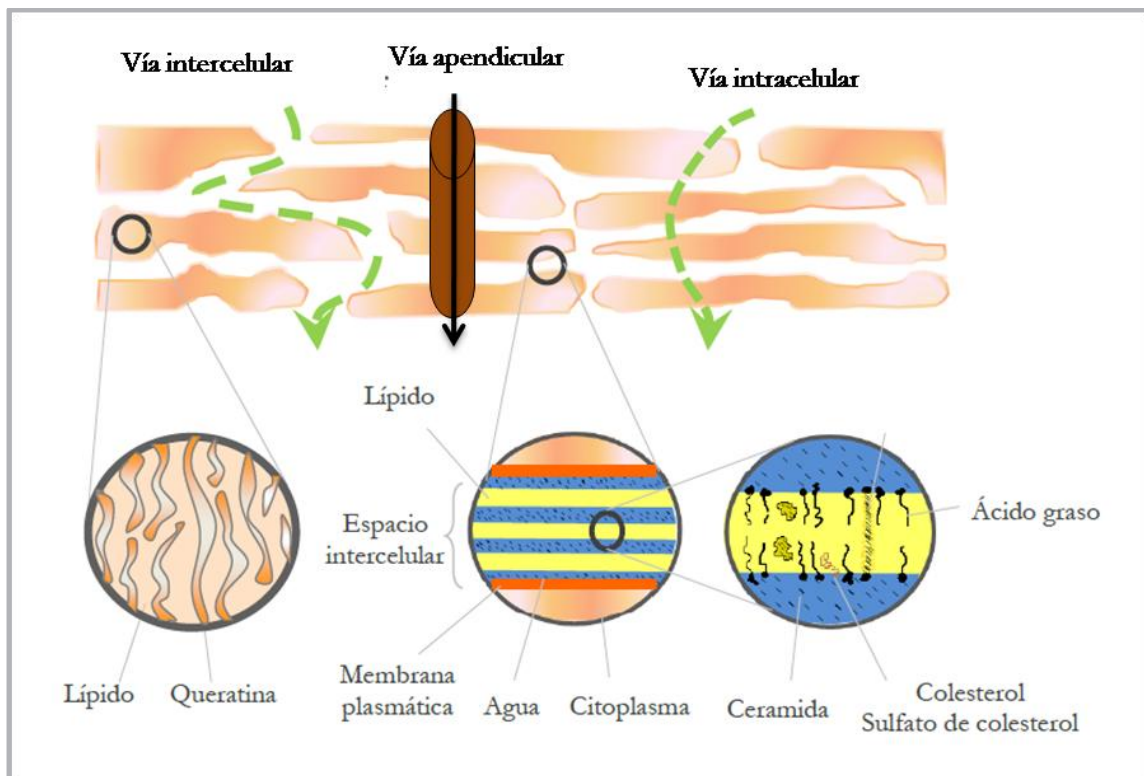


Figura 5. Rutas de permeación de fármacos a través de la piel [21]

1.3.1 Vía transepidérmica

Esta vía constituye la principal ruta en la permeación de fármacos, se puede definir como la ruta donde los compuestos permean a través del estrato córneo intacto. Está formada a su vez de dos micro vías, la intercelular y la intracelular.

- a. **Vía intercelular.** Es el camino del fármaco a través de la matriz lipídica que existe entre los corneocitos. Los fármacos lipófilos se difunden a través de los espacios extracelulares y los más polares a través de la parte hidrófila de los lípidos. Aunque exista una pequeña superficie disponible para esta ruta, es considerada como la principal para la mayoría de las moléculas [22].

- b. **Vía intracelular.** En esta vía el fármaco pasa a través de los corneocitos y los lípidos extracelulares que forman el estrato córneo. Esto hace que el paso del fármaco a través de esta vía sea menos relevante, debido a que como se puede observar en la Figura 5, los fármacos que utilizan esta ruta no solamente tienen que atravesar por las fibras de queratina de los corneocitos, sino también por la matriz lipídica entre ellos.

1.3.2 Vía apendicular

Esta ruta de permeación es considerada la más rápida para el acceso de los fármacos, se lleva a cabo a través de las glándulas sudoríparas, sebáceas o folículos pilosos. Es considerada también una ruta minoritaria, debido a que solo el 0.1 % de la superficie de la piel está cubierta por folículos pilosos [23].

Normalmente los fármacos utilizarán de forma combinada las diferentes rutas de permeación pero la más importante se definirá de acuerdo a las características fisicoquímicas de dicho fármaco.

1.4 Estrategias para mejorar la administración tópica de fármacos

Diversos métodos han sido desarrollados para mejorar la permeación de los fármacos a través de la piel. En la figura 6 se representa un diagrama con un resumen de las principales estrategias para mejorar la permeación transdérmica, entre las que se incluyen métodos físicos, manipulación del estrato córneo, sistemas de liberación, optimización del fármaco o el vehículo y la combinación de estrategias.

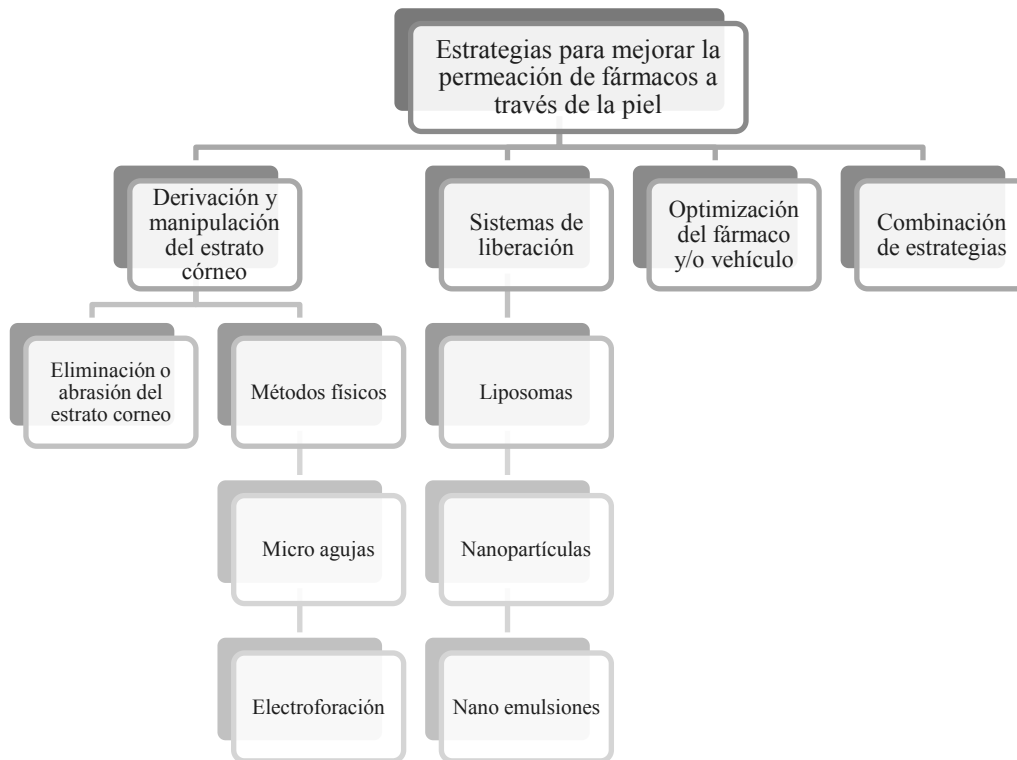


Figura 6. Diagrama de las estrategias para mejorar la permeación de fármacos en la piel.

Modificado de [2]

1.4.1 Derivación y manipulación del estrato córneo

La función de barrera de la piel la ejerce el estrato córneo, es por ello que una de las estrategias desarrolladas para mejorar la administración transdérmica de fármacos se enfoca en minimizar y/o evadir esta estructura.

Los métodos físicos están enfocados a crear una vía para que las moléculas puedan penetrar evitando el paso a través del estrato córneo. Un ejemplo lo constituyen las micro agujas, donde el fármaco recubre la superficie de las agujas para ayudar a su absorción [24].

Estos métodos también incluyen algunas técnicas como la electroporación y la iontoforesis, que utilizan gradientes de voltaje para generar una disrupción en la organización del estrato córneo [25,26].

Otras tecnologías que se incluyen en estas estrategias son la magnetoforesis, sonoforesis y la aplicación de ondas fotomecánicas, las cuales aplican energía electromagnética, ultrasónica o mecánica, respectivamente a la piel [27].

Estas técnicas han tenido un éxito limitado como métodos para administración transdérmica de fármacos y son utilizadas con frecuencia como métodos complementarios a otros existentes [28].

1.4.2 Optimización del fármaco y/o vehículo

La estrategia más sencilla para la administración transdérmica es seleccionar un fármaco que reúna ciertas características fisicoquímicas que lo harán susceptible para transportarse a través del tejido con una velocidad aceptable. Las características ideales para que un fármaco penetre de forma efectiva a través del estrato córneo son las siguientes [29]:

- Bajo peso molecular (< 600 Da). De esta forma su coeficiente de difusión será alto debido a que guardan una relación inversa. El coeficiente de difusión expresa la velocidad de difusión de un compuesto en un medio.
La estructura química del fármaco ejerce influencia sobre su difusión en el estrato córneo, debido entre otros factores a la formación de puentes de hidrógeno entre las cadenas polares de los lípidos y los puentes polares presentes en la estructura del fármaco. Como regla general el fármaco no debe tener capacidad para formar más de dos puentes de hidrógeno [30].
- Adecuada solubilidad en medio acuoso y lipófilo. La actividad depende de la concentración y solubilidad del fármaco, así como de las interacciones fármaco-vehículo. Las soluciones saturadas tienen la máxima actividad, ya que al aumentar la concentración del fármaco disuelto en el vehículo el gradiente de concentración entre el fármaco y la superficie cutánea será mayor, lo que se traduce en una mayor cantidad de fármaco liberado [31].
- Coeficiente de reparto alto. Existe una relación parabólica entre el coeficiente de reparto, normalmente expresado como $\log P$ y el reparto en la piel, esto implica que los compuestos con un bajo $\log P$ presentan una baja permeación debido a su bajo reparto en los lípidos del estrato córneo (tienen más afinidad por el vehículo), sin embargo los fármacos con un $\log P$ elevado también poseen una baja permeabilidad por su incapacidad de reparto fuera del estrato córneo (tienden a quedarse retenidos en la matriz lipídica). Se acepta que la máxima permeación se consigue para valores de $\log P$ de 1 a 3 [32].

1.4.3 Sistemas de liberación

Una de las estrategias más utilizadas en la actualidad es el desarrollo de sistemas nanoscópicos: nanovesiculares y nanoparticulares como sistemas de administración cutáneos. Inicialmente estos sistemas fueron planeados para las vías oral o parenteral, y actualmente continúan siendo objeto de diversos estudios, sin embargo el uso de estos sistemas para la administración dérmica y transdérmica está justificado por diversos factores. Por una parte, tienen la ventaja de proteger la sustancia que contienen,

umentando la vida útil del fármaco. Por otra parte, estos sistemas podrían estar actuando como potenciadores de la penetración y además funcionar como depósitos para una liberación sostenida.

Estos sistemas han demostrado un aumento de la absorción del fármaco, penetración, tiempo de vida media, biodisponibilidad y estabilidad. Debido a su tamaño que no es perceptible para el sistema inmune, pueden liberar el fármaco en el tejido diana usando dosis más bajas [21].

Entre los sistemas de liberación más utilizados se encuentran los liposomas, nanopartículas y nanoemulsiones.

- Los liposomas son vesículas constituidas por una o varias bicapas fosfolipídicas concéntricas, con un compartimento acuoso en el interior. Dada su constitución tienen la posibilidad de integrar diversas sustancias activas hidrosolubles, liposolubles o anfifílicas [33]. Debido a que son el objeto de estudio de este trabajo posteriormente se detallarán diferentes aspectos de estos sistemas.
- Las nanopartículas están formadas a partir de materiales como polímeros, lípidos, polisacáridos y proteínas que las hacen resistentes a cambios de pH, temperatura y a la acción enzimática. Se clasifican en nanoesferas y nanocapsulas. Las nanoesferas son estructuras de núcleo sólido y las nanocapsulas son estructuras alveolares [34].
- Las nanoemulsiones son dispersiones coloidales translucidas de dos líquidos inmiscibles estabilizadas por un surfactante, con un tamaño de gota de 20 a 200 nm. Este tamaño de gota hace que posea una estabilidad cinética elevada ante la sedimentación, floculación y coalescencia. No obstante a esta estabilidad cinética, presenta inestabilidad termodinámica, ya que es necesario emplear energía para formarlas [35].

1.5 Liposomas: una estrategia para mejorar la permeación transdérmica

Los liposomas son sistemas vesiculares que fueron obtenidos por primera vez por Bangham en 1960 [36], desde entonces sus características llamaron la atención y se utilizaron para como una estrategia para mejorar la administración de fármacos. Sin embargo, no fue hasta inicios de los años ochenta cuando se publicaron por primera vez resultados que mostraban su valor potencial como sistemas de liberación [37]. Desde entonces, los liposomas se han convertido en una de las estrategias más estudiadas para mejorar la administración de fármacos la vía transdérmica.

Los liposomas son vesículas que envuelven un volumen acuoso. Están formados por una o múltiples bicapas de lípidos formadas por el autoensamblaje de moléculas anfifílicas. La figura 7 muestra la estructura y formación de los liposomas.

Estas vesículas pueden encapsular moléculas hidrófilas en el espacio acuoso interno, o bien moléculas lipófilas o anfifílicas que se incrustan en sus bicapas concéntricas [38].

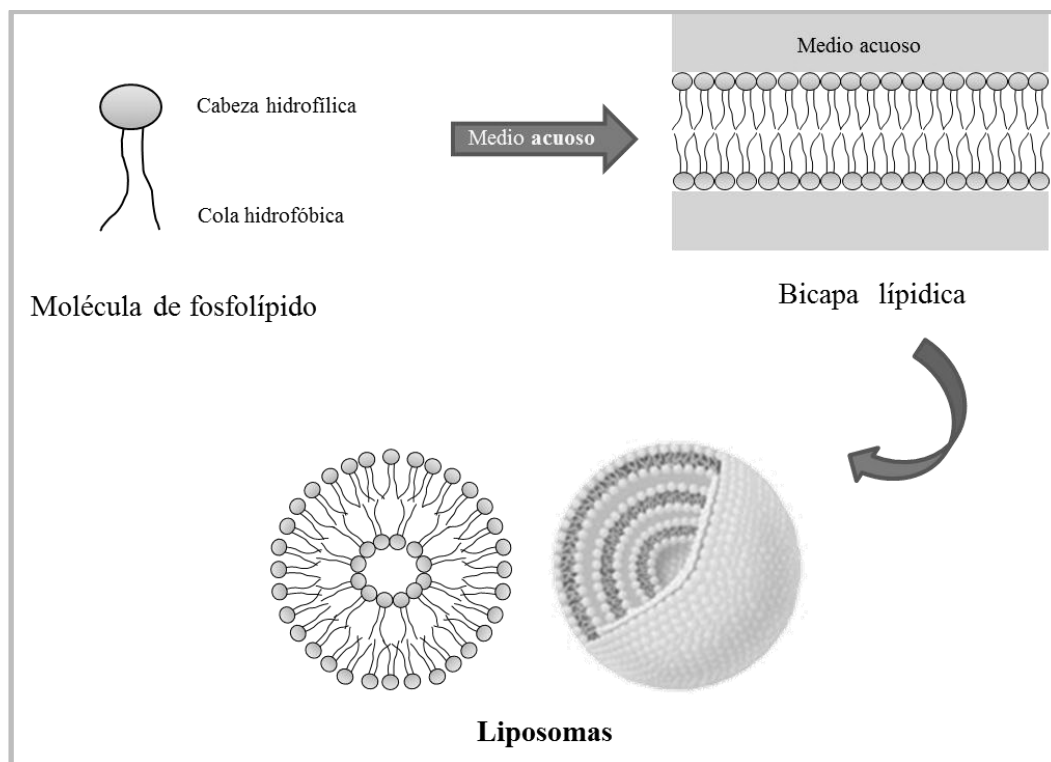


Figura 7. Estructura de los liposomas

Los fosfolípidos naturales o sintéticos son las moléculas más usadas para la preparación de los liposomas, sin embargo pueden ser adicionados algunos aditivos para mejorar sus características. Los fosfolípidos naturales como la lecitina (fosfatidilcolina) son utilizados con mayor frecuencia debido a que son el principal componente de las membranas biológicas.

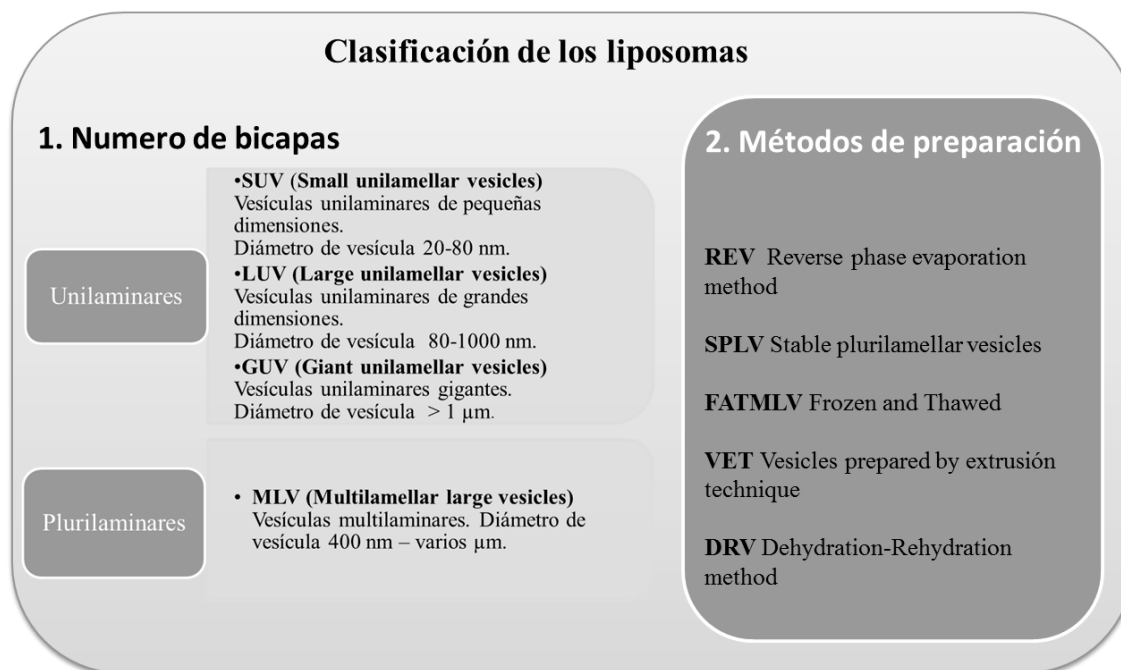
Por otra parte, con la incorporación de otras moléculas se modifican las características de las bicapas, por ejemplo: el colesterol es adicionado para reducir la permeabilidad de la membrana cuando se encapsulan moléculas hidrosolubles, debido a que incrementa la rigidez de las vesículas y mejora la estabilidad en presencia de fluidos biológicos como la sangre [39].

Las características de los liposomas varían en general en función de los lípidos utilizados en la composición empleada para su obtención sin embargo, algunas características como el tamaño y la morfología pueden ser controlados mediante el método de preparación.

De forma general los liposomas se obtienen formando una película lipídica la cual se resuspende en un sistema acuoso determinado, formando vesículas multilamelares (MLV), a partir de este tipo de liposomas se pueden obtener diferentes estructuras vesiculares por medio de un proceso de extrusión o sonicación. Es mediante estos procesos que se pueden obtener vesículas más pequeñas formadas de una sola bicapa, que generalmente se encuentran en un rango de 20 a 400 nm de diámetro.

Los liposomas se pueden clasificar en función de su tamaño y lamelalidad, o bien en función del método de preparación. En la tabla 1 se incluye la clasificación de los liposomas atendiendo al número de bicapas y a los métodos de preparación.

Tabla 1. Clasificación de los liposomas en función de su tamaño y lamelaridad y en función del método de preparación.



Pese a las diferencias morfológicas y características fisicoquímicas de estos diversos tipos de liposomas, se pueden clasificar en conjunto como liposomas tradicionales.

Haciendo un resumen sobre los resultados obtenidos con liposomas para la administración tópica de fármacos se debe destacar el estudio de [37], en el cual se observó el incremento de hasta cinco veces la cantidad de triamcinolona acetónido retenida en la epidermis y dermis, con bajos niveles del fármaco a nivel sistémico en comparación con formulaciones convencionales. Diferentes estudios de los mismos autores mostraron resultados similares con econazol y progesterona [40].

Posteriores investigaciones, realizadas con corticosteroides [41] y antibióticos y antiinflamatorios [42,43] pusieron en evidencia que los liposomas convencionales sólo incrementan la deposición del fármaco en la piel.

La composición lipídica de las vesículas, el método de preparación y el estado de las bicapas de los liposomas, son los principales factores que se describen que afectan la deposición de los liposomas[44,45].

Después de una extensa investigación sobre su efectividad como sistemas para administración tópica de fármacos, se ha establecido que la mayoría de este tipo de liposomas actúa principalmente a nivel dérmico, debido a que no tienen la capacidad de penetrar en las capas más profundas de la piel [1]. Sin embargo, diversos resultados experimentales muestran su efectividad para la administración transdérmica, aumentando la polémica sobre el uso de estos sistemas [46,47].

1.5.1 Desarrollo de sistemas vesiculares para la administración tópica de fármacos

Posterior al desarrollo de los liposomas convencionales como sistemas de administración tópica de fármacos, éstos se fueron modificando dando lugar a nuevas estructuras que en combinación con diferentes sustancias darían lugar a diferentes tipos de liposomas. En la Figura 8 se representan de forma cronológica el desarrollo de los sistemas más destacados, los cuales se describen a continuación:

- **Niosomas**

Formulados por primera vez por L'Oreal en 1970 [48], son vesículas combinadas con surfactantes no iónicos. En comparación con los liposomas convencionales, presentan mayor estabilidad química y menores costes. Estos sistemas incrementan el tiempo del fármaco en la epidermis reduciendo la absorción sistémica, por lo que están enfocados para en tratamiento de enfermedades dermatológicas [49,50].

- **Vesículas elásticas**

La primera generación de estas vesículas fue introducida por Cevc and Blume [51], y registraron éstos sistemas con el nombre de Transfersomes[®]. Estos sistemas están formados por vesículas de fosfolípidos y un activador de membrana *edge activator* que

les confiere la elasticidad. Los activadores de membrana son tensioactivos de cadena simple, que incluyen el Span 60, Span 80, Tween 20, Tween 80, entre otros.

Diversos estudios han puesto de manifiesto que éstas vesículas son capaces de permear cantidades terapéuticas de fármacos con la eficiencia comparable a la de una inyección subcutánea en fármacos como lidocaína, insulina y diclofenaco [52–54].

Posteriormente, surgió la segunda generación de vesículas elásticas que fue desarrollada por van den Bergh en 1999 [55]. Estas vesículas incluyen en su composición surfactantes no iónicos y se ha demostrado su mayor eficacia frente a los liposomas convencionales [56,57].

- **Etosomas**

Estos sistemas de liposomas fueron desarrollados en 1997 por Touitou y colaboradores [58]. Son sistemas formados por fosfolípidos, etanol y agua [59], que han mostrado una mejor liberación de fármacos como la testosterona y eritromicina. Su efectividad se ha conseguido en diferentes condiciones, bajo oclusión [60] y en condiciones de no oclusión [61].

- **Invasomas**

Fueron desarrollados por Fahren el 2002 [62], sin embargo no fue hasta el 2008 cuando se publicó un estudio integral de estos sistemas [63]. Están compuestos por vesículas de fosfatidilcolina, etanol y una mezcla de terpenos como potenciadores de la permeación. Debido a que su desarrollo tiene relativamente corto tiempo, su efectividad continúa siendo investigada [64,65].

- **Liposomas que promueven la formación de multi o bicapas lipídicas planas**

Frente a estas estrategias que combinan características de las vesículas directamente relacionadas con su composición, ha surgido un nuevo desarrollo de liposomas que combina vesículas de fosfolípidos con la incorporación extemporánea de promotores de la permeación. Estos sistemas de liposomas tienen la particularidad de formar capas

lipídicas planas, lo cual puede estar relacionado con el incremento de la permeación del fármaco[66].

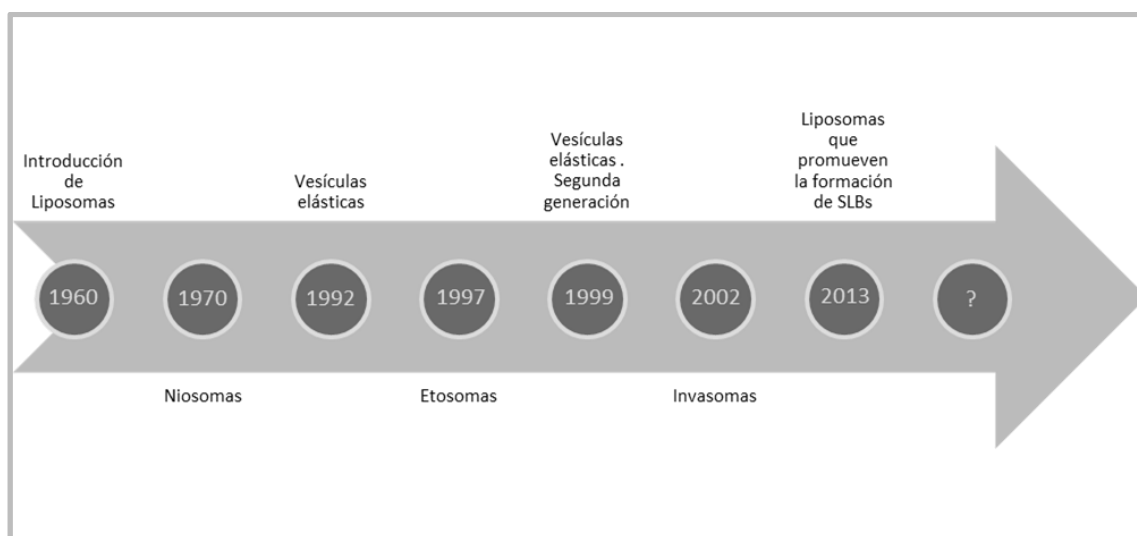


Figura 8. Representación cronológica del desarrollo de sistemas vesiculares para aplicación tópica de fármacos

- **Nuevas aplicaciones basadas en vesículas de fosfolípidos**

Recientemente, se han desarrollado liposomas como modelos para la predicción de permeación de fármacos a través de la piel, estos sistemas imitan la barrera del estrato córneo y han surgido debido a la dificultad de obtener tejido humano para evaluar la eficacia de las nuevas formulaciones desarrolladas para aplicación tópica.

Las vesículas fueron desarrollados inicialmente para emular el epitelio intestinal y hacer más eficiente el cribado de un gran número de fármacos [67,68]. Sin embargo, actualmente este modelo de permeabilidad sirve como herramienta para predecir la permeación transdérmica tanto en pieles enfermas como sanas, y es conocido como *PVPA Phospholipid Vesicle-based Permeation Assay*.

Han sido utilizados para evaluar la capacidad de permeación de nuevas moléculas, así como en diversas formulaciones [69,70] y en combinación con un sistema automatizado que permite el cribado de moléculas [71].

Actualmente la investigación de sistemas vesiculares más eficaces para la administración transdérmica de fármacos continúa siendo explorada, basta con realizar una búsqueda de las más recientes publicaciones científicas para obtener un panorama de los últimos avances en el desarrollo de estos sistemas.

1.5.2 Mecanismos de acción de los liposomas para administración tópica

De forma paralela a la intensa investigación sobre estos sistemas vesiculares, se ha investigado el mecanismo de acción mediante el cual los liposomas brindan una alta eficacia en la administración dérmica y transdérmica de fármacos. En la figura 9 se muestra un resumen de las principales investigaciones realizadas, donde se puede observar una discrepancia importante en cuanto a los resultados, los cuales en combinación con cada uno de los sistemas descritos con anterioridad, hacen aún más compleja la comprensión del mecanismo de acción.

De hecho, los mecanismos de liberación, adsorción y permeación a través de la compleja estructura que forma la piel nunca se han aclarado lo suficiente para explicar tanto sus beneficios a nivel local como sistémicos [1,22,72–74].

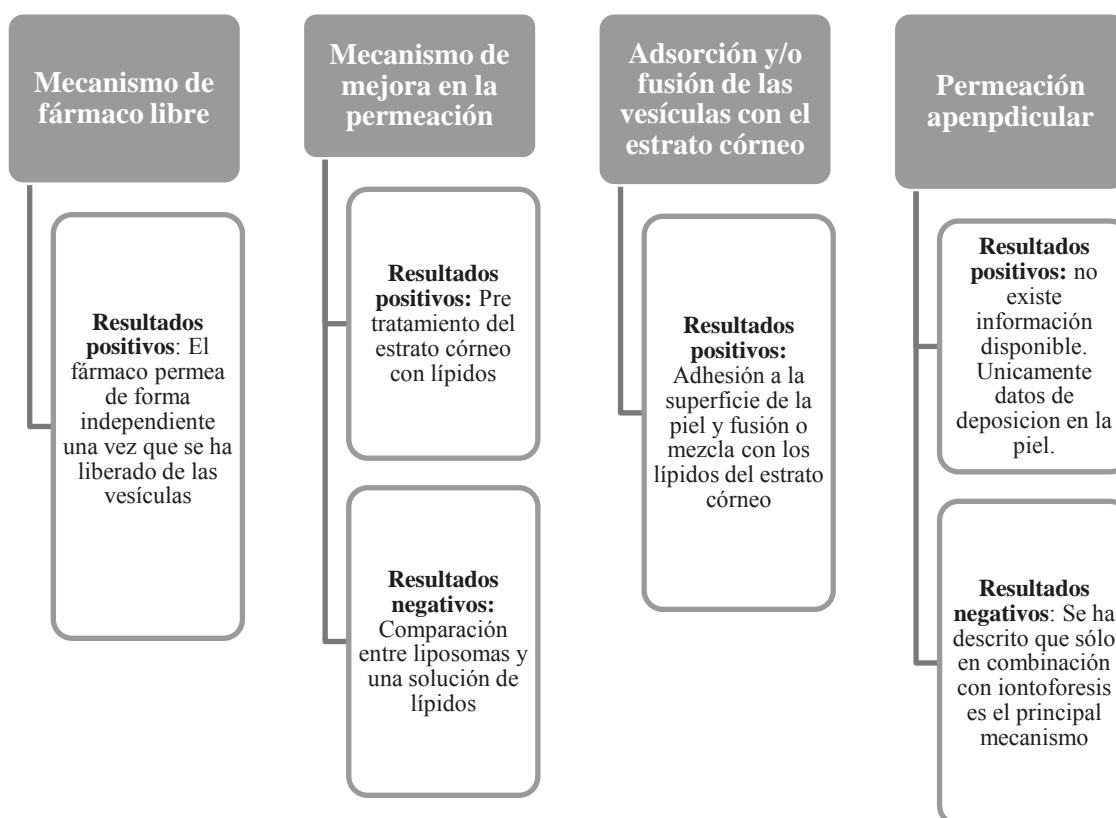


Figura 9. Principales mecanismos de acción descritos de los liposomas para la aplicación tópica de fármacos.

A partir de los diferentes mecanismos de permeación de los liposomas, se pueden agrupar en cuatro categorías. En la figura 10, se muestra una representación de los posibles mecanismos de acción de los liposomas como sistemas de administración tópica.

a) Mecanismo de fármaco libre

De acuerdo con este proceso el fármaco permea de forma independiente una vez que se libera de las vesículas [75]. De esta forma las vesículas se consideran solamente como vehículo que pueden ofrecer una liberación controlada del fármaco.

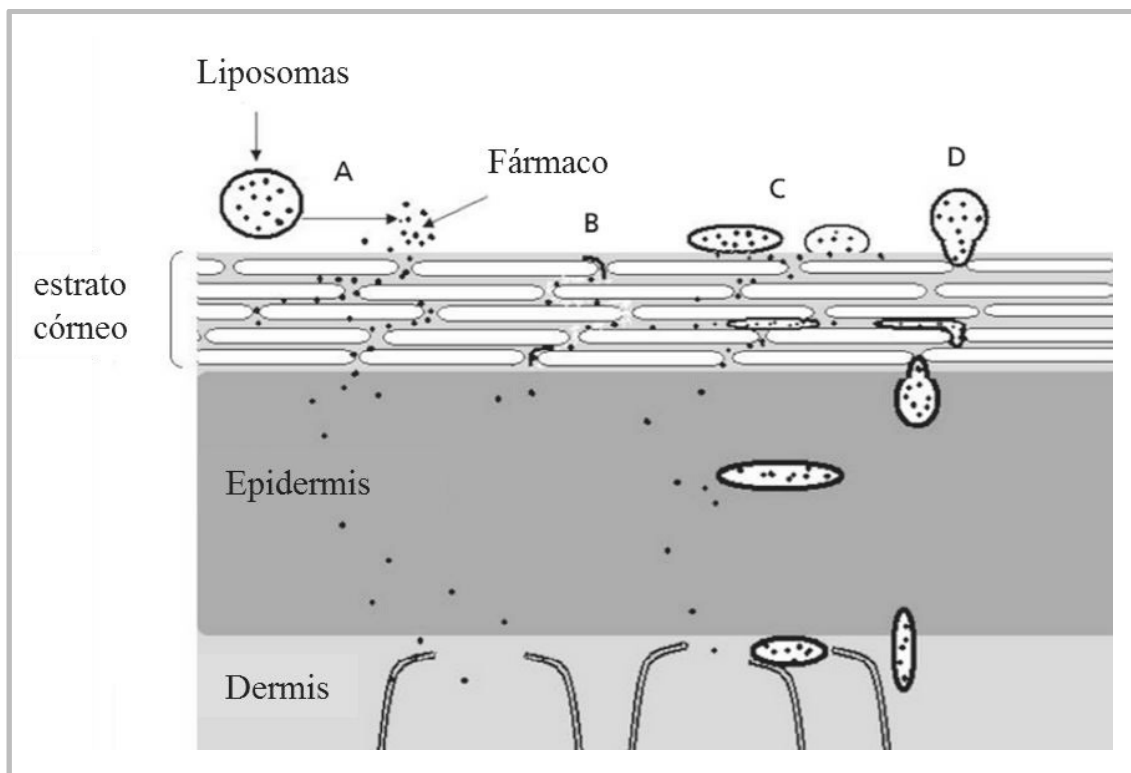


Figura 10. Posibles mecanismos de acción de los liposomas como sistemas de administración tópica de fármacos [45]. Mecanismo de fármaco libre (A), mecanismo de mejora en la permeación (B), mecanismo de adsorción y/o fusión de las vesículas con el estrato córneo (C), mecanismo de permeación apéndice (D).

b) Mecanismo de mejora en la permeación

El primer registro que describe este mecanismo concluye que la lecitina de huevo utilizada para la formación de las vesículas disminuye el efecto de barrera de la piel [76]. Posteriormente, se estableció que los lípidos del estrato córneo pueden solubilizarse debido a la formación de micelas inversas con los fosfolípidos de las vesículas [77]. Diversos autores han descrito resultados a favor de este mecanismo [78,79]; sin embargo, otros autores han establecido resultados contrarios a los anteriores [80].

c) Adsorción y/o fusión de las vesículas con el estrato córneo

Este mecanismo ha establecido la importancia que tiene la interacción de las vesículas con el estrato córneo. Se ha sugerido que primero existe un proceso de adhesión en la

superficie de la piel y posteriormente una posible fusión con la matriz lipídica del estrato córneo [81].

d) Permeación apendicular

Esta ruta de permeación de fármacos, se ha considerado en general para las formulaciones de aplicación tópica. En el caso de los liposomas específicamente de los Transfersomers[®], al obtenerse una disminución en su efectividad en condiciones de oclusión, se estableció que al favorecerse las condiciones de hidratación, los corneocitos podrían hincharse y cerrar los espacios extracelulares, los cuales serían la principal ruta de los liposomas y por ende la permeación apendicular sería el principal mecanismo para la liberación de fármacos en la piel. Esta hipótesis trató de comprobarse estudiando la liberación de insulina por vía tópica, utilizando modelos *in vivo* con animales que tienen diferentes densidades de folículos pilosos, y los estudios realizados indicaron que no existen diferencias significativas utilizando el mismo tipo de liposomas elásticos [82]. Otros autores han demostrado la eficacia de este mecanismo sólo cuando se combina con iontoforesis [83].

Existen múltiples factores tanto en el desarrollo de estos sistemas vesiculares, así como en las metodologías empleadas para describir los mecanismos de acción, por lo que no es posible describir un mecanismo general de estos sistemas; por ejemplo, la composición de las vesículas estaría influyendo directamente en el mecanismo de acción.

Por esta razón, es conveniente que la investigación sobre este aspecto siga ofreciendo nuevos conocimientos para establecer los procesos que ocurren durante la etapa de liberación, en el mecanismo de acción de los liposomas.

1.6 Fármacos vehiculizados en liposomas para administración tópica

Como se ha descrito en las secciones anteriores, existen diversos fármacos que presentan características fisicoquímicas que los hacen viables para ser administrados por vía tópica. Por otra parte, existen algunos fármacos que de acuerdo con su objetivo diana son considerados óptimos para ser formulados en liposomas, ejemplos de este grupo de fármacos lo constituyen los antiinflamatorios y los fármacos enfocados al tratamiento de las quemaduras y cicatrización de heridas.

1.6.1 Fármacos Antiinflamatorios

En la década de los sesenta, se introdujeron una nueva familia de medicamentos a los que se nombró antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), con el objetivo de ser más eficaces como analgésicos y antiinflamatorios que los fármacos utilizados hasta ese momento.

Actualmente, los AINEs son el grupo de medicamentos más utilizado a nivel mundial para el tratamiento de diversas patologías.

Los fármacos antiinflamatorios, analgésicos y antipiréticos de esta categoría incluyen muchos compuestos que en general no tienen relación química entre ellos, aunque la mayoría son ácidos orgánicos.

Mecanismo de acción de los AINEs

Los AINEs inhiben la actividad de la enzima ciclooxigenasa (COX) resultando en la disminución de la formación de prostaglandinas y tromboxanos a partir del ácido araquidónico. La disminución en la síntesis de prostaglandinas y su importancia en la producción del dolor, inflamación, fiebre y su actividad en diferentes tejidos es la responsable de la mayoría de los efectos terapéuticos y adversos de los AINEs.

Mientras que la COX-1 tiene características de enzima constitutiva y su actividad tiene que ver con la participación en el control de funciones fisiológicas, la COX-2 tiene características de enzima inducible en determinadas células bajo circunstancias

patológicas por el concurso de citoquinas y mediadores de la inflamación COX-2, las cuales se encuentran mayormente en tejido dañado o inflamado.

Los AINEs tradicionales inhiben de manera no selectiva la actividad enzimática de COX-1 y COX-2, lo cual trae como consecuencia efectos secundarios a nivel gastrointestinal, renal y de coagulación.

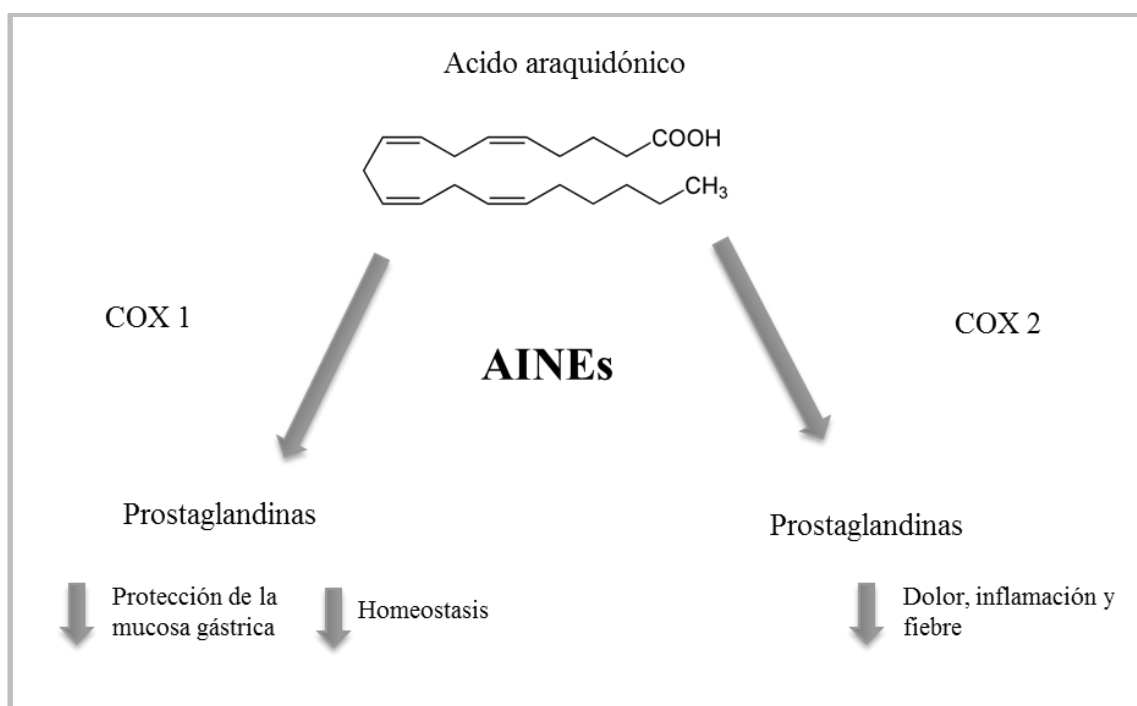


Figura 11. Mecanismo de acción de los AINEs. Modificado de [84]

Los efectos secundarios producidos por los AINEs y específicamente la posible toxicidad renal quedan casi eliminados con la utilización de estos fármacos por vía tópica.

En este sentido, los sistemas de liberación transdérmica al ofrecer una liberación sostenida permiten su uso para actuar a nivel local o sistémico y ofrecen una alternativa a la administración oral para poder reducir sus efectos adversos.

Entre algunas de las indicaciones de los AINEs tópicos figura el tratamiento del dolor e inflamación asociado a procesos músculoesqueléticos, se utilizan frecuentemente para tratamientos de tendinitis, bursitis y osteoartritis de las articulaciones superficiales.

Se ha reportado que la mayoría de las moléculas de AINEs se difunden a través del estrato córneo y en capas más profundas, a través de las vías hidrofóbicas de la matriz lipídica intercelular de la piel [85]. Por una parte el adecuado coeficiente de partición agua-lípido [86] y por otra, el reducido tamaño de esta clase de fármacos, benefician el proceso [87].

Se ha observado también, que la cantidad y composición de los lípidos presentes en la piel juegan un papel importante para la difusión de los AINEs a través del estrato córneo, por lo cual es importante el sitio de aplicación para su absorción es importante [88].

En una formulación convencional como un gel o un parche cutáneo, los AINEs se distribuyen rápidamente en el órgano llegando a los vasos sanguíneos y al tejido circundante. Posteriormente, la mayoría de moléculas de fármaco libre son removidas de la superficie de la piel [89]. A continuación, el fármaco alcanza solamente una profundidad de pocos milímetros [90]. Este proceso ha sido observado en diversas moléculas de AINEs [91,92].

Para hacer frente a este problema, el fármaco puede vehiculizarse en sistemas adecuados, que en principio permitan que no permee fácil y rápidamente a través de la piel y los vasos sanguíneos cutáneos. En segundo lugar, el vehículo debe retener el fármaco el tiempo suficiente.

Dentro de los fármacos antiinflamatorios más estudiados vehiculizados en sistemas vesiculares se encuentran el diclofenaco dietilamonio [93], ketoprofeno [94], diclofenaco de sodio [95], nimesulida [96] y el ibuprofeno.

1.6.1.1 Ibuprofeno

Fue descubierto en 1961 y está indicado como anestésico, antipirético y antiinflamatorio. Actualmente es uno de los antiinflamatorios más utilizados a nivel mundial [97].

La administración de ibuprofeno por vía tópica está enfocada para el tratamiento en dolor músculo esquelético leve, sobre todo en pacientes geriátricos para reducir los efectos adversos en el tracto gastro intestinal.

Actualmente continúa siendo objeto de diversos desarrollos farmacéuticos en forma de apósitos [98–100] y en diversas formulaciones basadas en la nanotecnología [101,102].

Además de sus cualidades terapéuticas el ibuprofeno presenta características fisicoquímicas (ver figura 11) que lo hacen un excelente candidato para ser vehiculado mediante liposomas.

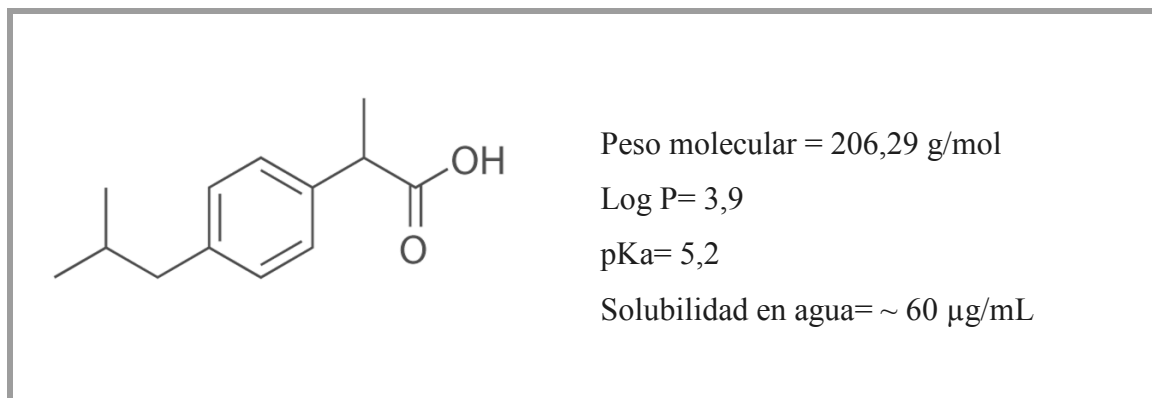


Figura 11. Estructura química del ibuprofeno y sus principales propiedades fisicoquímicas

1.6.2 Fármacos cicatrizantes y para el tratamiento de quemaduras

Otro de los grupos de moléculas idóneas para la administración tópica, son los fármacos indicados para el tratamiento de enfermedades o lesiones a nivel dérmico, en este sentido el tratamiento de quemaduras y cicatrizaciones constituye un área de desarrollo farmacéutico importante.

La pérdida de la integridad de la piel como resultado de una lesión o enfermedad puede conducir a una discapacidad grave o incluso la muerte, según su extensión o complicaciones agregadas no controladas. Es por ello que el conocimiento de los procesos fisiológicos de la cicatrización favorece el desarrollo de formulaciones farmacéuticas para su tratamiento.

La cicatrización es un proceso bioquímico que ocurre en respuesta a las lesiones tisulares y tiene como objetivo su regeneración. La Figura 12, muestra un diagrama con las fases secuenciales de la cicatrización.

El proceso normal de cicatrización de heridas puede ser dividido en 4 fases superpuestas: coagulación, inflamación, formación de tejido de granulación (fase proliferativa), y la remodelación o formación de cicatriz. Durante la fase de coagulación, se proporciona una protección provisional a la zona de la herida con la coagulación para prevenir el sangrado excesivo. En la fase inflamatoria intervienen leucocitos, neutrófilos y macrófagos; también tiene lugar la producción de factores de crecimiento y la activación de las células dérmicas y epidérmicas. La finalización de la fase proliferativa de la cicatrización de heridas conduce a la formación de la matriz extracelular, y tejido de granulación vascularizado. Finalmente, la remodelación de la matriz extra celular y la apoptosis conducen a la formación de la cicatriz y un tejido con propiedades físicas que son comparables con la piel no herida [103].

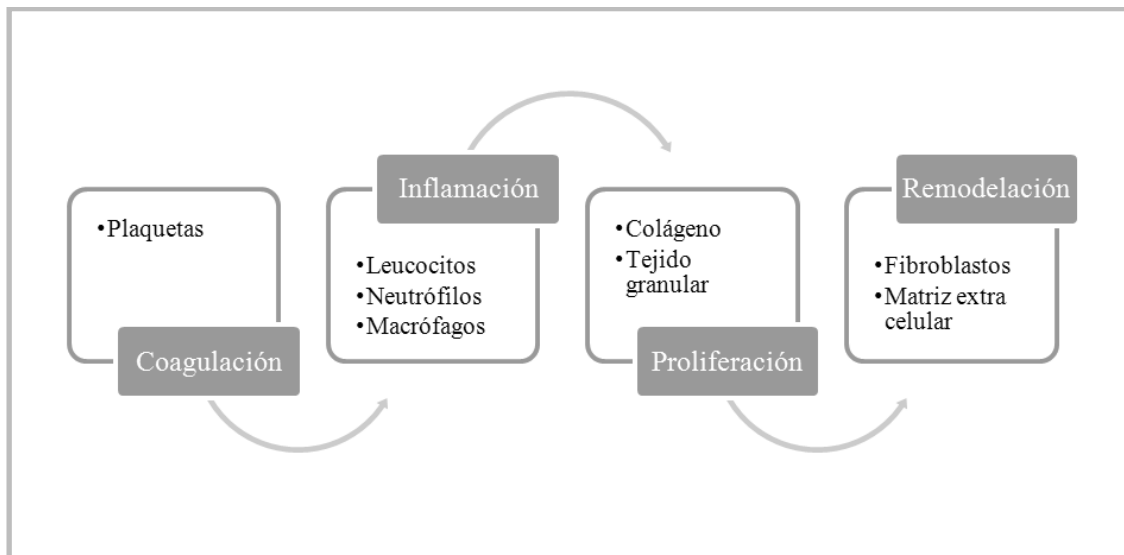


Figura 12. Fases y células que intervienen en el proceso de cicatrización.

La síntesis y degradación de la matriz extracelular son componentes fundamentales en las lesiones tisulares y su reparación. El ácido hialurónico (AH), parece tener funciones primordiales en este proceso biológico. Posterior a una lesión, los fragmentos de AH se acumulan, la eliminación de estos fragmentos requiere de un receptor expresado en las células del tejido hematopoyético. El fracaso de esta eliminación resulta en una incesante inflamación. Los productos de la degradación del AH pueden estimular las células inflamatorias para modular y resolver las lesiones en los tejidos [104].

La matriz extracelular en las primeras etapas de cicatrización de heridas es rica en HA. En el adulto los niveles alcanzan rápidamente un máximo y luego disminuyen, lo cual puede estar relacionado con la formación de cicatrices, ya que en estudios realizados con modelos experimentales de fetos de oveja y conejo, se observa que la reparación de heridas está asociada con el mantenimiento de los niveles elevados de HA [105].

El HA tiene un papel muy importante en el metabolismo de la piel, debido a que es uno de los principales constituyentes de la matriz extracelular y es indispensable para la infraestructura de la célula [106]. El AH posee una gran capacidad de retención de agua, por lo tanto es responsable de la hidratación de la piel y aumenta su contenido de humedad [107]. Es debido a estas características que se ha utilizado para coadyuvar al tratamiento de quemaduras.

Actualmente el AH es protagonista en el área cosmética inyectado como relleno dérmico en cirugías debido al papel clave que tiene en el envejecimiento. Se ha utilizado desde hace varios años para ayudar a recuperar la elasticidad, turgencia y la humedad de la piel [108].

Los niveles de AH son altos en la circulación fetal y disminuyen después del nacimiento, estos niveles se mantienen constantes durante algunas décadas y comienzan a aumentar de nuevo en edad avanzada [109,110]. La reaparición de las altas concentraciones en el flujo sanguíneo podría ser uno de los mecanismos del deterioro del sistema inmune [111].

Sin embargo en cuanto a los procesos de envejecimiento el contenido de AH a nivel dérmico disminuye de forma progresiva [107]. En las mujeres éstas concentraciones se mantienen constantes (0,03 %) hasta los 47 años aproximadamente [112].

Simultáneamente durante el envejecimiento se reduce la proliferación de fibras de colágeno, lo que conlleva a cambios estructurales. Estos factores conducen a la deshidratación y pérdida de elasticidad.

La concentración de AH en la matriz extracelular puede variar ampliamente sin embargo, incluso cuando los niveles han disminuido, una de sus funciones es actuar como una estructura sobre la que otras macromoléculas de la matriz extracelular se orientan.

Se ha descrito que el AH estimula la proliferación de fibroblastos [113], lo que favorece la etapa final del proceso de cicatrización.

1.6.2.1 Ácido hialurónico

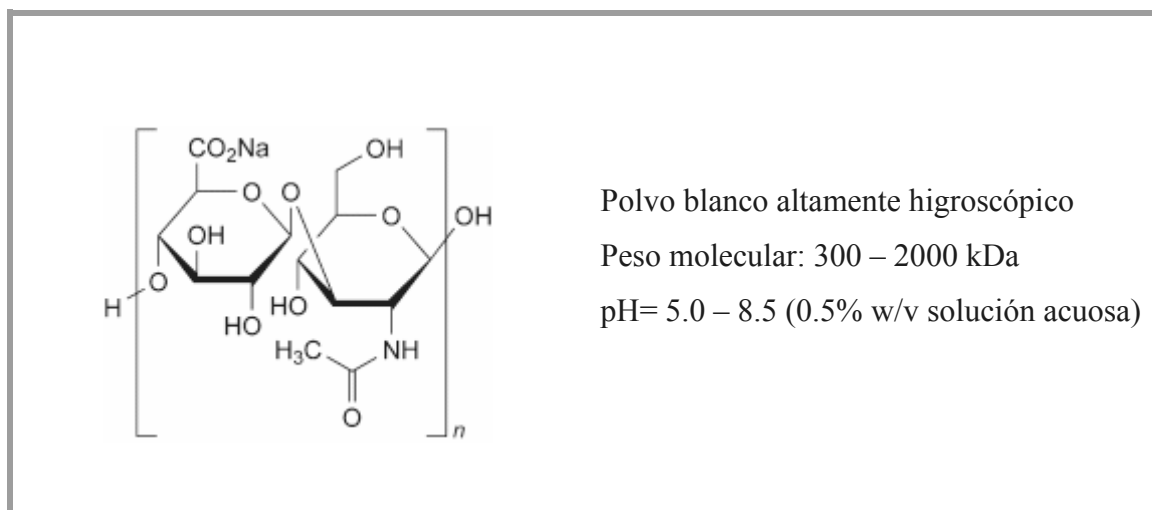
Es un polisacárido presente en el cuerpo humano en los tejidos epitelial, conectivo y nervioso [114]. Se descubrió por primera vez en el humor acuoso y posteriormente fue sintetizado en laboratorio [115].

El ácido hialurónico puede ser producido por diferentes procesos, los dos más comunes son la extracción a partir de crestas de gallo o bien mediante la fermentación de la bacteria *Streptococcus* [116]. En la Figura 13, se representa la estructura química del ácido hialurónico y sus principales propiedades fisicoquímicas.

El uso terapéutico del ácido hialurónico se inicia en los años sesenta cuando fue empleado para el tratamiento de quemaduras, desde entonces se utiliza prácticamente en todos los campos de la medicina. Sus aplicaciones clínicas más conocidas son los tratamientos basados en ingeniería de tejidos, en particular la cicatrización de heridas [117]. La matriz viscoelástica del ácido hialurónico puede actuar como material de soporte altamente biocompatible y por lo tanto se usa comúnmente para la cicatrización de heridas de cirugía [118]. Además, la administración de HA de alto peso molecular purificado en articulaciones pueden restaurar las propiedades reológicas deseables y aliviar algunos síntomas de la osteoartritis [119].

El AH es utilizado también en el tratamiento de úlceras crónicas de heridas de diversas etiologías, quemaduras y heridas quirúrgicas epiteliales, sin importar la forma farmacéutica en la cual esté incorporado [114].

El ácido hialurónico es una macromolécula altamente higroscópica, compuesta por unidades repetidas de N-acetilglucosamina y ácido glucorónico unidos entre ellos por un enlace glucosídico [120]. El hialuronato de sodio es la forma química predominante de ácido hialurónico a pH fisiológico, ya que la forma ácida es inestable y por lo tanto no se suele usar.



Polvo blanco altamente higroscópico
 Peso molecular: 300 – 2000 kDa
 pH= 5.0 – 8.5 (0.5% w/v solución acuosa)

Figura 13. Estructura química del ácido hialurónico y algunas de sus propiedades fisicoquímicas.

La investigación y uso del ácido hialurónico como molécula activa en el tratamiento de diversas patologías a nivel dérmico es destacable, sin embargo dentro de la densa gama de aplicaciones nunca ha sido incorporado en sistemas vesiculares. Su uso en sistemas de liberación de fármacos ha sido como vehículo, aunque no se descarta su función coadyuvante.

Debido a ello, y a las aplicaciones que pueden ser susceptibles de ser favorecidas con ésta molécula derivó el interés para ser estudiado al incorporarse en liposomas.

1.7 Caracterización topográfica de los sistemas vesiculares para administración tópica de fármacos

Como se ha descrito anteriormente, los beneficios que aporta la administración de fármacos por vía tópica son diversos, debido a ello existe un notorio interés en la investigación sobre el desarrollo de éste tipo de formulaciones y sobre el mecanismo mediante el cual los sistemas vesiculares incrementan notoriamente la eficacia respecto a otras formulaciones tópicas. No obstante a que hoy en día son pocas las formulaciones disponibles en el mercado, existe una intensa investigación sobre estos sistemas que incluyen a diversas moléculas y patologías.

Debido a lo anteriormente expuesto y a la incorporación de nuevas tecnologías en el campo de la investigación de estos sistemas para el desarrollo farmacéutico, resultan relevantes las aportaciones que se continúen realizando en esta área.

La mayor parte de los recientes avances sobre el conocimiento de la administración tópica han sido resultado del uso de técnicas biofísicas, las cuales son cada vez más sensibles y sofisticadas [4]. Desde hace varias décadas se han considerado algunas de ellas, entre las que destacan la espectroscopia infrarrojo [121], resonancia magnética nuclear [122] y la microscopía electrónica de transmisión [123].

Una de las técnicas exploradas en años recientes ha sido la microscopía de fuerza atómica, debido a las ventajas que ofrece al preservar las muestras en su estado original y poder trabajar en diversas condiciones ambientales [124].

Esta técnica ha sido utilizada para caracterizar sistemas de liberación de fármacos nano estructurados [125,126] y para observar células y tejidos complejos como la piel [127,128].

En el desarrollo de esta investigación hemos utilizado ésta técnica para observar las estructuras que forman las formulaciones desarrolladas cuando son aplicadas sobre la piel humana. Debido a que no existe ningún trabajo previo de referencia que aborde este concepto, es importante incluir los principios de esta técnica y cómo los resultados obtenidos en este estudio pueden ayudar a elucidar diferentes aspectos relevantes sobre

el mecanismo de acción de los liposomas para mejorar su aplicación tópica y su efectividad.

1.7.1 Microscopio de fuerza atómica

Pertenece al grupo de microscopios de fuerza de barrido, los cuales son un amplio grupo de microscopios que funcionan a través de una sonda que escanea las muestras línea a línea. El microscopio de fuerza atómica (AFM) fue desarrollado en la segunda década de los ochentas [129]. En el caso del AFM, la sonda es una punta afilada unida a un soporte sensible, que está unida a un piezoeléctrico que asegura el posicionamiento tridimensional con alta precisión. Posee una resolución lateral en el rango nanométrico, mientras que su resolución vertical es inferior al angstroms. En la figura 14 se muestran en esquema los elementos principales del AFM.

Al acercarse la punta a la muestra y antes del contacto físico, el soporte se desvía por la aparición de fuerzas de corto alcance que actúan entre ambas superficies. Estas fuerzas pueden ser atractivas o repulsivas dependiendo de la naturaleza de la interacción por ejemplo, fuerzas químicas, fuerzas de van der Waals, fuerzas electrostáticas, fuerzas de fricción [130] y permiten con el uso de un sistema de retroalimentación mantener la sonda a una fuerza constante de la muestra, mientras se escanea la superficie.

En el AFM, los sistemas de retroalimentación más utilizados consisten en enfocar una luz láser en el lado posterior del soporte y en la dirección del haz reflejado por medio de un sensor de posición, que es generalmente un fotodiodo. La posición se envía a la interfaz electrónica que, a su vez controla la distancia punta-muestra e informa al escáner piezoeléctrico para corregirlo o no. Por lo tanto, el movimiento de corrección correspondiente es lo que genera la imagen topográfica [131].

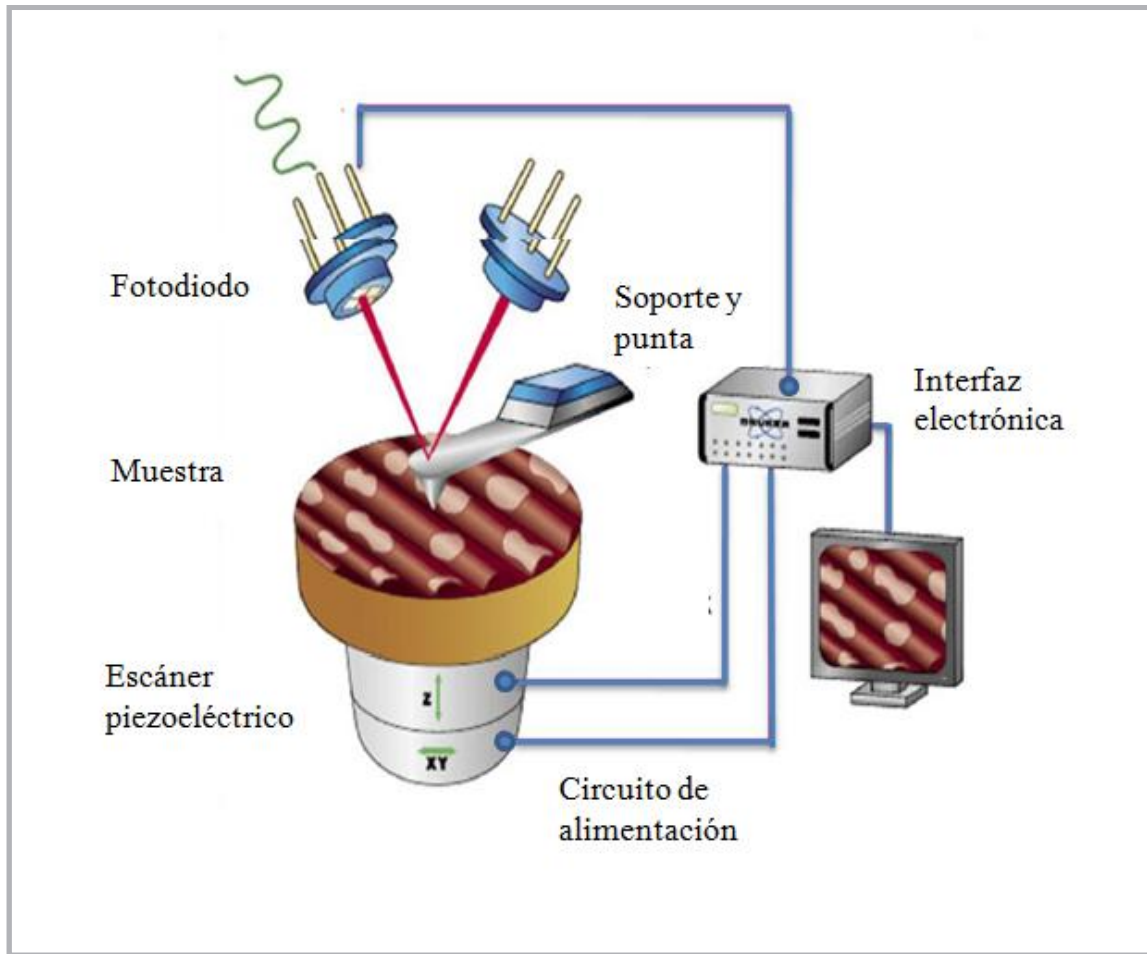


Figura 14. Representación esquemática de los elementos principales que forman el AFM. (Modificado de blog.brukerafimprobes.com)

La muestra se escanea línea por línea con el fin de obtener un registro topográfico de su superficie, a este modo de funcionamiento del AFM se le llama modo topográfico. Los modos topográficos más comunes, representados en la figura 15, son:

Modo de fuerza constante: La altura de la muestra se ajusta para mantener constante la deflexión del soporte, de esta forma se ejercerá una fuerza constante en la muestra.

Modo de contacto intermitente: Se conoce también como modo Tapping[®], la punta oscila cerca de su frecuencia de resonancia sobre la superficie y la realimentación controla la amplitud y la fase de oscilación, lo cual reduce la aparición de fuerzas laterales durante la obtención de la imagen debido al menor contacto punta-muestra.

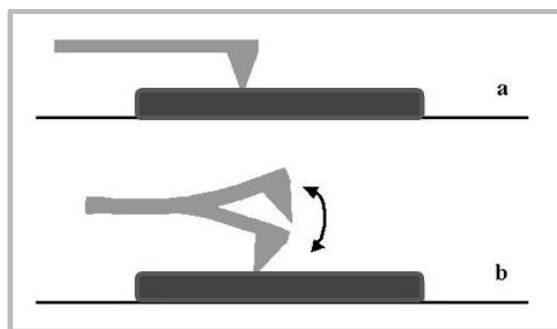


Figura 15. Modos de funcionamiento topográfico del AFM. Modo de fuerza constante (a), modo de contacto intermitente (b).

No obstante a las ventajas que ofrece el AFM para la caracterización a escala nanométrica, debido a su resolución y la preservación de muestras biológicas, esta técnica y sus aplicaciones se encuentran en constante evolución. Los actuales modos de funcionamiento incluyen el aumento de velocidad y el uso de las puntas para manipular la muestra [132].

Modo espectroscopia de fuerza

Otra aplicación relevante del AFM consiste en la caracterización nanomecánica de la muestra, para tal efecto se utiliza el modo de espectroscopia de fuerza (FS), éste modo de funcionamiento es útil para elucidar características intrínsecas de sistemas lipídicos [133]. A través de este modo de funcionamiento se obtienen curvas con patrones similares, los cuales se representan en la figura 16.

En la curva se representa la monitorización de la fuerza aplicada por la punta, en función de la separación con la muestra y la correspondiente deflexión de la palanca. Cada etapa de la curva proporciona información sobre las propiedades físicas y químicas de la muestra.

En la región de aproximación de la curva (a) se pueden caracterizar las propiedades de superficie, en función a las fuerzas que actúan entre la superficie de la punta y la muestra pudiéndose observar posibles repulsiones. Una vez la punta entra en contacto con la superficie de la muestra (b), la curva de aproximación varía en su pendiente (c), lo que permite determinar propiedades mecánicas de la muestra [134].

La curva de retorno no coincide con la curva de aproximación, es decir, la curva de fuerza total presenta histéresis (d), debida a las fuerzas de adhesión entre la punta y la muestra, que finaliza en una liberación de la punta (e) y un retorno de la curva a valores similares a los hallados en la etapa de aproximación.

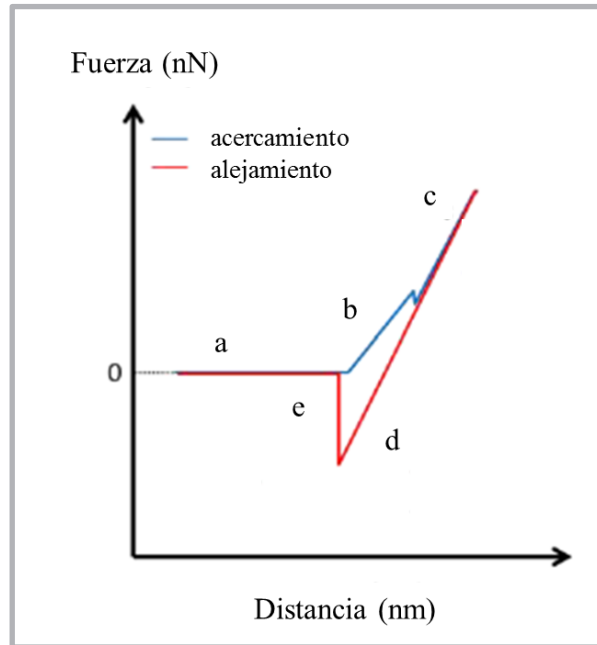


Figura 16. Esquema de una curva de fuerza mostrando las etapas en el proceso de acercamiento y alejamiento con la muestra

Para la interpretación de las curvas de fuerza, se debe tener en cuenta que la interacción entre punta y muestra es dependiente de la geometría de la punta, de la interacción química entre punta y muestra y de la naturaleza del medio. Por lo tanto, las medidas de fuerza realizadas por AFM no pueden ser directamente relacionadas con otras medidas de fuerza o termodinámicas realizadas mediante otras técnicas.

Capítulo 2.

Objetivos



Objetivos

El objetivo principal de esta tesis es desarrollar y caracterizar liposomas capaces de formar bicapas planas sobre la piel, para mejorar la permeación de los fármacos encapsulados en las vesículas y obtener información relevante relacionada con la liberación de éstos fármacos para desarrollar una formulación farmacéutica basada en los conocimientos adquiridos.

Los objetivos específicos son los siguientes:

- Desarrollar formulaciones basadas en liposomas como sistemas de administración tópica de fármacos para diferentes moléculas de interés farmacéutico, que en combinación con potenciadores de la permeación puedan desestabilizar la membrana lipídica de las vesículas y promover la formación de bicapas planas al ser aplicados sobre la piel.
- Caracterizar las propiedades fisicoquímicas de las formulaciones desarrolladas en términos de tamaño de partícula, polidispersidad, potencial zeta, eficiencia de encapsulación y estabilidad a diferentes temperaturas.
- Desarrollar una metodología para utilizar el microscopio de fuerza atómica como técnica de caracterización de la piel humana.
- Utilizar la técnica desarrollada de microscopía de fuerza atómica para observar la interacción de las formulaciones al ser aplicadas sobre diferentes sustratos, piel y celulosa.
- Validar las técnicas analíticas utilizadas para cuantificar las cantidades de fármaco permeado durante los ensayos de permeación utilizando la cromatografía líquida de alta eficacia.

- Determinar los modelos de liberación y los parámetros amodelísticos de los fármacos utilizados en los estudios de permeación, de las formulaciones desarrolladas.
- Determinar los parámetros biofarmacéuticos de las formulaciones desarrolladas a través de ensayos de permeación *ex vivo* utilizando las células de difusión de Franz.

Capítulo 3.

Resultados



Resultados

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta investigación han dado lugar a las siguientes publicaciones:

Improving *ex vivo* skin permeation of non-steroidal anti-inflammatory drugs: Enhancing extemporaneous transformation of liposomes into planar lipid bilayers. *Int. J. Pharm.*, 2014, vol. 461, p. 427-433.

Enhanced topical delivery of hyaluronic acid encapsulated in liposomes: a surface-dependent phenomenon. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2015, vol. 134, p.31-39.

Monolayer study of the main components of the *Stratum corneum* to develop liposomes for Transdermal Drug Delivery. Enviado a *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*.

Development of liposomes for Transdermal Drug Delivery mimicking *Stratum corneum* composition. Enviado a *International Journal of Pharmaceutics*.

3.1 Evaluación de la eficacia de los liposomas como sistemas de administración tópica de fármacos

Improving *ex vivo* skin permeation of non-steroidal anti-inflammatory drugs: Enhancing extemporaneous transformation of liposomes into planar lipid bilayers

Vázquez-González, Martha L., Bernad, Rafael, Calpena, Ana C., Domènech, Oscar, Montero, M. T., Hernández-Borrell, Jordi (2014)
International Journal of Pharmaceutics (461) 427-433

RESUMEN

La administración transdérmica de principios activos es un método versátil ampliamente utilizado en medicina. Sin embargo, la baja eficiencia lograda en la absorción de muchos fármacos es debida principalmente a la complejidad de la barrera de la piel, lo que representa una desventaja para la administración transdérmica.

Para mejorar la administración de fármacos a través de la piel, hemos preparado y caracterizado liposomas que contienen el AINE ibuprofeno y diseñamos formulaciones farmacéuticas basadas en la adición extemporánea de surfactantes potenciadores de la permeación (PEs). Posteriormente, se llevaron a cabo estudios de liberación y permeación del fármaco.

De acuerdo con los estudios de permeación, la formulación liposomal de ibuprofeno suplementado con PEs mostró efectos terapéuticos similares, pero a dosis más bajas (20%) comparada con una formulación comercial utilizada como referencia.

Se utilizó el microscopio de fuerza atómica (AFM), para investigar en las formulaciones liposomales el efecto causado por los PEs en el mecanismo de adsorción y fusión con la piel. En las imágenes obtenidas fueron observados liposomas no fusionados, bicapas de lípidos y estructuras múltiples.

La transformación de las vesículas en estructuras planas se propone como una posible razón para explicar las dosis más bajas requeridas cuando una formulación de liposomas se complementa con surfactantes como PEs.

Aspectos relevantes en este estudio

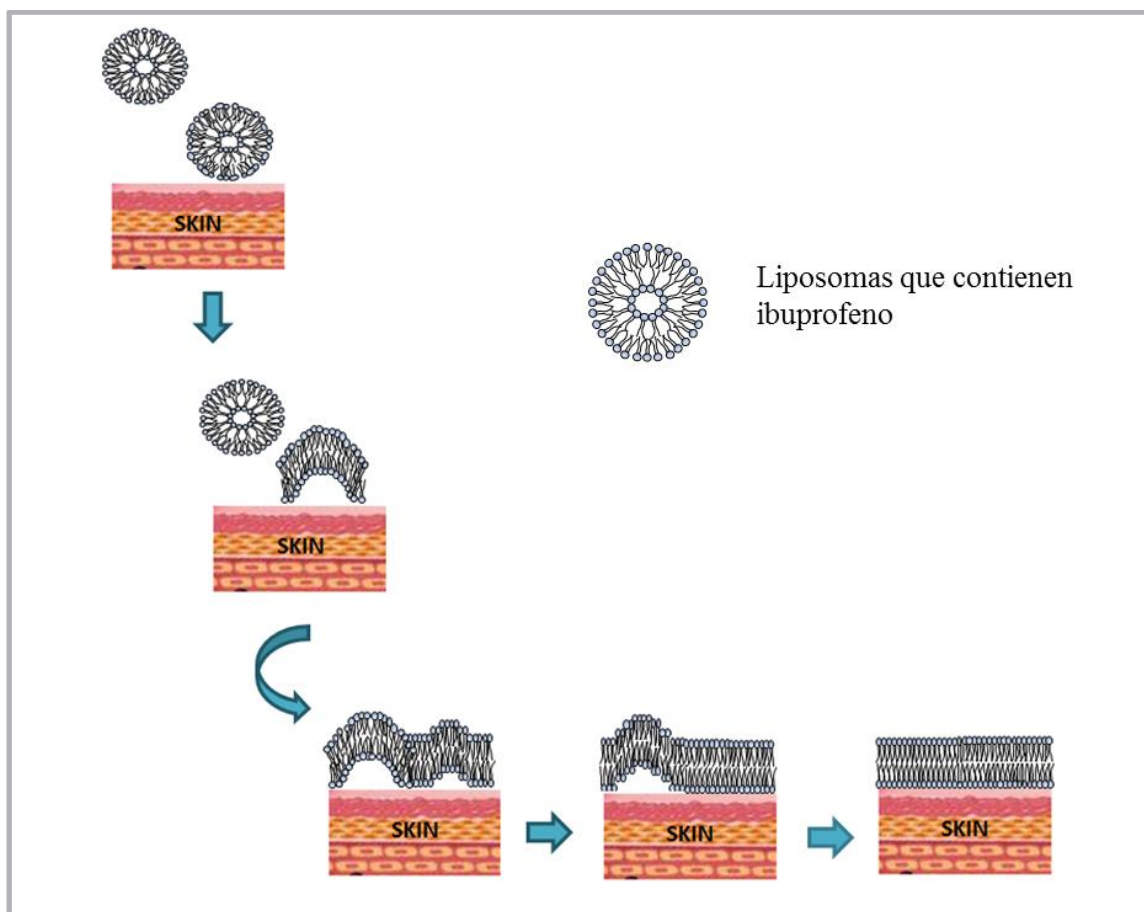
A través de la encapsulación de ibuprofeno en liposomas para aplicación tópica, se demuestran los siguientes aspectos:

- a) Los surfactantes incorporados como promotores (Tween[®] 65 y Tween[®] 80), aumentan la permeación transdérmica del ibuprofeno encapsulado.
- b) Los promotores promueven la transformación de los liposomas en estructuras planas.

- c) Mediante las imágenes obtenidas con el AFM, se observa que las formulaciones desarrolladas forman estructuras similares a bicapas lipídicas sobre la piel.

RESUMEN GRAFICO

Los liposomas que contienen ibuprofeno al aplicarse sobre piel humana forman estructuras planas.





Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Pharmaceutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpharm

Improving *ex vivo* skin permeation of non-steroidal anti-inflammatory drugs: Enhancing extemporaneous transformation of liposomes into planar lipid bilayers



Martha L. Vázquez-González^{a,d}, Rafael Bernad^d, Ana C. Calpena^{b,c}, Oscar Domènech^{a,c}, M.T. Montero^{a,c}, Jordi Hernández-Borrell^{a,c,*}

^a Departament de Físicoquímica, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII, 08028 Barcelona, Spain

^b Unitat de Farmàcia i Farmacocinètica, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII, 08028 Barcelona, Spain

^c Institut de Nanociència i Nanotecnologia (IN²UB), Av. Joan XXIII, 08028 Barcelona, Spain

^d Labiana Pharmaceuticals S.L.U., c/ Casanova 27-31, 08757 Corbera de Llobregat, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 October 2013

Received in revised form 6 December 2013

Accepted 9 December 2013

Available online 17 December 2013

Keywords:

Ibuprofen

AFM

Liposomes

Enhancers

Transdermal drug delivery

Chemical compounds studied in this article:

Ibuprofen (PubChem CID: 3672)

ABSTRACT

Transdermal delivery of active principles is a versatile method widely used in medicine. The main drawback for the transdermal route, however, is the low efficiency achieved in the absorption of many drugs, mostly due to the complexity of the skin barrier. To improve drug delivery through the skin, we prepared and characterized liposomes loaded with ibuprofen and designed pharmaceutical formulations based on the extemporaneous addition of penetration enhancer (PE) surfactants. Afterwards, permeation and release studies were carried out. According to the permeation studies, the ibuprofen liposomal formulation supplemented with PEs exhibited similar therapeutic effects, but at lower doses (20%) comparing with a commercial formulation used as a reference. Atomic force microscopy (AFM) was used to investigate the effect caused by PEs on the adsorption mechanism of liposomal formulations onto the skin. Non-fused liposomes, bilayers and multilayered lipid structures were observed. The transformation of vesicles into planar structures is proposed as a possible rationale for explaining the lower doses required when a liposome formulation is supplemented with surfactant PEs.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Since the introduction of liposomes back in the 1960s, an impressive amount of literature has been published showing the broad spectrum of applications of these colloidal systems. From suitable models for biomembranes to drug delivery systems, liposomes have been the subject of research, which now focuses on the fields of soft matter and nanomedicine (Caruthers et al., 2007; El Maghraby et al., 2008; Elsayed et al., 2007a; Hughes, 2005).

Liposomes encapsulate hydrophilic molecules in the aqueous internal space or lipophilic and amphiphilic molecules that become embedded in their concentric bilayers (Shivakumar and Narasimha, 2010). Although their application in therapy was earlier limited by their short time in circulation, the development of strategies aimed at avoiding the reticulum endothelial system has led to the

commercialization of several successful formulations (Beija et al., 2012; Song et al., 2012; Szelenyi, 2012). However, from the beginning, liposomes attracted attention as a drug delivery system that might overcome the skin barrier. Actually, the mechanisms of delivery, adsorption and permeation through the complex structure of this tissue have never been clarified enough to explain either beneficial local or systemic effects (Ciotti and Weiner, 2002; El Maghraby et al., 2008; Elsayed et al., 2007b; Niemiec et al., 1995; Touitou et al., 1994). Liposomes are self-assembled phospholipid structures whose formation is led by the hydrophobic effect (Israelachvili and Mitchell, 1975). Phospholipids, particularly phosphatidylcholines (PCs), the most common molecules used in liposome technology, are prone bilayer molecules that become multilamellar vesicles (MLVs) when dispersed in excess water. Several methods allow the size of the liposome population to be fitted (Lasch et al., 2003; Mui and Hope, 2007; Wiggenhorn, 2008) and their polydispersity and lamellarity to be controlled. Depending on these characteristics, single (SUVs), large (LUVs) (unilamellar) or oligolamellar phospholipid bilayers can be obtained (Gregoriadis and Florence, 1993).

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are widely used as analgesics and in the treatment of locomotor pathologies

* Corresponding author at: Departament de Físicoquímica, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII, 08028 Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 403 59 86; fax: +34 93 409 59 87.

E-mail address: Jordiborrell@ub.edu (J. Hernández-Borrell).

and local inflammation. NSAIDs inhibit the prostanoid-generating enzyme, cyclooxygenase-2, at the inflammation and pain focus. Unfortunately, most of them also inhibit gastric mucous cyclooxygenase-1, which causes gastric damage (Escribano et al., 2003). An alternative, in order to overcome the side-effects of NSAIDs, was the development of pharmaceutical formulations intended for topical application onto the specific area. Hence, transdermal drug delivery emerges as an alternative that has many advantages over other traditional routes of administration. Unfortunately, the nature of the skin represents an important drawback for the effective penetration of most drugs (Barry, 1983).

The concept of deformable liposomes was earlier introduced in 1992 (Cevc and Blume, 1992). This was the basis for the first generation of what were known as “elastic vesicles”, soon commercially available as Transfersomes[®] (Cevc et al., 1998), which are prepared by combining phospholipids with “edge activators”. An edge activator is often a single-chain surfactant, with a high radius of curvature, which destabilizes the lipid bilayers of the vesicles and increases their deformability. It has been reported that they can penetrate intact the skin *in vivo*, carrying therapeutic concentrations of drugs with similar efficiency to that achieved by subcutaneous administration when the elastic vesicles are applied in non-occlusive conditions (Cevc et al., 1998).

Despite their large average size, it has been suggested that deformable liposomes may be able to squeeze through the cell barrier imposed by the stratum corneum, whilst keeping their basic structure (Cevc et al., 1998, 2002). In addition, deformable liposomes have been reported to improve *in vitro* drug skin deposition (El Maghraby et al., 1999; Guo et al., 2000). Although a large number of transdermal studies have used liposomes that carry a variety of therapeutic agents, there is no experimental evidence explaining how the effect of the drugs encapsulated is achieved and related to the carrier structure (Bahia et al., 2010). Furthermore, it is intriguing that liposomes treated with surfactants may reach the bloodstream whilst keeping their structure. It is probable that the effect is attributable to the changes occurring in the formulation itself during its deposition onto the skin. Thus, in an apparently unrelated field of research, the development of in-plane bilayer systems, more recently named supported lipid bilayer systems (SLBs) (Sackmann, 1996; Tanaka and Sackmann, 2005), for interfacial studies and, in particular, for their observation by atomic force microscopy (AFM), introduces an intense debate on how liposomes turn into SLBs (Hain et al., 2013; Picas et al., 2012; Reviakine and Brisson, 2000). This phenomenon, mainly based on spreading the liposomes onto inorganic surfaces (*i.e.* mica), is far from simple and depends on multiple physicochemical properties, such as ionic strength, nature of the surface, phospholipid composition or curvature of the phospholipids and size of the liposomes. In this regard, it cannot be excluded that liposomes applied to the skin become, totally or partially, transformed into planar systems in analogy with the formation of SLBs when spreading liposomes onto surfaces.

In this study we prepared different formulations of elastic liposomes with the aim of enhancing skin delivery through the formation of planar lipid bilayers. These formulations are formed from LUVs loaded with ibuprofen and small amounts of various penetration enhancer (PE) (Williams and Barry, 2012) surfactants like Tween 65[®], Tween 80[®]. It is well documented that the incorporation of PEs into the formulations increases the permeation of different drugs (Patel et al., 2013; Shokri et al., 2001; Turi et al., 1979). When PEs are incorporated in the formation of vesicular carriers as liposomes, they have been named penetration enhancer-containing vesicle (PEVs) and, it has conclusively demonstrated (Manconi et al., 2012), that there is a synergic effect between the PE agents and dermal efficacy (Mura et al., 2009; Manconi et al., 2011). In the present study, the strategy was different, consisting

in the incorporation of the surfactants on pre-formulated liposomes containing ibuprofen.

To observe the structures adopted by liposomes containing ibuprofen after their application onto the skin, we performed a topographical AFM study. AFM allowed us to work under differing environmental conditions, whilst the specific preparation procedures preserve the samples in their original state (Ruozzi et al., 2007). Actually, AFM has been used in recent times to characterize the nanostructure of some drug delivery system formulations, including nanoparticles and liposomes (Ruozzi et al., 2005; Sitterberg et al., 2010), and also to observe a variety of cells and complex tissues like skin (Fung et al., 2011; Gaikwad et al., 2010). Besides its resolution, AFM offers the advantage to work in air, which mimics the environmental condition of the skin.

2. Experimental

2.1. Materials

L- α Phosphatidylcholine (PC) (egg yolk 99%), ibuprofen (PubChem CID: 3672), polyoxyethylenesorbitan tristearat (Tween[®] 65), polyoxyethylenesorbitanmonooleat (Tween[®] 80) (PubChem CID: 6364656), HEPES sodium salt (PubChem CID: 2724248), sodium chloride (PubChem CID: 5234), sodium hydroxide salt (PubChem CID: 14798), monophosphate potassium (PubChem CID: 516951) and phosphoric acid (PubChem CID: 1004) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Acetonitrile HPLC (PubChem CID: 6342), methanol (PubChem CID: 887), chloroform (PubChem CID: 6212) and ethanol (PubChem CID: 702) were purchased from Panreac (Barcelona, Spain). All other common chemicals were ACS grade. Cellulose membrane molecular weight cut off at 12,000–14,000 Da was acquired from Iberlabo (Madrid, Spain). The commercial gel Ibufen[®] containing 5% (w/w) of ibuprofen was purchased in a local pharmacy. Human skin was obtained from plastic surgery (Barcelona-SCIAS Hospital, Barcelona, Spain).

2.2. Human skin for *ex vivo* permeation assays and AFM characterization

Skin was obtained from the abdominal region of a healthy woman. After being frozen to -20°C , the skin was cut with a dermatome (Model GA 630, Aesculap, Tuttlingen, Germany) into 400 μm -thick pieces, starting from the stratum corneum (OECD, 2004).

Skin sample integrity was verified prior to the experiment (Nangia et al., 2005), by measuring the quantity of water that passes from inside the epidermal layer of the skin to the surrounding atmosphere *via* diffusion and evaporation processes (Van der Valk et al., 2005), using a transepidermal water loss (TEWL) Tewlmeter TM210 (Courage & Khazaka, Köln, Germany). The skin used showed TEWL values below 10 $\text{g}/\text{m}^2 \text{h}$.

The experimental protocol was approved by the Bioethics Committee of the Barcelona-SCIAS Hospital (Spain); and written informed consent forms were provided by volunteer.

2.3. Liposome preparation

Liposomes were prepared according to methods published elsewhere (Suarez-Germa et al., 2012). Briefly, chloroform-methanol (2:1, v/v) solution containing appropriate amounts of PC and ibuprofen were placed in a balloon and dried in a rotary evaporator at room temperature protected from light. For the preparation of unloaded liposomes were used the same amount of PC without ibuprofen. The resulting thin film was kept under high vacuum overnight to remove any traces of organic solvent. Multilamellar liposomes were obtained by redispersion of the thin film

in 20 mM Hepes, 150 mM NaCl buffer, pH 7.4. Liposomes were extruded through an Avanti® Mini-extruder (Avanti Polar Lipids Inc., Alabama, USA), using polycarbonate membranes with a pore size of 100 nm.

Phospholipids were determined by Stewart assay (Stewart, 1980). Final concentration of ibuprofen was assessed on disrupted liposomes with isopropanol and analyzed by HPLC. Resulting in a sample of ibuprofen/PC 0.56 (mol/mol).

Enhancers were incorporated to the liposomes containing ibuprofen with the aim of slightly destabilizing the lipid membrane. These enhancers facilitated a transition in form to planar structure when liposomes were deposited onto the skin. In all cases, the incorporation was previous to the release and permeation assays. Different proportions of PEs (1–25%, v/v) were added to the liposomes. Based on the average particle size and polydispersity three formulations were prepared by adding extemporaneously the appropriate percentage of the corresponding PE to the liposomes loaded with ibuprofen (F1). Thus 0.0025% of Tween 65® and 0.10% of Tween 80® were added to F1 to obtain F2 and F3 formulations, respectively.

2.4. Liposome characterization

2.4.1. Particle size and Z potential

Mean particle size and polydispersity of liposomes were measured by dynamic light scattering. Electrophoretic mobility to assess the effective surface electrical charge was determined with a Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, UK). Liposomal suspensions were diluted 50-fold with Hepes buffer solution before measurement. Each sample was determined three times.

2.4.2. Encapsulation efficiency

Encapsulation efficiency (EE_{IBP}) of ibuprofen in the liposomes was assessed by determining the free ibuprofen (non-encapsulated) after separation of liposomes by centrifugation at $150,000 \times g$ for 2 h. The resulting pellet was mixed with 50% isopropanol and the amount of entrapped ibuprofen was determined by HPLC. To obtain the amount of non-entrapped or “free ibuprofen” (m'), the supernatant was analyzed by the same technique. Hence, the encapsulation efficiency for ibuprofen encapsulation (EE_{IBP}) was obtained by applying the following equation:

$$EE_{IBP} = \left[\frac{m_t - m'}{m_t} \right] \quad (1)$$

where m_t is the total amount of ibuprofen.

2.4.3. Physical stability studies

Stability of liposomes and liposomes containing ibuprofen was determined at 4 °C, 20 °C and 40 °C for 30 days. Samples were characterized for their vesicle size, polydispersity, Z potential and encapsulation efficiency.

2.5. Atomic force microscopy

Atomic force microscopy was carried out with a commercial Multimode AFM controlled by Nanoscope V electronics (Bruker AXS Corporation, Santa Barbara, CA) with TESP sharpened silicon cantilevers (Bruker AXS Corporation, Santa Barbara, CA) with a nominal spring constant of 42 N/m. The instrument was equipped with an “E” scanner (10 μm).

Human skin was defrosted at room temperature, cleaned with ethanol and immediately glued onto a steel disc with a 1 cm² square of double-faced scotch. Skin was stretched slightly till flat with metal tweezers. The formulations were applied to the skin and incubated at 40 °C for 30 min; then, the surface was rinsed with distilled

water and dried with nitrogen. Sample was directly mounted on the top of the AFM scanner and imaged.

Images were acquired in air and in contact mode at 0° scan angle with a scan rate of 1.5 Hz. All images were processed by NanoScope Analysis Software (Bruker AXS Corporation, Madison, WI).

2.6. Release and permeation assays

2.6.1. In vitro release

In vitro release studies of liposomes containing ibuprofen were carried out using Franz-type diffusion cells (Co. Mod Franz Crown Glass CDCF-9) with a diffusion area of 2.54 cm² and a receptor chamber of 12.54 ± 0.53 cm³, using cellulose membrane molecular weight cut off at 12,000–14,000 Da. Experiments were performed under sink conditions to avoid the solubility of ibuprofen interfering during the *in vitro* release. Ibuprofen saturation solubility in phosphate buffer (Cs) was 4.83 mg/cm³. During release studies, sink conditions could be maintained. Briefly, 0.300 cm³ of each formulation was placed in the donor compartment. The receptor chamber was filled with phosphate buffer pH 7.2, maintained at 32 ± 0.5 °C and continuously shaken by a magnetic stirrer. Samples were withdrawn from the receptor compartment at designated time intervals during 5 h and replaced with the same volume of phosphate buffer immediately after each sample collection. The concentration of released drug was assessed by UV-vis spectrophotometer. Values were reported as mean \pm SD of six replicates.

To describe the drug release kinetics of the liposomes containing ibuprofen, the data of the *in vitro* release studies obtained were fitted into mathematical models: the zero-order, first-order, Higuchi and Korsmeyer–Peppas models.

Zero-order kinetic:

$$\frac{\%R_t}{\%R_\infty} = k \cdot t \quad (2)$$

First-order kinetic:

$$\frac{\%R_t}{\%R_\infty} = 1 - e^{-k \cdot t} \quad (3)$$

Higuchi model:

$$\frac{\%R_t}{\%R_\infty} = k \cdot t^{1/2} \quad (4)$$

Korsmeyer–Peppas model:

$$\frac{\%R_t}{\%R_\infty} = k \cdot t^n \quad (5)$$

where $\%R_t$ is the percentage of drug release at time t , $\%R_\infty$ is the total percentage drug released, $\%R_t/\%R_\infty$ is the fraction of drug released at time t , k is the release rate constant, and n is the diffusional release exponent that could be used to characterize the different release mechanisms [$n \leq 0.43$ (Fickian diffusion), $0.43 < n < 0.85$ (anomalous transport) and $n \geq 0.85$ (case II transport, *i.e.* zero-order release)].

A discriminatory procedure was used to determine the model that best explained the diffusion process. One of the most widely used methods is Akaike's approach (Morales et al., 2004), involving the calculation of what is called the Akaike's information criterion (AIC):

$$AIC = n \cdot \ln SSQ + 2p \quad (6)$$

where n is the number of pairs of experimental values, SSQs the residual sum of squares, and p is the number of parameters in the fitting function. The criterion identifies the model that best fits the data with the minimum value of AIC.

The data was analyzed using GraphPad prism 3.0 software (Graphpad Software Inc., California, USA) and the WinNonlin®

professional edition, version 3.3 (Pharsight Corporation, Mountain View, CA).

2.6.2. *Ex vivo* permeation studies

The experiments were carried out in vertical Franz diffusion cells with a diffusion area of 2.54 cm². Human skin was used as a permeation membrane. Skin samples were placed between the receptor and donor compartments, with the dermal side in contact with the receptor medium and the epidermis side in contact with the donor chamber. The donor compartment was charged with quantities of test formulations, equivalent to 3 mg of ibuprofen; and the receptor compartment was filled with phosphate buffer pH 7.2, maintained at 32.0 ± 0.5 °C and continuously shaken in a magnetic stirrer. Samples were withdrawn from the receptor compartment at designated time intervals during 24 h and replaced with the same volume of phosphate buffer immediately after each sample collection. Sink conditions were met in all cases.

2.6.3. Permeation parameters

Cumulative amount (Q_t) permeated through the skin per unit area was calculated from the concentration of ibuprofen in the receiving medium and plotted as a function of time.

Ibuprofen flux, equivalent to permeation rate (J_{ss}) through the skin was calculated by plotting the cumulative amount of drug permeating the skin against time, determining the slope of the linear portion of the curve by linear regression analysis and dividing by the diffusion area (Araujo et al., 2012).

The permeability coefficient at the steady state was calculated according to Fick's first law of diffusion:

$$K_{pss} = J_{ss} \cdot C_0 \quad (7)$$

where K_{pss} (cm/h) is the permeability coefficient, J_{ss} (μg/cm² h) is the flux at the steady state and C_0 is the initial drug concentration in the donor phase (μg/cm³).

The plasma concentration of ibuprofen in steady state after topical application was predicted by means of the following equation (Calpena et al., 1994):

$$C_{ss} = \frac{JA}{Cl_p} \quad (8)$$

where C_{ss} is the plasma steady-state concentration, J the flux determined in this study, A the hypothetical area of application, and Cl_p the plasmatic clearance.

2.6.4. Determination of the amount of drug remaining in the skin

At the end of the permeation test, the skin was removed from the Franz cell and the formulation remaining on the skin was eliminated with gauze soaked in a 0.05% solution of sodium lauryl sulphate, washed with distilled water and blotted dry with filter paper. The permeation area of the skin was then excised and weighed, and its ibuprofen content was extracted with ethanol and an ultrasonic processor. The resulting solutions and the ibuprofen levels (expressed as μg/g cm² of skin) were measured by HPLC, yielding the amount of ibuprofen retained in the skin.

2.7. Analysis of ibuprofen

Ibuprofen content in the release studies was analyzed by a UV-vis spectrophotometer (Dinko instrument 8500 model) at a 221-nm wavelength. A calibration curve with a concentration range from 1.25 to 40 μg/cm³ was used to measure the ibuprofen concentration of the samples and to validate the analytical technique according to international guidelines. The analytical technique validated inter- and intra-day ($n=5$) was linear ($p>0.05$) according to the model applied and was consistent with the percentages of

variation coefficient (%CV), which were between 0.52% and 13.04%. Its accuracy had a relative error (EE%) between 0.48 and 10.94%.

The concentration of ibuprofen in the permeation studies was determined by HPLC (HP 1100, Chemstations, Agilent Technologies, USA). Samples were injected on a C18 reverse-phase column (C18, Kromasil 100 C18 μm 25 × 0.46). The detection wavelength was set at 221 nm. The composition of the eluent was a mixture of acetonitrile and water acidified at pH 3 by orthophosphoric acid (9:1, v/v) and the flow rate was 1.5 cm³/min. A standard calibration curve (0.78–100 μg/cm³) was used to measure ibuprofen concentration of the samples and to validate the analytical technique according to international guidelines (European Medicine Agency (EMA), 2011).

2.8. Statistical analysis

Statistical analyses were assessed by ANOVA, followed by Bonferroni's multiple comparisons test using GraphPad prism 3.0 (Graphpad Software Inc., California, USA).

3. Results

3.1. Physical stability studies

The physical stability of liposome population (with and without ibuprofen) was monitored at three different temperatures of storage for 30 days, before *in vitro*, permeation and AFM studies. Initial diameters and polydispersities determined by quasi-elastic light-scattering were 146.8 ± 0.87 nm and 125.0 ± 1.18 nm, and 0.142 and 0.118, for loaded and unloaded liposomes, respectively. Whilst over the time, no significant changes were observed in both parameters at 4 °C, at 20 °C and 40 °C, liposomes containing ibuprofen underwent significant increases in the diameter (up to 25%) and polydispersity index (up to 139%) after 30 days. Another parameter used to evaluate the physical stability of liposomes containing ibuprofen was the zeta potential (ζ), which gives information about the effective membrane potential of liposomes. The evolution over time of the ζ values of liposomes containing ibuprofen at three different temperatures is shown in Fig. 1A. Values of ζ were always negative and its absolute value decreases as storage time increases. As negatively charged liposomes show a higher release rate and an increased retention of drug in the skin (Sinico et al., 2005), liposomes containing ibuprofen could be good candidates for evaluating the release of the drug through human skin. To evaluate the encapsulation efficiency (EE_{IBP}) of liposomes containing ibuprofen over time, formulations were maintained for 30 days at 40 °C, 20 °C and 4 °C. At 1, 15, 25 and 30 days, an aliquot was taken and the EE_{IBP} value determined. The variations in the EE_{IBP} values as a function of time for the three temperatures assayed are plotted in Fig. 1B. It can be seen that liposomes stored at 4 °C always showed greater values of EE_{IBP} , indicating their greater power to retain the drug. Surprisingly, liposomes stored at 20 °C had lower EE_{IBP} than liposomes stored at 40 °C. Although at the temperatures assayed, PCs are in liquid-crystalline state (the transition temperature of PC is between –4 and 0 °C) the thermal motion of the hydrocarbon chains may be greater at 40 °C than at 20 °C. Then, it may be possible that at 40 °C the leakage of the drug decreases because the diffusion of the drug throughout the bilayer may be slower than the mobility of the hydrocarbon chains. Hence, from the whole physical stability results, the fresh liposomes (less than 5 days) were used in the experiments shown below.

3.2. *In vitro* release studies

Understanding the kinetics of drug release is a prerequisite to improving the design of a topical drug delivery formula.

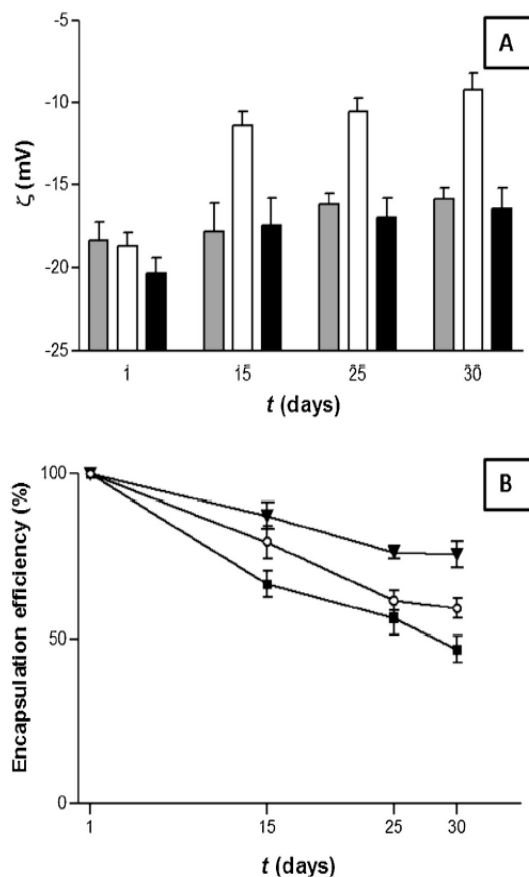


Fig. 1. Effect of storage on the zeta potential of liposomes containing ibuprofen at 40°C (grey), 20°C (white) and 4°C (black) (A) and effect on encapsulation efficiency over time at different temperatures of liposomes containing ibuprofen at 40°C (○), 20°C (■), and 4°C (▼) (B). Reported data are the mean of at least three independent experiments.

Thus, *in vitro* release profiles from the three liposomal formulations and the commercial formulation Ibufen® are shown in Fig. 2A. At first sight, the release profiles indicate a sustained delivery of ibuprofen from liposomal formulations. As expected, the interaction between liposomes containing ibuprofen and various enhancers caused different release parameters as well as distinct amounts of drug delivered. The highest percentages of ibuprofen delivered in the liposomal formulations were obtained from F2 and F3, with values of 40.6% and 37.5% respectively.

Different models were fitted to experimental data (see Section 2) to describe the kinetics of drug release from the different liposome formulations. We used the Akaike's information criterion to determine the best model fitting to the experimental data. That was the Korsmeyer–Peppas model, commonly applied to describe the release of drugs from polymeric matrices and successfully applied to other lipid carriers (Gonzalez-Mira et al., 2011). The outcome mean parameters from this model are shown in Table 1 for the formulations F1 to F3. As it can be seen, the Korsmeyer–Peppas release exponent (n) ranged between 0.330 and 0.395, which leads to assume that diffusion is the main mechanism of drug release for all formulations. According to k values, the incorporation of a PE in the formulation results in approximately 4 and 5 times higher release of the drug, from F3 and F2 respect to the F1.

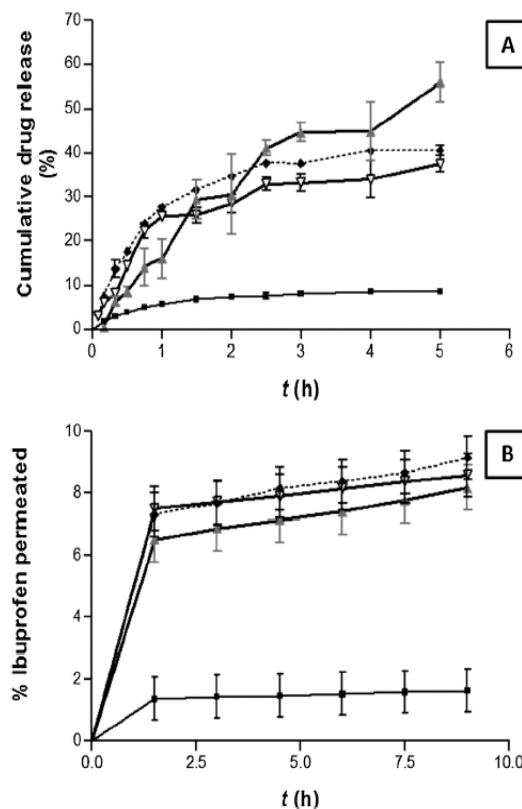


Fig. 2. Cumulative mean of *in vitro* release profiles from several formulations (A) and permeation rates of *ex vivo* transdermal delivery of ibuprofen (B) of F1 (■), F2 (○), F3 (△) and commercial gel (▲). Data are presented as mean \pm standard deviation ($n=6$).

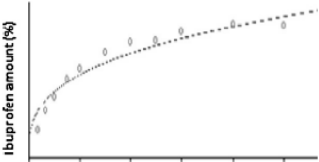
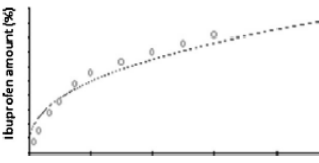
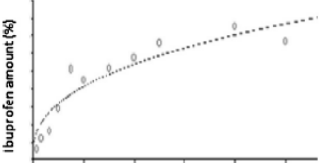
3.3. Permeation

The developed formulations and the commercial formulation Ibufen® were compared in the *ex vivo* permeation assays. Permeation parameters obtained from fitting Eq. (7) to the experimental data are shown in Table 2. As shown by the permeation profiles (Fig. 2B) liposomal formulations F2 and F3 presented similar percentages of ibuprofen permeated. However, the analysis of fluxes through the skin evidenced a highest J_{ss} value for F2 than for the rest of the formulations, which is in concordance with the highest value of K_{pss} shown by this formulation. Remarkably the drug retained by the skin was not statistically significant ($p > 0.05$) when comparing F2 with Ibufen®, which points to Tween 65® (0.0025% of) as a better PE for ibuprofen than Tween 80® (0.10%). Then, the plasma concentration of ibuprofen under steady-state conditions can be calculated by means of Eq. (8). Taking into account a plasma clearance (Cl_p) of 3.5 cm³/h for ibuprofen (Holford, 1998), assuming a maximum area of application of 100 cm² and using the ibuprofen flux previously calculated (see values in Table 2), we would expect an ibuprofen plasma level below of 0.08 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ in all formulations.

3.4. Atomic force microscopy

The resulting structures adopted onto the healthy skin by the studied formulations were observed by means of AFM with the purpose of obtaining information about the mechanism of deposition and a possible rationale for the different release and permeation behaviours. In Fig. 3, height and deflection AFM images of healthy skin (images A and B, respectively) are shown. The features of the

Table 1
Korsmeyer–Peppas parameters obtained after fitting Eq. (5) the release data for liposomal formulations containing ibuprofen and different enhancers.

Formulation liposomes with ibuprofen	Parameters				Process diffusion	Korsmeyer–Peppas release fitting profile
	k (h^{-1})	CV (%)	n	CV (%)		
(F1)	5.33 ^{a,b}	4.57	0.330	10.89	Fickian diffusion	
+Tween 65 (F2)	24.52 ^b	5.60	0.395	11.78	Fickian diffusion	
+Tween 80 (F3)	20.40	7.30	0.389	14.16	Fickian diffusion	

n : diffusion release exponent; k : rate constant; CV: coefficient of variation. Significantly different: $p < 0.05$.

^a Different to F2.

^b Different to F3.

tissue skin are similar to others published elsewhere (Grant et al., 2012; Quan et al., 2012). However, protruding plane structures often with a paramount-like profile can be seen (the middle-top left in image A, Fig. 3), with height values ranging from 100 to 300 nm. These step height differences between planes are expected and reflect the terrace topography of the tissue, strongly enhanced by the high vertical resolution of the AFM. Although this may be considered as a drawback for the characterization of the tissue, AFM will be a powerful tool for unveiling the mechanisms underlying the deposition of liposomes onto the skin. To this end, the different formulations were deposited onto the skin and allowed to extend spontaneously.

The height and deflection images obtained after the deposition of F1 onto the skin tissue are shown in Fig. 3C and D, respectively. Since this formulation is not supplemented with any PE, the image would be representative of structures achieved after the deposition of liposomes loaded with ibuprofen. Three different regions can be distinguished. The first (black start) shows a continuous planar and smooth structure with a roughness value of 3.1 nm. From some small defects observed (holes), the step-height difference of this region respect to the skin can be established in 8 ± 2 nm, a value which compares well with the thickness of typical lipid bilayer of phospholipids (Reviakine and Brisson, 2000). Black arrows in Fig. 3D point to a second region, with a step-height difference of 80 ± 10 nm respect to the first region and

a roughness of 2.6 nm. It is likely to assume that this second structure results from the superposition of several bilayers, as suggested by the proportionality of the relative height between both regions. Interestingly a third kind of structure, squashed hemispheres protruding 200–500 nm (white arrows) above the layered regions can be seen in Fig. 3D. These observations suggest the presence of partially fused liposomes. It is well known that when liposomes are deposited onto solid supports, SLBs with different features are formed depending on physicochemical conditions. Therefore, it is likely that liposomes deposited onto the skin will undergo a similar transformation, from vesicular to planar structures (as those observed in Fig. 3D). Because of the excess of lipid applied, it is reasonable that several structures representative of different stages of the deposition process will be observed. Such is could be the case of non-fused or even intact liposomes observed.

We have seen that the incorporation of PE increases ibuprofen permeation throughout the skin (see Table 2). Somehow, these parameters should be influenced, among other factors, by the kind of structures formed after liposomes deposition onto skin. Therefore, AFM topographical studies were performed after applying F2, F3 and Ibufen®. Fig. 4 shows a serial of height (A, C, E) and deflection (B, D, F) images of these formulations. Height and deflection images obtained after deposition of F2 are shown in Fig. 4A and B, respectively. Large flat regions can be seen (black arrows), with a

Table 2
Parameters of permeation of ibuprofen through human skin after 24 h for the three formulations designed in this paper and a commercial formulation.

Formulation	C_0 (mg/cm ³)	J_{ss} (μg/cm ² h)	$K_{ps} \times 10^4$ (cm/h)	Skin retention (mg/g skin cm ²)
F1	10	0.50 ± 0.15	0.10 ± 0.02	0.25 ± 0.03
F2	10	$2.80 \pm 0.63^*$	2.80 ± 0.60	$0.71 \pm 0.09^*$
F3	10	1.54 ± 1.73	1.73 ± 0.30	0.58 ± 0.12
Ibufen®	50	2.51 ± 0.45	0.50 ± 0.05	0.76 ± 0.04

C_0 is the initial drug concentration, J_{ss} is the drug flux and K_{ps} is the permeability coefficient at the steady state. The ibuprofen % retained in skin refers to the end of the study. The results are expressed as mean \pm standard deviation ($n=6$).

* Not statistically significant ($p > 0.05$) from Ibufen®.

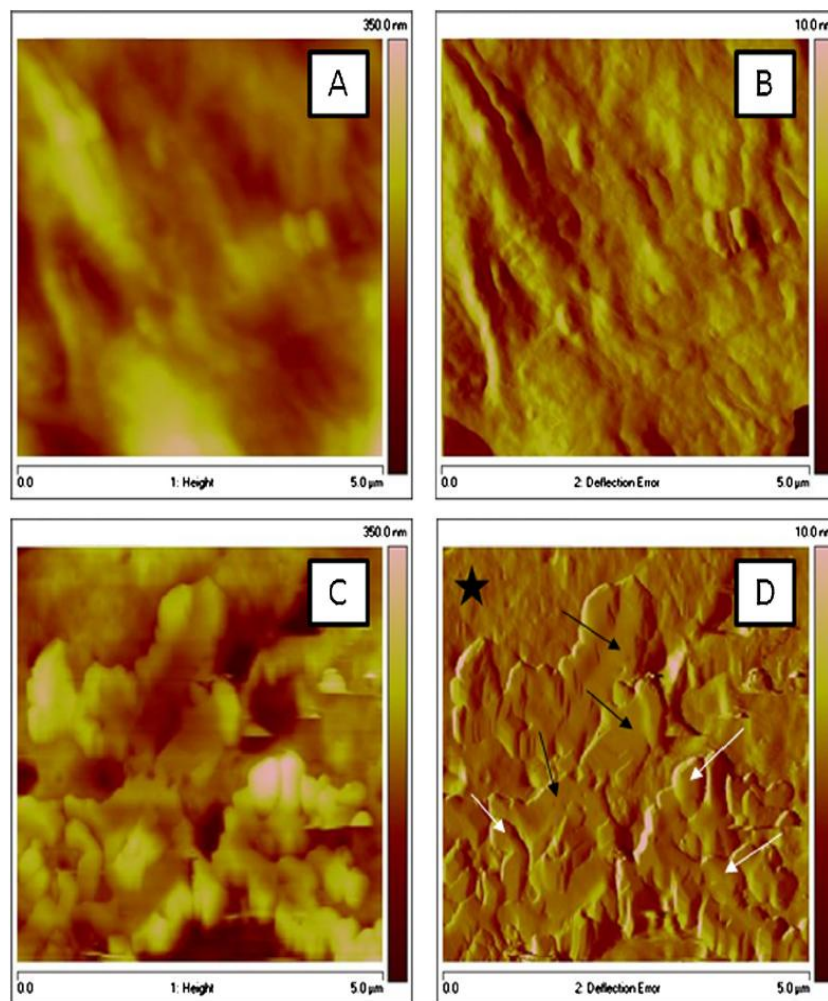


Fig. 3. Height and deflection images for Human skin (A and B) and liposomes containing ibuprofen (F1) onto human skin (C and D).

mean roughness value of 1.9 nm. As can be seen in Fig. 4B, these flat regions cover more surface than in the absence of the PE (Fig. 3D). Also some squashed hemisphere structures (white arrows) flatter than in the absence of PE are observed. In presence of Tween 65[®] as enhancer, these structures protrude from the lipid film by a mean height of 22 ± 7 nm, which is below the height in absence of the enhancer. When the F3, is deposited on the skin, we obtain the height and deflection images shown in images C and D of Fig. 4. In this case, the extension yields a wider layer with a mean roughness value of 6.7 nm and some holes (black arrows in Image 4D) that allow establishing a step-height difference of 27 ± 14 nm between the layer and the skin. Remarkably no hemisphere structures could be observed in this case. To further demonstrate that the layered structures are actually originated from liposomes disruption, we have performed the topographical characterization of the structures resulting from spreading the commercial non-liposome based formulation Ibufen[®]. Height and deflection images belonging to the application of this gel onto the skin are shown in Fig. 4E and F, respectively. This formulation does not yield layers but rather cylinder-shaped structures (black arrows) with a mean step height of 33 ± 14 nm and a mean diameter of 180 ± 40 nm. These structures are sometimes organized to form closed structures similar to rings.

4. Discussion

Despite predictions in the published literature, very little is known about the transformations undergone by liposomes when deposited on biological surfaces. Understanding liposomal drug release kinetics is a key-factor, not only for encountering the most adequate liposome formulation, but also to grasping the real mechanism behind the beneficial therapeutic effects of these carriers.

The interaction of non-ionic surfactants with liposomes has been extensively studied (Cevc and Blume, 2004; Wachter et al., 2008). As expected, incorporation of surfactants as PEs in liposomes induces destabilization of the bilayer and, consequently, increases the elasticity of the vesicular system. This results in enhancement of drug release (Honeywell-Nguyen et al., 2002). The objectives of the present study were twofold: (1) to gain insight into how liposomes supplemented PEs are deposited onto the skin; and (2) to establish a possible correlation between the resulting structures formed onto the skin with the quantitative amount of drug transported. To these ends, we have characterized the behaviour of a conventional formulation of liposomes containing ibuprofen with the aim to compare the results with two formulations including PEs and the commercial non-liposomal formulation Ibufen[®].

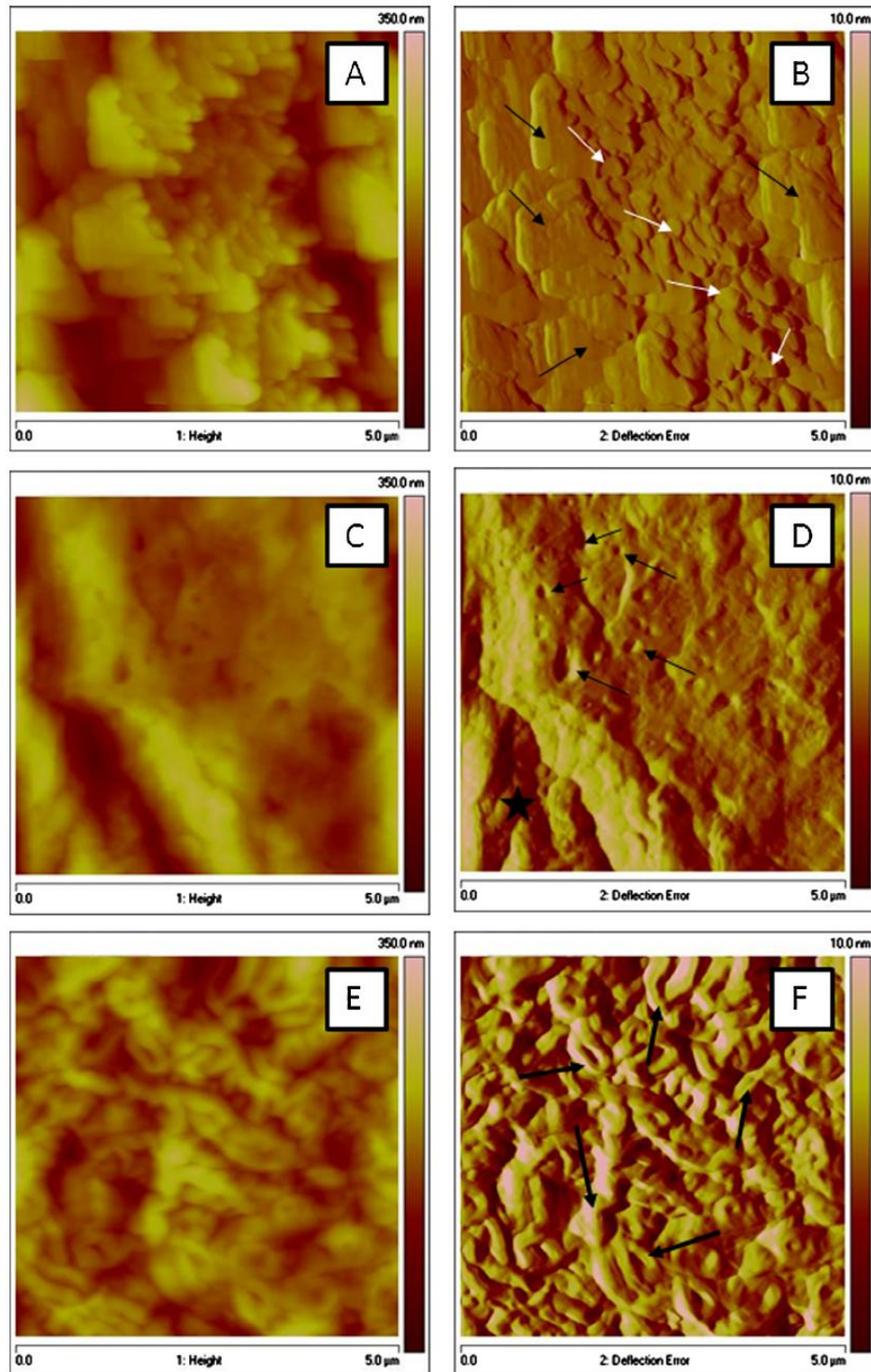


Fig. 4. Height and deflection images for liposomes with ibuprofen onto human skin with Tween 65 (F2) (A and B), Tween 80 (F3) (C and D) and the commercial formulation (Ibufen®) (E and F).

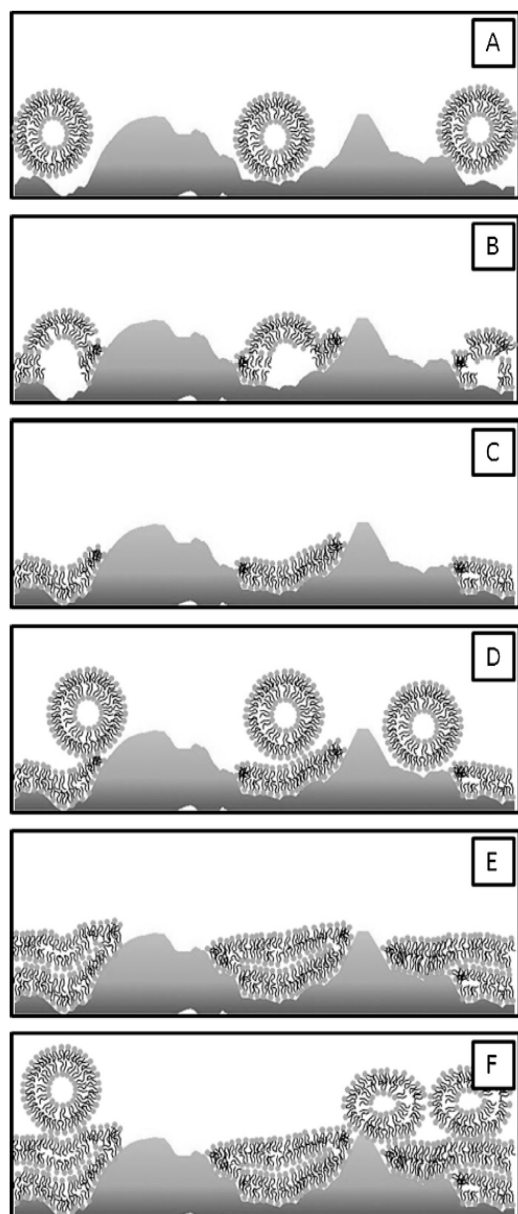


Fig. 5. Cartoon showing the possible mechanism of transformation of liposomes on planar structures onto the human skin.

The physical stability of the liposomes loaded with ibuprofen, formulation F1, has been monitored for a period of 30 days. According to the variations in size, polydispersity, zeta potential and encapsulation efficiency, it was established that liposomes should be used within the first 5 days, for the permeation experiments and AFM observations. This is relevant because of in our experiments the PEs, namely Tween 65[®] and Tween 80[®], are added extemporaneously to F1 to produce F2 and F3. This is considered the initial time for the permeation studies as well as for the AFM experiments.

The F2 and F3 formulations produced significant increases respect to F1 in the *in vitro* release and permeation studies of the drug through the skin. Besides, the values achieved were very similar to those showed by Ibufen[®]. Remarkably, although the concentration of the drug was 5 times higher for the commercial

formulation, F2 and Ibufen[®], show similar values of flux and appear to be equally retained by the skin. These results imply that a reduced concentration of the liposomes containing Ibuprofen (up to 20%) results in the same local bioavailability as with a commercial pharmaceutical formulation. In addition, small amounts of the topical dose applied are absorbed and the predicted serum concentrations are significantly below the therapeutic range for the treatment of inflammation (10–50 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$) (Davies, 1998). Hence, liposomes containing ibuprofen with and without enhancer would become safer than the commercial formulation tested for a local effect.

AFM enables direct inspection of the interaction of liposome formulations with the skin. At large scale (>25 μM), skin is a tissue with a very rough surface and large step-height differences between regions. As expected, however, after deposition F1 the skin become smoother and covered by different kinds of structures. Planar regions, resembling supported lipid bi- or multilayers, in coexistence of non-fused or/and intact liposomes have been observed. Whilst the additions of Tween 65[®] or Tween 80[®] to liposomes, both, appear to promote the formation of these planar structures, non-fused liposomes, however, were only detected in presence of Tween 65[®]. On the other hand the formation of planar structures has been not observed when Ibufen[®] is applied onto the skin but the formation of cylinder-like structures. Noteworthy, F2 and Ibufen[®], show fluxes and skin retention higher than F3. However, the concentration of Ibufen[®] applied is 5 times the one used for F2 and F3. Hence, it is conceivable that the planar layers, appearing only in PEs presence will provide a kind of depot effect.

Fig. 5 shows a series of cartoons of a hypothetical mechanism of liposome spreading on natural human skin. After an unspecific adsorption step (Fig. 5A), the rupture of liposomes begin (Fig. 5B) followed by formation of planar lipid structures (Fig. 5C). Since there is an excess of liposomes (Fig. 5D), second and multiple lipid bilayers might be formed (Fig. 5E). Afterwards, intact liposomes begin to deposit, either onto the row skin or most likely onto the first deposited bilayer, where it becomes easier to spread because of the less roughness and stiffness of this layer (Quan et al., 2012). However, we should also consider an active role of the skin with possible swelling of intercorneocyte lamellae when fused partially with the liposomes. Whether such a possibility should be not excluded, some of the structures as those featured in the cartoons in Fig. 5, may provide a rationale for a possible depot effect of ibuprofen, an strategy that may be applied to other drugs when deposited onto the skin.

5. Conclusions

We confirmed that adding PEs to liposomes enhances ibuprofen delivery through human skin. The process of liposome transformation into planar lipid bilayers or multilayer structures as observed by AFM provides means for a high concentration of drug permeating through the skin. Consequently, these kinds of formulations are capable of improving local ibuprofen bioavailability. Hence, we can assume that ibuprofen liposomes supplemented with non-ionic surfactant achieve the same therapeutic effect as the commercial formulation tested.

Acknowledgements

We are grateful to Dr. Humet from Hospital Barcelona-SCIAS (Barcelona, Spain) for providing skin samples. We are also indebted to Mr. Carmelo Scire and Mr. Alex Bovè for helpful discussions. In addition, R.B. was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation through the Torres Quevedo PTQ-11-04462 grant. V-G M.L. acknowledges support by fellowship of CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México). Special thanks to the

review for valuable comments introduced during the revision of this manuscript.

References

Araujo, J., Garcia, M.L., Mallandrich, M., Souto, E.B., Calpena, A.C., 2012. Release profile and transscleral permeation of triamcinolone acetonide loaded nanostructured lipid carriers (TA-NLC): in vitro and ex vivo studies. *Nanomedicine* 8, 1034–1041.

Bahia, A.P., Azevedo, E.G., Ferreira, L.A., Frezard, F., 2010. New insights into the mode of action of ultradeformable vesicles using calcein as hydrophilic fluorescent marker. *Eur. J. Pharm. Sci.* 39, 90–96.

Barry, W., 1983. *Dermatological Formulations: Percutaneous Absorption*. Marcel Dekker, New York.

Beija, M., Salvayre, R., Lauth-de Viguier, N., Marty, J.D., 2012. Colloidal systems for drug delivery: from design to therapy. *Trends Biotechnol.* 30, 485–496.

Calpena, A.C., Lauroba, J., Suriol, M., Obach, R., Domenech, J., 1994. Effect of d-limonene on the transdermal permeation of nifedipine and domperidone. *Int. J. Pharm.* 103, 179–186.

Caruthers, S.D., Wickline, S.A., Lanza, G.M., 2007. Nanotechnological applications in medicine. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18, 26–30.

Cevc, G., Blume, G., 1992. Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. *Biochim. Biophys. Acta* 1104, 226–232.

Cevc, G., Blume, G., 2004. Hydrocortisone and dexamethasone in very deformable drug carriers have increased biological potency, prolonged effect, and reduced therapeutic dosage. *Biochim. Biophys. Acta* 1663, 61–73.

Cevc, G., Gebauer, D., Stieber, J., Schatzlein, A., Blume, G., 1998. Ultraflexible vesicles, transfersomes, have an extremely low pore penetration resistance and transport therapeutic amounts of insulin across the intact mammalian skin. *Biochim. Biophys. Acta* 1368, 201–215.

Cevc, G., Schatzlein, A., Richardsen, H., 2002. Ultradeformable lipid vesicles can penetrate the skin and other semi-permeable barriers unfragmented. Evidence from double label CLSM experiments and direct size measurements. *Biochim. Biophys. Acta* 1564, 21–30.

Ciotti, S.N., Weiner, N., 2002. Follicular liposomal delivery systems. *J. Liposome Res.* 12, 143–148.

Davies, N.M., 1998. Clinical pharmacokinetics of ibuprofen. The first 30 years. *Clin. Pharmacokinet.* 34, 101–154.

El Maghraby, G.M., Barry, B.W., Williams, A.C., 2008. Liposomes and skin: from drug delivery to model membranes. *Eur. J. Pharm. Sci.* 34, 203–222.

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.

Elsayed, M.M., Abdallah, O.Y., Naggar, V.F., Khalafallah, N.M., 2007a. Lipid vesicles for skin delivery of drugs: reviewing three decades of research. *Int. J. Pharm.* 332, 1–16.

Elsayed, M.M., Abdallah, O.Y., Naggar, V.F., Khalafallah, N.M., 2007b. PG-liposomes: novel lipid vesicles for skin delivery of drugs. *J. Pharm. Pharmacol.* 59, 1447–1450.

Escribano, E., Calpena, A.C., Queralt, J., Obach, R., Domenech, J., 2003. Assessment of diclofenac permeation with different formulations: anti-inflammatory study of a selected formula. *Eur. J. Pharm. Sci.* 19, 203–210.

European Medicine Agency (EMA), 2011. *Guideline on Validation of Bioanalytical Methods*, EMEA/CHMP/EWP/192217/2009.

Fung, C.K., Xi, N., Yang, R., Seiffert-Sinha, K., Lai, K.W., Sinha, A.A., 2011. Quantitative analysis of human keratinocyte cell elasticity using atomic force microscopy (AFM). *IEEE Trans. Nanobiosci.* 10, 9–15.

Gaikwad, R.M., Vasilyev, S.I., Datta, S., Sokolov, I., 2010. Atomic force microscopy characterization of corneocytes: effect of moisturizer on their topology, rigidity, and friction. *Skin Res. Technol.* 16, 275–282.

Gonzalez-Mira, E., Egea, M.A., Souto, E.B., Calpena, A.C., Garcia, M.L., 2011. Optimizing flurbiprofen-loaded NLC by central composite factorial design for ocular delivery. *Nanotechnology* 22, 045101.

Grant, C.A., Twigg, P.C., Tobin, D.J., 2012. Static and dynamic nanomechanical properties of human skin tissue using atomic force microscopy: effect of scarring in the upper dermis. *Acta Biomater.* 8, 4123–4129.

Gregoriadis, G., Florence, A.T., 1993. Liposomes in drug delivery: clinical diagnostic and ophthalmic potential drugs. *Drugs* 45, 15–28.

Guo, J., Ping, Q., Sun, G., Jiao, C., 2000. Lecithin vesicular carriers for transdermal delivery of cyclosporin A. *Int. J. Pharm.* 194, 201–207.

Hain, N., Gallego, M., Reviakine, I., 2013. Unraveling Supported Lipid Bilayer Formation Kinetics: Osmotic Effects. *Langmuir* 19, 2282–2288.

Holford, N., 1998. *Drug Data Handbook: Clinical Pharmacokinetics*, 3rd ed. Adis International, Auckland, NZ.

Honeywell-Nguyen, P.L., de Graaff, A.M., Groenink, H.W., Bouwstra, J.A., 2002. The in vivo and in vitro interactions of elastic and rigid vesicles with human skin. *Biochim. Biophys. Acta* 1573, 130–140.

Hughes, G.A., 2005. Nanostructure-mediated drug delivery. *Nanomedicine* 1, 22–30.

Israelachvili, J.N., Mitchell, D.J., 1975. A model for the packing of lipids in bilayer membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 389, 13–19.

Lasch, J., Weissig, V., Brandl, M., 2003. In: Torchilin, V., Weissig, V. (Eds.), *Preparation of Liposomes*. Oxford University Press, New York, pp. 3–27.

Manconi, M., Caddeo, C., Sinico, C., Valenti, D., Mostallino, M.C., Lampis, S., Monduzzi, M., Fadda, A.M., 2012. Penetration enhancer-containing vesicles: composition

dependence of structural features and skin penetration ability. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 82, 352–359.

Manconi, M., Sinico, C., Caddeo, C., Vila, A.O., Valenti, D., Fadda, A.M., 2011. Penetration enhancer containing vesicles as carriers for dermal delivery of tretinoin. *Int. J. Pharm.* 412, 37–46.

Morales, M.E., Gallardo Lara, V., Calpena, A.C., Domenech, J., Ruiz, M.A., 2004. Comparative study of morphine diffusion from sustained release polymeric suspensions. *J. Control. Release* 95, 75–81.

Mui, B., Hope, M., 2007. Formation of large unilamellar vesicles by extrusion. In: Gregoriadis, G. (Ed.), *Liposome Technology: Liposome Preparation and Related Techniques*, vol. 1, 1st ed. Informa Healthcare USA Inc, New York, pp. 55–64.

Mura, S., Manconi, M., Sinico, C., Valenti, D., Fadda, A.M., 2009. Penetration enhancer-containing vesicles (PEVs) as carriers for cutaneous delivery of minoxidil. *Int. J. Pharm.* 380, 72–79.

Nangia, A., Berner, B., Maibach, H., 2005. Transepidermal water loss measurements for assessing skin barrier functions during in vitro percutaneous absorption studies. In: Bronaugh, R., Maibach, H. (Eds.), *Percutaneous Absorption Drugs, Cosmetics, Mechanisms, Methodology*, 4th ed. Marcel Dekker Inc, New York, pp. 587–594.

Niemiec, S.M., Ramachandran, C., Weiner, N., 1995. Influence of nonionic liposomal composition on topical delivery of peptide drugs into pilosebaceous units: an in vivo study using the hamster ear model. *Pharm. Res.* 12, 1184–1188.

OECD, 2004. *Guideline for the Testing Chemicals. Skin Absorption: In Vitro Method*, pp. 428.

Patel, A., Bell, M., O'Connor, C., Inchley, A., Wibawa, J., Lane, M.E., 2013. Delivery of ibuprofen to the skin. *Int. J. Pharm.* 457, 9–13.

Picas, L., Milhiet, P.E., Hernandez-Borrell, J., 2012. Atomic force microscopy: a versatile tool to probe the physical and chemical properties of supported membranes at the nanoscale. *Chem. Phys. Lipids* 165, 845–860.

Quan, T., Qin, Z., Voorhees, J.J., Fisher, G.J., 2012. Cysteine-rich protein 61 (CCN1) mediates replicative senescence-associated aberrant collagen homeostasis in human skin fibroblasts. *J. Cell. Biochem.* 113, 3011–3018.

Reviakine, I., Brisson, A., 2000. Formation of supported phospholipid bilayers from unilamellar vesicles investigated by atomic force microscopy. *Langmuir* 16, 1806–1815.

Ruozzi, B., Tosi, G., Forni, F., Fresta, M., Vandelli, M.A., 2005. Atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy: two techniques for rapid characterization of liposomes. *Eur. J. Pharm. Sci.* 25, 81–89.

Ruozzi, B., Tosi, G., Leo, E., Vandelli, M.A., 2007. Application of atomic force microscopy to characterize liposomes as drug and gene carriers. *Talanta* 73, 12–22.

Sackmann, E., 1996. Supported membranes: scientific and practical applications. *Science* 271, 43–48.

Shivakumar, H.N., Narasimha, S., 2010. Topical and transdermal drug delivery. In: Kulkarni, V.S. (Ed.), *Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems and Personal Care Products*, 1st ed. Elsevier, USA, pp. 1–36.

Shokri, J., Nokhodchi, A., Dashbolaghi, A., Hassan-Zadeh, D., Chafourian, T., Barzegar Jalali, M., 2001. The effect of surfactants on the skin penetration of diazepam. *Int. J. Pharm.* 228, 99–107.

Sinico, C., Manconi, M., Peppi, M., Lai, F., Valenti, D., Fadda, A.M., 2005. Liposomes as carriers for dermal delivery of tretinoin: in vitro evaluation of drug permeation and vesicle-skin interaction. *J. Control. Release* 103, 123–136.

Sitterberg, J., Ozcetin, A., Ehrhardt, C., Bakowsky, U., 2010. Utilising atomic force microscopy for the characterisation of nanoscale drug delivery systems. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 74, 2–13.

Song, G., Wu, H., Yoshino, K., Zamboni, W.C., 2012. Factors affecting the pharmacokinetics and pharmacodynamics of liposomal drugs. *J. Liposome Res.* 22, 177–192.

Stewart, J.C., 1980. Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrioxalate. *Anal. Biochem.* 104, 10–14.

Suarez-Germa, C., Loura, L.M., Prieto, M., Domenech, O., Montero, M.T., Rodriguez-Banqueri, A., Vazquez-Ibar, J.L., Hernandez-Borrell, J., 2012. Membrane protein-lipid selectivity: enhancing sensitivity for modeling FRET data. *J. Phys. Chem. B* 116, 2438–2445.

Szelenyi, I., 2012. Nanomedicine: evolutionary and revolutionary developments in the treatment of certain inflammatory diseases. *Inflamm. Res.* 61, 1–9.

Tanaka, M., Sackmann, E., 2005. Polymer-supported membranes as models of the cell surface. *Nature* 437, 656–663.

Toutou, E., Junginger, H.E., Weiner, N.D., Nagai, T., Mezei, M., 1994. Liposomes as carriers for topical and transdermal delivery. *J. Pharm. Sci.* 83, 1189–1203.

Turi, J.S., Danielson, D., Woltersom, J.W., 1979. Effects of polyoxypropylene 15 stearyl ether and propylene glycol on percutaneous penetration rate of diflorasone diacetate. *J. Pharm. Sci.* 68, 275–280.

Van der Valk, P., Kucharekova, M., Tupker, R., 2005. Transepidermal water loss and its relation to barrier function and skin irritation. In: Fluhr, J.W., Berardesca, E., Elsner, P., Maibach, H.I. (Eds.), *In: Dermatology: Clinical & Basic Science*, vol. 1. CRS Press, United States of America, pp. 97–104.

Wachter, C., Vierl, U., Cevc, G., 2008. Adaptability and elasticity of the mixed lipid bilayer vesicles containing non-ionic surfactant designed for targeted drug delivery across the skin. *J. Drug Target.* 16, 611–625.

Wiggenhorn, M., 2008. *Scale-Up of Liposome Manufacturing: Combining High Pressure Liposome Extrusion with Drying Technologies*, 1st ed. Cuvillier Verlag Göttingen, Göttingen.

Williams, A.C., Barry, B.W., 2012. Penetration enhancers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64, 128–137.

3.2 Comprendiendo los fenómenos de interacción en superficies para mejorar la administración tópica de fármacos

Enhanced topical delivery of hyaluronic acid encapsulated in liposomes: a surface-dependent phenomenon

Vázquez-González, Martha L., Calpena, Ana C., Domènech, Oscar, Montero, M.T., Hernández-Borrell, Jordi (2015)
Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, vol. 134, p. 31-39

RESUMEN

En el presente estudio, se determinó la liberación y permeación de ácido hialurónico (HA) encapsulado en liposomas cuando se deposita en dos superficies: la celulosa, un modelo ampliamente utilizado para la investigación de transporte de fármacos; y piel humana, una biointerface natural utilizada para administración transdérmica de fármacos.

Hemos preparado y caracterizado liposomas cargados con ácido hialurónico (AH) y liposomas que incorporan dos potenciadores de la permeación (PEs): el surfactante no iónico Tween[®] 80, y Transcutol[®] P, un agente solubilizante capaz de mezclarse con disolventes polares y no polares. Los ensayos *in vitro* y *ex vivo* de permeación mostraron que los PEs mejoran la liberación de AH de los liposomas. Dado que uno de los posibles mecanismos postulados para la acción de los liposomas en la piel se relaciona con su adsorción en el estrato córneo, se utilizó la microscopía de fuerza atómica (AFM) topografía y análisis de fuerza (FV) para investigar las estructuras formadas después de la deposición de las formulaciones de liposomas sobre las superficies investigadas. Exploramos la posible relación entre la formación de estructuras de lípidos en las superficies planas y la permeación de AH.

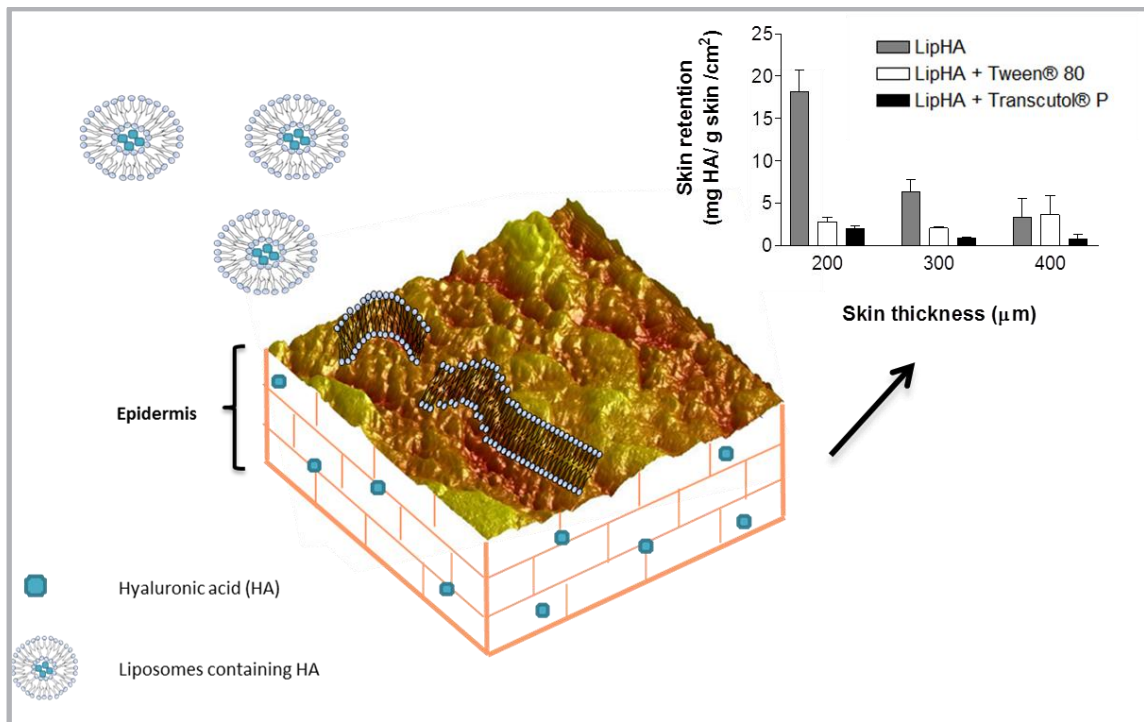
Aspectos relevantes en este estudio

A través de la encapsulación de ácido hialurónico en liposomas para aplicación tópica se demuestran los siguientes aspectos:

- a) Los potenciadores de la permeación incorporados a los liposomas modifican la permeación del ácido hialurónico en celulosa y piel humana.
- b) De acuerdo con las imágenes obtenidas por medio del microscopio de fuerza atómica, existen diferencias en las estructuras y las fuerzas de adhesión originadas en las superficies estudiadas.
- c) Las estructuras lipídicas planas y el proceso de permeación parecen estar relacionados.

RESUMEN GRAFICO

Liposomas que contienen AH forman bicapas lipídicas soportadas (SLBs) sobre la piel humana, el AH es principalmente liberado en la epidermis.





Contents lists available at ScienceDirect

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces

journal homepage: www.elsevier.com/locate/colsurfb

Enhanced topical delivery of hyaluronic acid encapsulated in liposomes: A surface-dependent phenomenon



Martha L. Vázquez-González^a, Ana C. Calpena^{b,c}, Òscar Domènech^{a,c},
M. Teresa Montero^{a,c}, Jordi H. Borrell^{a,c,*}

^a Departament de Físicoquímica, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Spain

^b Unitat de Farmàcia i Farmacocinètica, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Spain

^c Institut de Nanociència i Nanotecnologia (IN² UB), Av. Joan XXIII, 08028 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 February 2015

Received in revised form 5 May 2015

Accepted 12 June 2015

Available online 22 June 2015

Keywords:

Hyaluronic acid

Liposomes

Skin

Penetration enhancers

Drug delivery

AFM

Force volume

ABSTRACT

In the present study, we investigated the release and permeation of hyaluronic acid (HA) encapsulated in liposomes when deposited onto two surfaces: cellulose, a model widely used for investigating transport of drugs; and human skin, a natural biointerface used for transdermal drug delivery. We prepared and characterised liposomes loaded with HA and liposomes incorporating two penetration enhancers (PEs): the non-ionic surfactant Tween[®] 80, and Transcutol[®] P, a solubilising agent able to mix with polar and non-polar solvents. *In vitro* and *ex vivo* permeation assays showed that PEs indeed enhance HA-release from liposomes. Since one of the possible mechanisms postulated for the action of liposomes on skin is related to its adsorption onto the *stratum corneum* (SC), we used atomic force microscopy (AFM) topography and force volume (FV) analysis to investigate the structures formed after deposition of liposome formulations onto the investigated surfaces. We explored the possible relationship between the formation of planar lipid structures on the surfaces and the permeation of HA.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Supported lipid bilayers (SLBs) are a type of model membrane that has received much attention in recent years [1]. SLBs can be formed from double deposition of Langmuir–Blodgett lipid monolayers or, most commonly, from the deposition of liposomes in suspension onto convenient surfaces [2]. Numerous studies have investigated the mechanisms underlying the formation of SLBs from liposomes. The most accepted mechanism involves three steps: (i) membrane deformation and flattening after encountering the surface; (ii) rupture; and (iii) transformation into bilayer disks [3]. These steps are based on investigation of liposome deposition onto inorganic surfaces (*i.e.* mica, glass or TiO₂, among others). However, less attention has been paid to the possible connection between studies investigating lipid lateral segregation, lipid–protein interactions in biomembranes, the building of functionalised surfaces to design nanobiosensors, and the use of liposomes as drug delivery systems for topical and transdermal applications. The most external layer of the skin is the epidermis,

which is constituted by three main layers: the *stratum corneum* (SC), the granular layer and the basal layer. Thus, from a physico-chemical viewpoint, the SC (a heterogeneous structure comprising keratinised cells, proteins and an intercellular lipid layer) may be conceived as a surface on which liposomes are deposited, and from where systemic effects are expected in some cases. It is noteworthy that while liposomes have been widely used in cosmetics and drug delivery through the skin, the physical effect on liposome integrity resulting from the interaction with the skin is not totally understood [4].

In this study, we encapsulated hyaluronic acid (HA) in liposomes and studied its release when deposited onto cellulose, a model often used for *in vitro* experiments, and onto the SC from human skin. HA was selected because it is involved in various biological processes, such as hydration, nutrient exchange and cell differentiation and motility [5]. HA is a hydrophilic dipolysaccharide with a very high molecular weight (200–425 kDa in this study), the structure of which contains repeating units of D-glucuronic acid and N-acetyl-D-glucosamine [6]. HA is used in a wide variety of medical applications, including osteoarthritis, embryo implantation and cutaneous wound healing [7]. In particular, HA and its derivatives are used to treat dermal and subcutaneous wounds of various etiologies. In recent years, the primary focus for chronic wound care has been the development of dressings to promote a moist

* Corresponding author at: Institut de Nanociència i Nanotecnologia (IN² UB), Av. Joan XXIII, 08028 Barcelona, Spain. Tel.: +34 934035986.
E-mail address: jordiborrell@ub.edu (J.H. Borrell).

environment. Advances in dressing technology, however, have not yet resulted in the development of materials that correct abnormalities in the healing cascade, with the sole exception of those containing hyaluronic acid, which specifically promotes healing [8].

As previously reported [9,10], Atomic Force Microscopy (AFM) is a non-invasive technique that is highly suitable for studying the mechanical properties of the skin under environmental conditions and investigating the effect of pharmaceutical products designed for topical applications. Among the physical magnitudes extracted from AFM working in force spectroscopy mode, the adhesive forces provide a means for understanding the mechanisms behind the effects of pharmaceutical formulations on the skin [11].

In the present study, we developed and characterised three liposomal formulations containing encapsulated HA and investigated the effect of two penetration enhancers (PEs), Tween® 80 and Transcutol® P, on the transformation of liposomes into planar lipid structures on SC from human skin. The liposomal formulations under study were then characterised by AFM topography and force volume (FV), by analysing the structures adopted after spreading onto different substrates.

2. Experimental

2.1. Materials

L- α phosphatidylcholine (PC) (egg yolk, 99% purity), polyoxyethylene (20) sorbitan monooleat (Tween® 80) and Hepes sodium salt, sodium chloride, sodium hydroxide, potassium monophosphate were purchased from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA). Transcutol® P was a kind gift from Gattefossé (Saint-Priest, France). Hyaluronic acid (sodium hyaluronate) from *Streptococcus equi* was purchased from Fagron Iberica (Barcelona, Spain). Acetonitrile HPLC, methanol, chloroform and ethanol were purchased from Panreac (Barcelona, Spain). All other common chemicals were ACS grade. Cellulose membrane with a molecular weight cut off at 12,000–14,000 Da was acquired from Iberlabo (Madrid, Spain). Human skin was obtained from the hospital's plastic surgery department (Hospital de Barcelona, SCIAS, Barcelona, Spain).

The experimental protocol was approved by the Bioethics Committee of the Barcelona-SCIAS Hospital (Spain) and written informed consent forms were provided by study participants.

2.2. Liposome preparation

Liposomes were prepared according to methods published elsewhere [12]. Briefly, chloroform-methanol (2:1, v/v) solution containing the appropriate amount of PC was placed in a glass balloon and dried in a rotary evaporator at room temperature protected from light. The resulting thin film was kept under high vacuum overnight to remove any traces of organic solvent. Multilamellar liposomes were obtained by redispersion of the thin film in 20 mM Hepes, 150 mM NaCl buffer, pH 7.4. Liposomes were extruded consecutively through polycarbonate membranes with a pore size of 400 nm and 100 nm by an Avanti® Mini-extruder (Avanti Polar Lipids Inc., Alabama, USA). PC concentration was determined by the Stewart assay [13]. Final concentration of HA was assessed by HPLC after disruption of liposomes with isopropanol. HA-to-PC ratios fall typically between 0.26 and 0.37 (mol/mol).

PEs were incorporated into the liposomes containing HA with the aim of partially destabilising the lipid bilayer and enhancing its transformation into lipid planar structures. Different concentrations of PEs (0.01–25%, v/v) were added to the liposomes. Based on the average particle size and polydispersity values, two

formulations were prepared by adding extemporaneously the appropriate percentage of the corresponding PE to the liposomes loaded with HA (F1). Thus, 0.15% of Tween® 80 and 3.5% of Transcutol® P were added to liposomes with HA (F1) to obtain the F2 and F3 formulations, respectively.

2.3. Liposome characterisation

2.3.1. Particle size and ζ potential

The mean particle size and polydispersity of liposomes were measured by dynamic light scattering with a Zetasizer Nano S (Malvern Instruments, UK). Electrophoretic mobility indicating the effective surface electrical charge (ζ potential) was determined by a Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, UK). The samples were diluted (50-fold) with Hepes buffer pH 7.4. Each sample was measured three times.

2.3.2. Encapsulation efficiency

The efficiency of encapsulation of HA into liposomes (EE_{HA}) was assessed by determining the free (non-encapsulated) HA (m') after separation of liposomes by Ultracel 10 centrifugal filter devices (Amicon®, Millipore, MA, USA) at $4000 \times g$ for 40 min (Multifuge 3 L-R, Thermo Fisher Scientific, Spain). The amount of HA non encapsulated (m') was determined by HPLC.

Hence, the EE_{HA} was obtained by applying the following equation:

$$EE_{HA} = [(m_t - m')/m_t] \quad (1)$$

where m_t is the total amount of HA added to the sample.

2.4. Human skin preparation

Human skin was obtained from the abdominal region of healthy women. After being frozen to -20°C , it was cut with a dermatome (Model GA 630, Aesculap, Tuttlingen, Germany) into 200, 300 and 400 μm -thick pieces, starting from the SC [14]. Human skin integrity was verified before the experiments by measuring the quantity of water that passes through the epidermal layer of the skin to the surrounding atmosphere by diffusion and evaporation processes [15], using a transepidermal water loss (TEWL) Tewl-meter TM210 (Courage & Khazaka, Koln, Germany). The skin used showed TEWL values below $10 \text{ g/m}^2 \text{ h}$.

2.5. Permeation assays

2.5.1. Permeation of HA through cellulose

The experiments were carried out in vertical Franz-type diffusion cells (Co. Mod Franz Crown Glass, CDCF-9) with a diffusion area of 0.6 cm^2 using cellulose membranes with molecular weight cut off at 12,000–14,000 Da. Experiments were performed under sink conditions to avoid the solubility of HA interfering during *in vitro* release. Briefly, 300 μL of each formulation was placed in the donor compartment. The receptor chamber was filled with milliQ water or buffer, maintained at $32.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ and continuously shaken by a magnetic stirrer. Samples were withdrawn from the receptor compartment at designated time intervals over 5 h and replaced with the same volume of receptor medium immediately after each sample collection. The concentration of released HA was assessed by HPLC.

To describe the kinetics of drug release from liposomes containing HA, different mathematical models were fitted to the experimental data [16]. The cumulative amounts of HA that permeated through the surfaces investigated were adjusted to the model that best fitted our data, a first order release model [17].

$$\%R_t = \%R_\infty(1 - e^{-kt}) \quad (2)$$

where $\%R_t$ is the percentage of drug released at time t , $\%R_\infty$ is the maximum percentage of drug released and k is the release rate constant. Data were analysed using GraphPad prism 3.0 software (Graphpad Software Inc., California, USA) and WinNonlin® professional edition, version 3.3 (Pharsight Corporation, Mountain View, CA).

2.5.2. Ex vivo permeation of HA

The experiments carried out were similar to those carried out with cellulose. Human skin cuts were placed between the receptor and donor compartments, with the dermal side oriented to the receptor medium and the epidermal side in contact with the donor chamber into which the formulations under investigation were loaded.

2.5.3. Determination of the amount of HA retained on the human skin

Formulation remaining on the SC was eliminated with a solution of sodium lauryl sulfate 0.05%, washed with distilled water and blotted dry with filter paper. The permeated area of the human skin was then excised and weighed, and the content of HA was extracted with a solution of ethanol-water (1:1, v/v) using an ultrasonic processor. The resulting HA levels in the solution, expressed as $\text{mg(HA)}/[\text{g(human skin)}/\text{cm}^2]$, were measured by HPLC.

2.6. Quantification of hyaluronic acid

HA content was analysed by HPLC (HP 1100, Chemstations, Agilent Technologies, USA). Samples were injected in a C18 reverse-phase column (Kromasil 100 C18 5 μm , $25 \times 0.46 \text{ cm}^2$). The detection wavelength was set at 195 nm. The composition of the eluent was a mixture of water and acetonitrile (98:2, v/v) and the flow rate was $0.5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. A standard calibration curve ($25\text{--}750 \mu\text{g cm}^{-3}$) was used to measure the HA concentration of the samples and to validate the analytical technique according to international guidelines [18]. The analytical technique validated inter day ($n=5$) was linear ($r=0.999$); it had a relative accuracy error between 3% and 13% with a detection limit of $15.00 \mu\text{g cm}^{-3}$.

2.7. Statistical analysis

Statistical analysis for physical stability was assessed by non-parametric ANOVA tests, followed by Dunn and Tukey's multiple comparison tests for the release and permeation assays, respectively.

2.8. Preparation of surfaces for AFM observations

Cellulose membranes were hydrated using ethanol:Milli-Q water solution (1:1, v/v) and dried under a nitrogen stream. They were immediately attached to a steel disc using a 1 cm^2 square of double-faced commercial Scotch tape. The formulations were then applied to the cellulose and incubated at 37°C for 30 min, before rinsing the cellulose surface gently with buffer and Milli-Q water to eliminate the non-adsorbed liposomes. The membranes were then dried with nitrogen.

Layers of human skin were defrosted at room temperature and immediately glued onto a steel disc with epoxy. Afterwards, the SC was cleaned with ethanol. The formulations were applied onto the SC and incubated at 37°C for 30 min. After this period, the SC was rinsed gently with buffer, Milli-Q water and dried with nitrogen.

2.9. AFM imaging and FV measurements

Samples were directly mounted on top of the AFM scanner and imaged in contact mode in air with TESPA cantilevers (Bruker, AXS

Corporation, Santa Barbara, CA), with a nominal spring constant of 42 nN nm^{-1} . The spring constants of each cantilever were determined using the thermal noise method [19]. Satisfactory matches with the spring constant supplied by the manufacturer were found. Atomic Force Microscopy (AFM) was carried out with a Multimode AFM controlled by Nanoscope V electronics equipped with an "E" scanner ($10 \mu\text{m}$) and images were processed with the NanoScope software (Bruker AXS Corporation, Santa Barbara, CA). FV images of 32×32 force curves were collected using a constant approach and retraction speed of $3 \mu\text{m s}^{-1}$. Temperature and humidity were maintained at 24°C and 60% respectively. Values obtained by AFM force curves were used to calculate adhesion forces (F_{adh}) by applying the following equation

$$F_{\text{adh}} = -k\Delta \quad (3)$$

where k is the cantilever constant and Δ is the deflection of the cantilever.

3. Results

3.1. Solubilisation of liposomes by PEs

In order to gain insight into the mechanism of destabilisation provoked by the PE used, liposome size was monitored as a function of the ratio (mol/mol) between PEs and phospholipids in the sample [20]. Fig. 1 shows that Tween® 80 and Transcutol® P exert opposite effects. The size of liposomes increased in all cases after the addition of each PE. However in samples with Tween® 80 (Fig. 1A) the increase of PEs ratios induced a moderate decrease of the size of the formulations, while for Transcutol® P samples, the increase of PE ratios induced a dramatic increase (Fig. 1B). Since the objective of adding enhancers to the liposomes is not to cause their complete rupture but to destabilise the lipid bilayer, based on the present data, PE/lipid ratios lower than the first experimental data tested were used in the experiments presented below.

3.2. Physical stability studies

The physical stability of liposomes loaded with HA (F1) and the same liposomes supplemented with Tween® 80 and Transcutol® P (F2 and F3, respectively) was monitored over 20 days of storage at 4°C . Table 1 shows that both PEs induced an increase in size after one day of storage. As expected given the amphipathic nature of Tween 80®, and possibly due to its intercalation between the phospholipid bilayer of the liposomes, the size of F2 increased significantly after long periods of 10 and 20 days of storage. Conversely F3, the sample supplemented with Transcutol® P, underwent a slight increase in diameter similar to that shown by the control liposomes. Consistent with this, polydispersity, which ranged from 0.052 to 0.157, increased more dramatically for F2 than for F1 and F3 (data not shown). ζ -potential measurements provide valuable information about formulation stability. F1 is the slightly more stable formulation after one day of storage. Interestingly, according to the ζ -potential values, after 10 days, F2 and F3 became less unstable than the non-supplemented liposomes (F1). Consistent with this, the EE_{HA} value was affected and significant leakage appeared after the first day of storage. In practical terms, in order to avoid interference due to physical instability of the formulations all experiments presented in this paper were carried out using the preparation formed extemporaneously.

3.3. Permeation of HA through cellulose

In vitro permeation profiles for the formulations are shown in Fig. 2 as cumulative drug release over time. As shown, there was

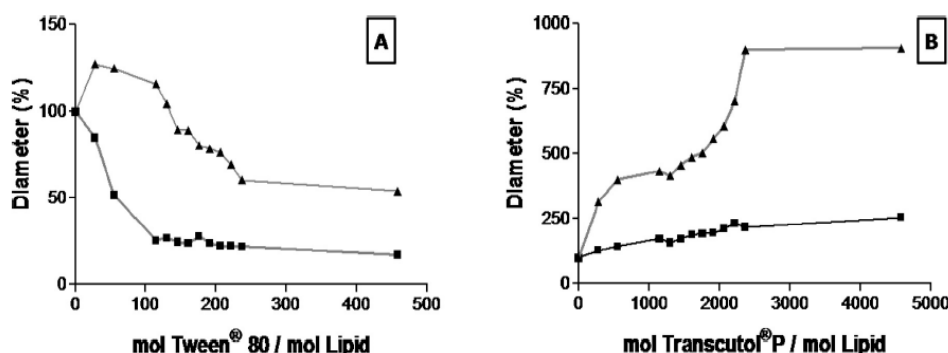


Fig. 1. Effect of the increasing ratios of PEs/lipid (mol/mol) for Tween® 80 (A) and Transcutol® P (B) on mean diameter (%) of unloaded (■) and HA-loaded liposomes (▲).

Table 1

Changes in size, ζ potential and EE for liposomes containing HA: control liposomes (F1), and liposomes supplemented with Tween® 80 (F2) and Transcutol® P (F3). Values are mean value \pm standard deviation ($n=3$).

Formulation	Diameter size (nm)			ζ Potential (mV)			Encapsulation efficiency (%)		
	Day 1	Day 10	Day 20	Day 1	Day 10	Day 20	Day 1	Day 10	Day 20
F1	137.0 \pm 0.8	143 \pm 3	142.1 \pm 1.7	-4.94	-0.08	-0.25	95 \pm 2	92 \pm 4	83 \pm 3
F2	163.6 \pm 1.4	208 \pm 4	193 \pm 4	-0.04	-4.90	-0.15	93 \pm 3	86 \pm 3	73 \pm 2
F3	169.9 \pm 1.7	179.4 \pm 1.9	174.3 \pm 1.7	0.09	-6.97	-3.70	64 \pm 3	63 \pm 2	42 \pm 2

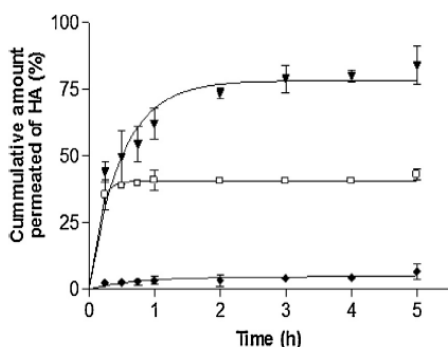


Fig. 2. Release profiles of HA through cellulose membranes of formulations F2 (□) (Tween® 80) and F3 (▼) (Transcutol® P) in comparison to F1 (◆) (control liposomes). Data are mean values \pm standard deviation ($n=6$).

a significant improvement in HA release when supplemented with PEs. Thus, whilst intermediate HA release by F2 was observed, the lowest and highest release values were shown by F1 and F3, respectively. The kinetics of the process, however, was faster for F2 than for F1 and F3 (Table 2).

Table 2

First order released model parameters obtained after fitting to Eq. (2) the permeation data from liposomes with HA (F1) and liposomes supplemented with Tween® 80 (F2) and Transcutol® P (F3).

Formulation	k (h^{-1})		%R _∞	
	Cellulose	Skin	Cellulose	Skin
F1	1.3 \pm 0.5	3.0 \pm 0.3	4.9 \pm 0.6	9.3 \pm 0.2
F2	7.8 \pm 0.8	2.7 \pm 0.2	40.9 \pm 0.4	26.8 \pm 0.4
F3	2.0 \pm 0.3	5.4 \pm 0.11	79 \pm 4	67.7 \pm 0.2

k : release constant; %R_∞: maximum of HA permeated. Values are expressed as mean value \pm standard deviation ($n=6$).

3.4. Ex vivo permeation of HA

The percutaneous transport undergone by the developed formulations was investigated in *ex vivo* experiments using human skin surfaces of different thickness. At a thickness of 400 μ m the formulation supplemented with PEs (F2 and F3) showed more extensive release than control liposomes (Fig. 3). The maximum HA release on this surface was shown by F3, which also showed the highest release constant (Table 2). Regarding the amount of HA retained in the skin (Fig. 3B), F3 showed lower retention than F2 and F1.

In order to investigate how PE-supplemented formulations affect penetration through the human skin, *ex vivo* permeation assays were conducted using skin cuts of different thickness. Fig. 4 shows the amount of HA retained by human skin cuts with a thickness of 200, 300 and 400 μ m. It can be seen that human skin HA retention was relatively similar for F2 and F3 irrespective of the thickness. The retention of HA released from F1 was higher in all cases, and remarkably higher than F2 and F3 for the thinnest human skin cut.

3.5. AFM and FV experiments

Fig. 5 shows the topographic AFM and FV images for cellulose (Fig. 5A and B) and the same surface after applying the three formulations (Fig. 6C–H). The cellulose surface (Fig. 5A) was a featureless flat surface with a mean roughness (R_a) of 3 nm. The FV of cellulose (Fig. 5B) showed a homogeneous distribution of forces with a mean F_{adh} value of 29 \pm 15 nN. When liposomes containing HA (F1) were spread onto cellulose (Fig. 5C), large and diffuse structures were observed, some of which were round in shape with a mean diameter of 165 \pm 20 nm. More importantly, the R_a value increases up to 11 nm and according to the FV measurements, the mean F_{adh} value can be established in 23 \pm 17 nN (Fig. 6D). The application of F2 onto the cellulose did not modify R_a with respect to F1 but led to flattened structures, most likely attributed to liposomes undergoing the process of adsorption, which developed into round objects with a diameter of 300 \pm 80 nm. A similar explanation can be applied to the features observed after the application of F3. In this case, however, the round structures had a mean diameter of 180 \pm 50 nm,

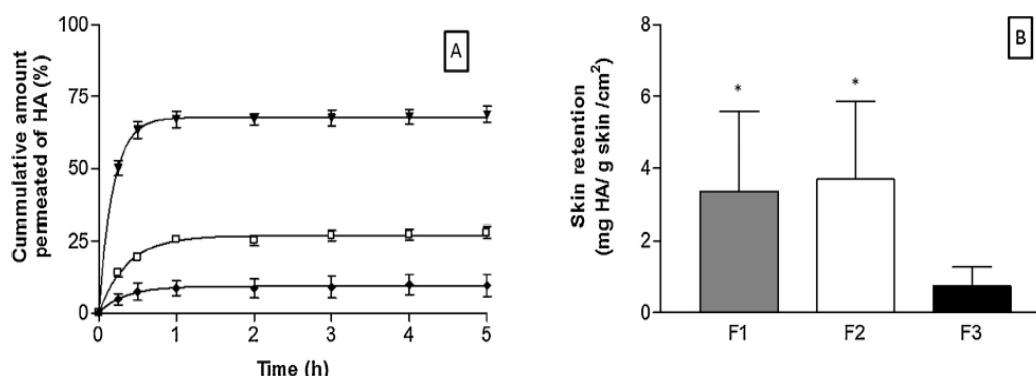


Fig. 3. Release profiles of HA through human skin of formulations F2 (\square) (Tween[®] 80) and F3 (\blacktriangledown) (Transcutol[®] P) in comparison to F1 (\bullet) (control liposomes) (A) and HA retained in the human skin after 5 h (B). Data are mean value \pm standard deviation ($n=6$). (*) Statistically significant differences at $p \leq 0.005$.

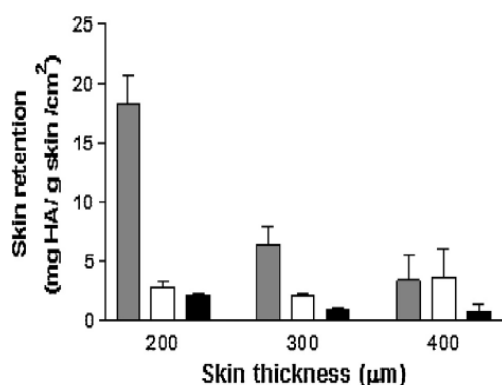


Fig. 4. Amount of HA retained after 5 h in the release assay by human skin of different thickness for liposomes containing HA (F1) (grey), liposomes containing HA supplemented with Tween[®] 80 (F2) (white) and liposomes containing HA supplemented with Transcutol[®] P (F3) (black). Data are mean value \pm standard deviation ($n=6$).

lower than that yielded by F2 and larger than that shown by F1. The F_{adh} values increased from 110 ± 17 nN for F2 up to 240 ± 100 nN for F3.

Fig. 6 shows the topographic AFM and FV images for the SC (Fig. 6A and B) and the same surface after applying the three formulations (Fig. 6C–H). The SC surface was extremely rough, as shown in Fig. 6A. The advantages of resolution in Z-axis provided by the AFM evidences a very irregular surface with different regions, deep valleys, rims, and large step-height differences with an R_a value of 10 nm within these regions. The different regions showed different F_{adh} values that ranged from 60 nN to 230 nN.

After deposition of F1 onto the SC, the surface appeared flattened and R_a declined to 4 nm (Fig. 6C). Small round structures with a mean diameter of 215 nm were observed. Since the liposomes' original diameter, as judged by light scattering, was 137 nm, the AFM structures were likely to be individual flattened vesicles undergoing the process of adsorption that were partially fused onto the SC surface. Some of these round entities seemed to coalesce to form larger structures such as those observed at the top left of Fig. 6C. The F_{adh} on the region covered by the small round structures showed an average value of 300 ± 40 nN (Fig. 6D). A different behaviour was observed when F1 was supplemented with PEs. Fig. 6E is a topographic image of the SC after F2 sample application. The image shows a mean R_a value of 20 nm, with no well-defined geometrical objects but terraces with step-height differences up to 200 nm. FV provided F_{adh} values ranging from 50 to 100 nN (Fig. 6F). After

F3 application rounded structures were also observed with highly variable diameters of 420 ± 130 nm, displaying a R_a mean value of 15 nm (Fig. 6G). In this case F_{adh} ranged from 50 to 100 nN (Fig. 6H).

4. Discussion

This work was designed to determine whether there is a rationale for explaining the increase in drug bioavailability of liposomal formulations for topical applications. We assumed as a working hypothesis that liposomes deliver the encapsulated drug (HA) after partial rupture upon contact with the substrate and adsorption onto the SC. It has been reported that intact liposomes could be squeezed through the complex barriers of the skin [4], but indirect evidence based on the deposition of liposomes onto inorganic surfaces (such as mica, glass or TiO₂) [1,3] and preliminary studies carried out with skin [16,21] suggest that liposomes undergo several processes that result in different structures on specific surfaces. Thus liposomes are firstly adsorbed, remain intact on the surface or become flattened and transformed into planar lipid bilayers, disks or multilayered structures formed by successive deposition of newly arriving vesicles. It is conceivable that the adsorption mechanism of liposomes onto the skin is the driving force of the whole delivery process and a limiting step for HA permeation.

We observed that after deposition of liposomes (F1) onto cellulose (a widely accepted model used to study drug permeation through the skin) several structures formed, most likely attributed to incomplete disruption of the vesicles. Note that, when liposome formulations or lipid-based creams are applied onto the skin, there is normally overdosage, which explains the full coverage of the surface and the variety of objects with undefined morphologies that we observed by AFM.

The SC was even rougher than the cellulose surface, showing valleys, platforms and deep rims that did not follow any pattern. Therefore, when liposome formulations designed for topical and transdermal purposes are spread onto the SC, different rupture pathways may lead to the formation of planar lipid bilayers, multilayers and vesicle overlayers that fill the clefts and deep rims shown by the SC.

It is known that transport of drugs through the skin can be enhanced by the use of PEs and, to test this effect, we used two different molecules, the non-ionic surfactant Tween[®] 80 and Transcutol[®] P, a solubilising agent that is able to mix with polar and non-polar solvents. Our release experiments performed on cellulose and skin showed that Transcutol[®] P and Tween[®] 80 both enhanced the permeation of the encapsulated drug, HA. These behaviours are likely related to the larger average diameters and

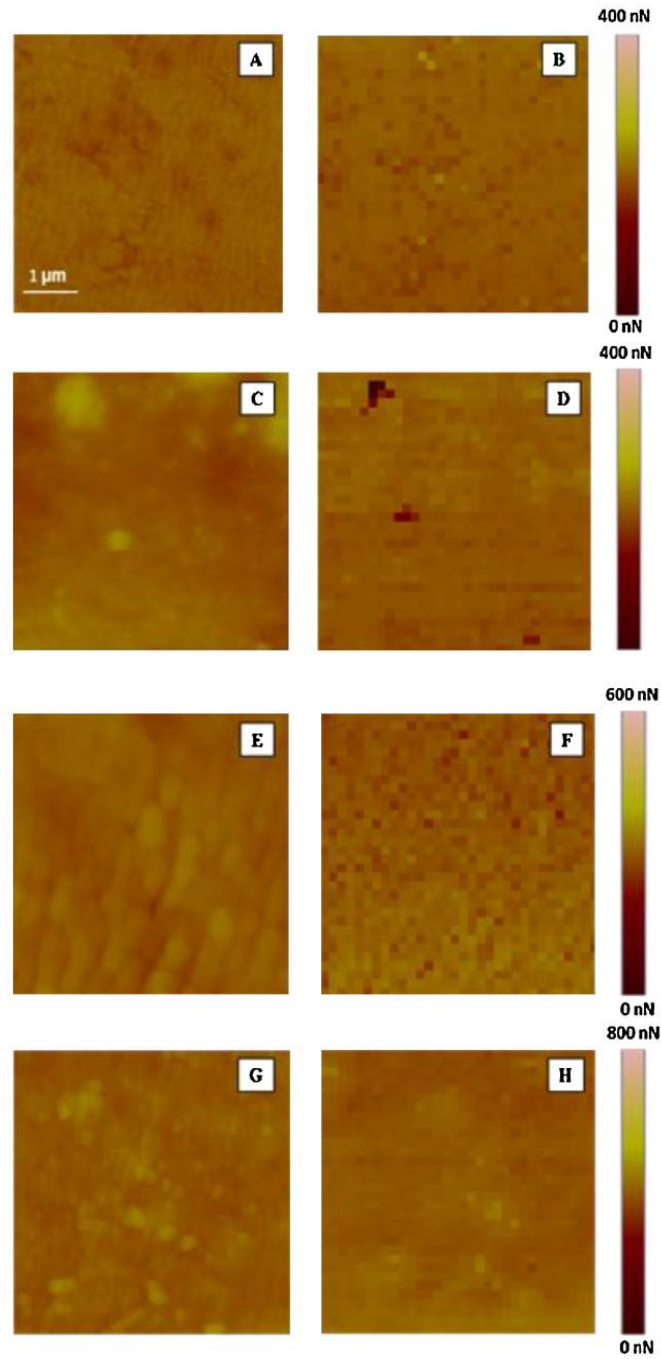


Fig. 5. AFM height (left panels) and force volume (right panels) images for cellulose (A, B), liposomes containing HA (F1) (C, D), and liposomes supplemented with Tween® 80 (F2) (E, F) and with Transcutol® P (F3) (G, H). Z height scale is 300 nm (A, D) and 200 nm (E, H).

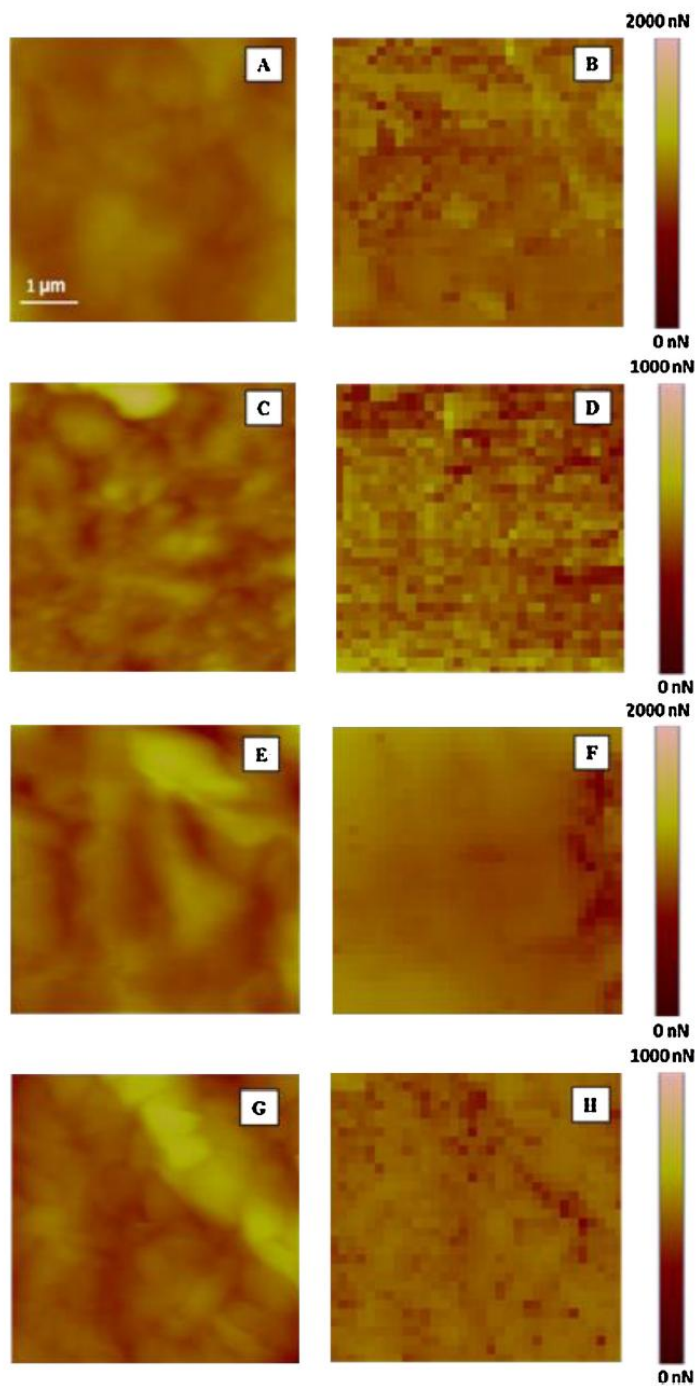


Fig. 6. AFM height (left panels) and force volume (right panels) images for SC (A, B), liposomes containing HA (F1) (C, D), and liposomes supplemented with Tween® 80 (F2) (E, F) and with Transcutol® P (F3) (G, H). Z height scale is 300 nm (A, C) and 200 nm (E, G).

multilayered structures that result from the action of PEs on liposomes and that we observed by AFM.

In vitro and *ex vivo* permeation studies, as well as the quantitative determination of minimum amounts of HA retained by human skin, appear to be related: (i) with the destabilisation effect of these PEs on liposomes (see physical stability studies); and (ii) with a possible interaction of PEs with the SC components [22]. This leads to the disruption of the vesicular structure by formation of mixed micelles with the phospholipids used to form the liposomes [23–25]. In principle, both PEs at their working concentrations induced moderate increases in the size of the liposomes that were observed by AFM. In fact, the adsorption of vesicles onto a surface is governed by the balance between the adhesion energy and the bending energy of the bilayer [1]. Thus, the increase in the diameter of the liposomes following the addition of PEs reduces the bending modulus of the bilayer and consequently, liposome adsorption becomes mainly dependent on the adhesion energy.

The release studies using cellulose and skin shared similar trends: (i) the addition of PEs (F2 and F3) to the base formulation (F1) enhanced the permeation of HA through both substrates; (ii) F3 showed the maximum release of HA; and (iii) the permeation process followed a first order kinetics. Since, according to diameter variations, the destabilisation promoted by the PEs was qualitatively similar for F2 and F3, these experiments point to the involvement of the surface substrate on adsorption and release of the drug from the formulations. As F1 (liposomes not supplemented with PEs) showed slightly higher release in human skin than in cellulose, it is possible that the interaction of the phospholipids from liposomes with phospholipids of the SC could be involved in the destabilisation mechanism [26]. In this regard, there is evidence that HA may interact with lipids in the SC, forming filamentary structures surrounded by phospholipid molecules [27] that may diffuse through the epidermis and/or dermis [28]. This effect would depend on the release of HA from liposomes and according to k values (the release constant) it was higher for F3 than for F2. In part these behaviours could be inferred from the permeation studies performed with human skin of different thickness.

Since the release of HA from liposomes and the transport mechanism itself appear related to the mechanism of liposome disruption and, particularly, with adsorption onto the surfaces under investigation, we used AFM-FV mode to gain an insight into the properties of the structures occurring after formulation deposition onto cellulose and SC. We observed differences between the structures adopted and the adhesion forces presented by the formulations deposited onto cellulose or onto SC. However, although cellulose is commonly used as a model to test drug permeation, our AFM data suggest that this substrate does not fully mimic the physicochemical properties of the SC. Thus, FV topographic images of cellulose and SC showed differences in their mean F_{adh} values, being higher (more than twofold) for the SC in comparison with cellulose. It is also worth mentioning here that cellulose is a hydrophilic membrane that contains small pores. Thus when formulations are applied onto cellulose, samples become hydrated by capillarity. This phenomenon cannot occur on SC, and could enhance the lateral mobility of the lipid molecules by modifying their adhesion to the AFM tip. Although F_{adh} values can be dramatically affected by other factors, such as area of contact and tip characteristics, it is clear that the nature of the substrate affects the adhesion of the formulations.

From the analysis of the AFM images it is clear that the transformation of liposomes into planar bilayers, multilayers or disks was not complete either after deposition of formulations onto cellulose or after deposition onto SC. Liposomes with Transcutol® P (F3) appeared to undergo partial rupture onto cellulose leaving spherical entities of smaller size than those left by liposomes supplemented with Tween® 80 (F2). Conversely F3 deposited onto SC yielded entities with larger diameters than F2. These observations

reflect clearly the influence of the substrate on the structures adopted by the formulations at the interface. On the one hand the mean F_{adh} was higher for F3 than for F2. On the other hand F_{adh} values for F3 were significantly smaller than those from liposomes in F1. This is somehow correlated with the lower release of HA shown by F1 and the highest release from F3. Hence, whether or not there is an apparent increase in the release concomitant with the decrease in adhesion forces, it is conceivable that HA diffuses from the supported layers and hemifused liposomes into the SC.

5. Conclusions

When liposomes are deposited onto organic surfaces (cellulose) or biointerfaces (skin) they become partially disrupted, flattened and transformed to some extent into planar lipid bilayers. PEs have a definite effect on this process, which seems governed primarily by the interaction between the liposome formulations and the nature of the surfaces. It is already known that release of drugs from liposomes is enhanced by the incorporation of PEs in the formulation. However, our AFM and FV measurements lead us to conclude that the adhesion forces, among other factors such as the interfacial tension, may be behind the complex mechanism of permeation through the skin.

Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest.

Acknowledgements

M.L. Vázquez-González acknowledges a fellowship from CONA-CyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México). We are grateful to the University of Barcelona (ARZ00F01) for financial support.

References

- [1] R.P. Richter, R. Bérat, A.R. Brisson, Formation of solid-supported lipid bilayers: an integrated view, *Langmuir* 22 (2006) 3497–3505.
- [2] L. Picas, P.E. Milhiet, J. Hernandez-Borrell, Atomic force microscopy: a versatile tool to probe the physical and chemical properties of supported membranes at the nanoscale, *Chem. Phys. Lipids* 165 (2012) 845–860.
- [3] R. Richter, A. Mukhopadhyay, A. Brisson, Pathways of lipid vesicle deposition on solid surfaces: a combined QCM-D and AFM study, *Biophys. J.* 85 (2003) 3035–3047.
- [4] G.M. El Maghraby, B.W. Barry, A.C. Williams, Liposomes and skin: from drug delivery to model membranes, *Eur. J. Pharm. Sci.* 34 (2008) 203–222.
- [5] L. Wiest, M. Kerscher, Native hyaluronic acid in dermatology – results of an expert meeting, *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* 6 (2008) 176–180.
- [6] T.C. Laurent, in: E.A. Balazs (Ed.), *Chemistry and Molecular Biology of the Inter-cellular Matrix*, Academic, New York, 1970, pp. 703–732.
- [7] J. Voigt, V.R. Driver, Hyaluronic acid derivatives and their healing effect on burns, epithelial surgical wounds, and chronic wounds: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials, *Wound Repair Regen.* 20 (2012) 317–331.
- [8] K.G. Harding, H.L. Morris, G.K. Patel, Science, medicine and the future: healing chronic wounds, *BMJ* 324 (2002) 160–163.
- [9] B. Bhushan, Nanotribological and nanomechanical properties of skin with and without cream treatment using atomic force microscopy and nanoindentation, *J. Colloid Interface Sci.* 367 (2012) 1–33.
- [10] S. Chen, B. Bhushan, Nanomechanical and nanotribological characterization of two synthetic skins with and without skin cream treatment using atomic force microscopy, *J. Colloid Interface Sci.* 398 (2013) 247–254.
- [11] W. Tang, B. Bhushan, Adhesion, friction and wear characterization of skin and skin cream using atomic force microscope, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 76 (2010) 1–15.
- [12] C. Suárez-Germà, L.M. Loura, M. Prieto, Ò. Domènech, M.T. Montero, A. Rodríguez-Banqueri, J.L. Vázquez Ibar, J. Hernandez-Borrell, Membrane protein-lipid selectivity: enhancing sensitivity for modeling FRET data, *J. Phys. Chem.* 116 (2012) 2438–2445.
- [13] J.C. Stewart, Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferri-thiocyanate, *Anal. Biochem.* 104 (1980) 10–14.
- [14] OECD, Guideline for the Testing Chemicals Skin Absorption: In vitro Method, 2004, pp. 428.

- [15] A. Nangia, B. Berner, H.I. Maibach, Transepidermal water loss measurements for assessing skin barrier functions during in vitro percutaneous absorption studies, in: R.L. Bronaugh, H.I. Maibach (Eds.), *Percutaneous Absorption Drugs, Cosmetics, Mechanisms Methodology*, Marcel Dekker Inc, New York, 2005, pp. 587–594.
- [16] M.L. Vázquez-González, R. Bernad, A.C. Calpena, Ò. Domènech, M.T. Montero, J. Hernández-Borrell, Improving ex vivo skin permeation of non-steroidal anti-inflammatory drugs: enhancing extemporaneous transformation of liposomes into planar lipid bilayers, *Int. J. Pharm.* 461 (2013) 427–436.
- [17] R. Mafalda, A.C. Calpena, D.B. Amabilino, D. Ramos-Lopez, J. de Lapuente, L. Pérez-García, Water-soluble gold nanoparticles based on imidazolium gemini amphiphiles incorporating piroxicam, *RSC Adv.* 4 (2014) 9279–9287.
- [18] EMEA, EMA, Guideline on Validation of Bioanalytical Methods, 2011.
- [19] L. Picas, C. Suárez-Germà, M. Teresa Montero, J. Hernández-Borrell, Force spectroscopy study of Langmuir–Blodgett asymmetric bilayers of phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol, *J. Phys. Chem. B* 114 (2010) 3543–3549.
- [20] A. de la Maza, J.L. Parra, Solubilizing effects caused by the nonionic surfactant dodecylmaltoside in phosphatidylcholine liposomes, *Biophys. J.* 72 (1997) 1668–1675.
- [21] C.A. Grant, P.C. Twigg, D.J. Tobin, Static and dynamic nanomechanical properties of human skin tissue using atomic force microscopy: effect of scarring in the upper dermis, *Acta Biomater.* 8 (2012) 4123–4129.
- [22] H.E. Hofland, J.A. Bouwstra, H.E. Boddé, F. Spies, H.E. Junginger, Interactions between liposomes and human stratum corneum in vitro: freeze fracture electron microscopical visualization and small angle X-ray scattering studies, *Br. J. Dermatol.* 132 (1995) 853–866.
- [23] S.I. Simões, J.M. Tapadas, C.M. Marques, M.E.M. Cruz, M.B.F. Martins, G. Cevc, Permeabilisation and solubilisation of soybean phosphatidylcholine bilayer vesicles, as membrane models, by polysorbate, Tween 80, *Eur. J. Pharm. Sci.* 26 (2005) 307–317.
- [24] M. Manconi, C. Caddeo, C. Sinico, D. Valenti, M.C. Mostallino, G. Biggio, et al., Ex vivo skin delivery of diclofenac by transcutol containing liposomes and suggested mechanism of vesicle–skin interaction, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 78 (2011) 27–35.
- [25] E.L. Romero, M.J. Morilla, Highly deformable and highly fluid vesicles as potential drug delivery systems: theoretical and practical considerations, *Int. J. Nanomed.* 8 (2013) 3171–3186.
- [26] M. Schaller, H.C. Korting, Interaction of liposomes with human skin: the role of the stratum corneum, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 18 (1996) 303–309.
- [27] I. Pasquali-Ronchetti, D. Quaglino, G. Mori, B. Bacchelli, P. Ghosh, Hyaluronan–phospholipid interactions, *J. Struct. Biol.* 120 (1997) 1–10.
- [28] M.L. Crichton, B.C. Donose, X. Chen, A.P. Raphael, H. Huang, M.A. Kendall, The viscoelastic, hyperelastic and scale dependent behaviour of freshly excised individual skin layers, *Biomaterials* 32 (2011) 4670–4681.

3.3 Desarrollo de una composición lipídica biomimética con la piel para mejorar la liberación de fármacos en función de parámetros termodinámicos

Monolayer study of the main components of the *stratum corneum* to develop liposomes for Transdermal Drug Delivery

Vázquez-González, Martha L., Calpena, Ana C., Domènech, Oscar,
Montero, M. T., Hernández-Borrell, Jordi
Enviado a *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*

RESUMEN

Las ceramidas (Cer) y el colesterol (Chol) son los principales componentes del estrato córneo. Adicionalmente, la fosfatidilcolina(PC) es una de las sustancias más comúnmente utilizadas para el desarrollo de liposomas para la administración transdérmica de fármacos. En esta contribución, a partir de los principales compuestos que se encuentran en el estrato córneo y la fosfatidilcolina, se realizaron mezclas con diferentes fracciones molares. Utilizando la balanza de Langmuir, se llevaron a cabo estudios de monocapas con el fin de obtener la mezcla ternaria más estable (PC- Chol - Cer), de acuerdo con sus propiedades termodinámicas. Se estudiaron las mezclas binarias PC-Chol, PC-Cer, Chol-Cery la mezcla ternaria fue obtenida a partir de la mezcla PC- Chol (0.6:0.4, mol:mol) en combinación con Cer.

Las monocapas más estables (binarias y ternaria), se depositaron sobre mica para observar su interacción por medio del microscopio de fuerza atómica (AFM).

Esta es una primera aproximación para desarrollar formulaciones de liposomas mimetizando la composición del estrato corneo. Estas formulaciones se utilizarán para encapsular diferentes moléculas de interés farmacéutico por vía tópica.

A pesar de que muchos estudios han utilizado la estrategia de imitar el estrato córneo para diseñar sistemas de liberación transdérmica de fármacos, no hay estudios que hayan diseñado una formulación racional según las magnitudes termodinámicas derivadas del análisis de las interacciones que ocurren en monocapas de los lípidos componentes.

Aspectos relevantes en este estudio

A partir de las mezclas binarias PC-Chol, PC-Cer, Chol-Cery la mezcla ternaria PC-Chol-Cer, se observaron los siguientes aspectos:

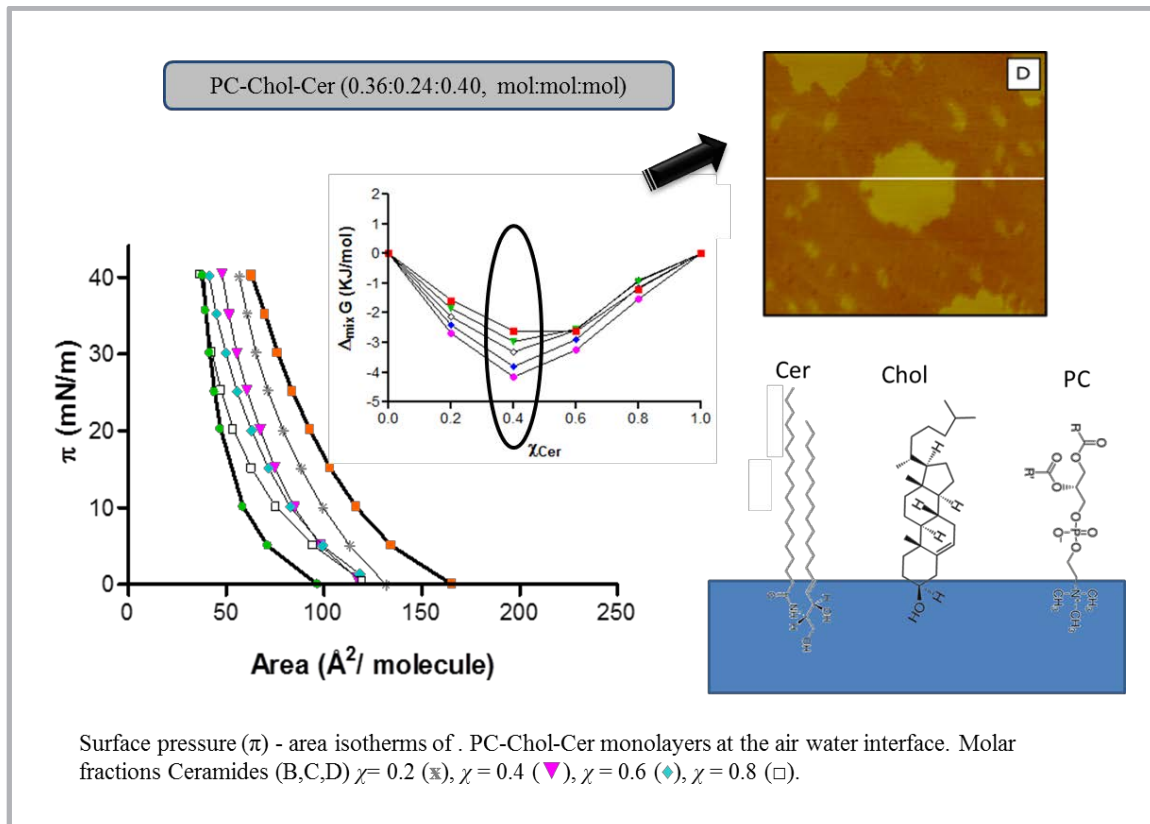
- a) Las composiciones de las mezclas binarias más estables, de acuerdo con los valores calculados de la energía de Gibbs fueron: PC-Chol (0.6:0.4, mol:mol),

PC-Cer (0.2:0.8, mol:mol), Chol/Cer (0.6:0.4,mol:mol),PC-Chol-Cer (0.36:0.24:0.40, mol:mol:mol).

- b) Las imágenes obtenidas de las monocapas extraídas por medio del AFM, muestran la formación de dominios en las mezclas estudiadas.
- c) El potencial de superficie indica que no existe interacciones iónicas entre las mezclas y la subfase (solución buffer KH_2PO_4 0.2 M pH 7.4).

RESUMEN GRAFICO

A partir de la mezcla más estable PC-Chol se adicionan diferentes proporciones de ceramidas para obtener la mezcla ternaria más estable. Las monocapas de las mezclas más estables fueron observadas por el AFM.



Monolayer study of the main components of the *stratum corneum* to develop liposomes for Transdermal Drug Delivery

Martha L. Vázquez-González¹, Ana C. Calpena^{2,3}, Òscar Domènech^{1,3}, M. Teresa Montero^{1,3}, Jordi H. Borrell^{1,3*}

¹Departament de Fisicoquímica and ²Unitat de Farmàcia i Farmacocinètica

Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, ³Institut de Nanociència i Nanotecnologia (IN²UB)

Av. Joan XXIII, 08028 Barcelona, Spain

Abstract

Ceramides (Cer) and cholesterol (Chol) are the main components of the *stratum corneum* (SC). Additionally, phosphatidylcholine (PC) is one of the most common substances used for the development of liposomes for transdermal drug delivery (TDD). In this contribution, monolayer studies were conducted in order to obtain the most stable ternary mixture (PC-Chol-Cer) according to their thermodynamic properties. The mixed monolayers were deposited onto the mica to observe the interaction of these three substances by means of the atomic force microscope (AFM).

This is a preliminary approach to develop liposomal formulations for TDD mimicking the SC composition. These formulations will be used to encapsulate different molecules for skin application.

Even though many studies have used the strategy to mimic the SC to design TDD, there are no studies attempting to design a rational formulation according to the thermodynamic parameters.

1. Introduction

Human skin protects the body against external noxious agents as chemical, microbiological, or physical. The tissue is formed by different layers, the main layers from outside to inside involve epidermis, dermis and hypodermis.

In the epidermis, the outermost layer is *stratum corneum* (SC) comprises corneocytes embedded in an intercellular lipid matrix. The composition of SC lipids consisting approximately of an equimolar mixture of ceramides (45-50 % by weight), cholesterol (25%), and free fatty acids (10-15%) [1], other lipid classes as cholesterol sulphate, glucosylceramides and cholesterol ester are also present [2]. The lipid organization is considered very relevant for the skin barrier function.

For the development of transdermal drug delivery systems the knowledge of the stratum corneum is essential, due to the SC is the main barrier to the transdermal permeation of most substances[1].

Phospholipids are the mainly components of the membranes in animals, however in the SC is only present in traces. For the development of liposomes as transdermal drug delivery systems (TDDs), PC is one of the substances most used. It has been suggested that phospholipids acts as penetration enhancer(PE), due to their ability to destabilize the lipid matrix.

Langmuir-Blodgett lipid monolayers are considered an excellent model system for the study of biological membranes. Although the composition and arrangement of the components of SC is still on investigation, several studies published reveal that the intercellular SC lipid domains consist mainly of ceramides (Cer), Cholesterol (Chol) and saturated long chain free fatty acids (FFAs)[3].

In the stratum corneum 11 types of ceramides have been identified [4].

In this study the main components of the stratum corneum were used to the aim to develop liposomal formulations to mimic the structure of the SC and to study the advantages to mimic the SC in TDDs. To this end, ceramides, cholesterol and PC (main component to prepare liposomes for transdermal drug delivery) were mixed in binary systems, letting 3 binary mixtures and one ternary system, obtained from the most stable composition of the binary mixtures and adding ceramides.

This study is a preliminary approach to develop liposomes able to enhance the delivery of drugs through the skin.

Even though many studies has used the strategy to mimic the SC to design transdermal delivery formulations, there is no studies attempting to design a rational formulation according the thermodynamic parameters of the main components of the SC[5–7].

2. Experimental section

2.1. Materials

L- α Phosphatidylcholine (PC) (egg yolk, 99% purity), Ceramide (bovine spinal cord $\geq 98\%$), sodium hydroxide were purchased from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA). Cholesterol (ovine wool $>98\%$) was purchased from Avanti Polar Lipid Inc. (Alabaster, AL). Methanol, chloroform and monophosphate potassium were purchased from Panreac (Barcelona, Spain). The buffer used as a subphase was KH_2PO_4 0.2 M pH 7.4 prepared in Ultrapurewater (Milli Q reverse osmosis system, 18.3 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ resistivity).

2.2. Monolayer Studies.

The experiments were carried out as described in previous papers. [8,9]. The lipid was dissolved in chloroform-methanol (2:1, v/v) to a final concentration of $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

The monolayers were prepared in a 312 DMC Langmuir–Blodgett trough manufactured by NIMA Technology Ltd. (Coventry, England). The trough was enclosed in an environmental chamber. The resolution of surface pressure measurement was $\pm 0.1 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. In all experiments, the temperature was maintained at $24.0 \pm 0.2 \text{ }^\circ\text{C}$ by means of an external circulating water bath.

Surface pressure (π)-area isotherms of the monolayers at four different compositions PC-Chol (0.6:0.4, mol:mol), PC-Cer (0.2:0.8, mol:mol), Chol/Cer (0.6:0.4, mol:mol), PC-Chol-Cer (0.36:0.24:0.40, mol:mol:mol) were obtained.

Monolayers were spread by depositing a volume of about 5-10 μL of the stock solution onto the buffer solution subphase ($24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) with a Hamilton microsyringe. After 15 min for solvent evaporation, the monolayers were compressed at a constant rate of $20 \text{ mm}^2\text{s}^{-1}$. The compression speed and the time allowed before compression were maintained constant in all experiments.

The interaction between two components (i.e. PC and Chol) in a mixed monolayer can be evaluated from the calculation of the excess Gibbs energy (G^E)[10] which is given by the following equation:

$$G^E = \int_0^\pi [A_{12} - (\chi_1 A_1 + \chi_2 A_2)] d\pi \quad (1)$$

where A_{12} is the average molecular area in the binary mixture, A_1 and A_2 are the molecular areas of pure monolayers of components 1 and 2, respectively, and χ_1 and χ_2 are their corresponding mole fractions in the mixed monolayers.

The Gibbs energy of mixing is given by

$$\Delta_{mix}G = \Delta_{mix}G^{id} + G^E \quad (2)$$

where the first term, the ideal Gibbs energy of mixing ($\Delta_{mix}G^{id}$), can be calculated by applying the following equation:

$$\Delta_{mix}G^{id} = RT (\chi_1 \ln \chi_1 + \chi_2 \ln \chi_2) \quad (3)$$

where R is the gas constant and T is the temperature.

Compressibility modulus (C_s) values at different surface pressure (π) for mixtures were calculated from the equation:

$$C_s = - \frac{1}{A} \times \frac{\partial A}{\partial \pi} \quad (4)$$

LB films for AFM observations were transferred onto freshly cleaved mica, lifting the substrate at a constant rate of $1 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$ at $20 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$.

2.3. Atomic Force Microscopy.

Atomic Force Microscopy (AFM) was carried out with a Multimode AFM controlled by Nanoscope V electronics equipped with an “E” scanner ($10 \text{ } \mu\text{m}$) and images were processed with the NanoScope software (Bruker AXS Corporation, Santa Barbara, CA). Environment was maintained at $24 \text{ }^\circ\text{C}$ and 60% of humidity.

Samples were directly mounted on top of the AFM scanner and imaged in contact mode in air with a silicon cantilever and a nominal spring constant of $3 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$.

3. Results and discussions

Some of the main components of the *SC* were using in this study to mimic the intercellular matrix of the *SC* and design in base of their thermodynamic stability, the best option to formulate liposomes to enhance drug delivery through the skin.

In order to have better observations of the isotherms, the values was plotted till $40 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. The isotherm lift-off areas were affected by monolayer compositions.

In Figure 1 (A-D) are depicted the isotherms obtained for pure components used in this study and their mixtures for various mole fractions (χ). Excepting mixture of Chol-Cer, mixed isotherms lie in-between those of pure components.

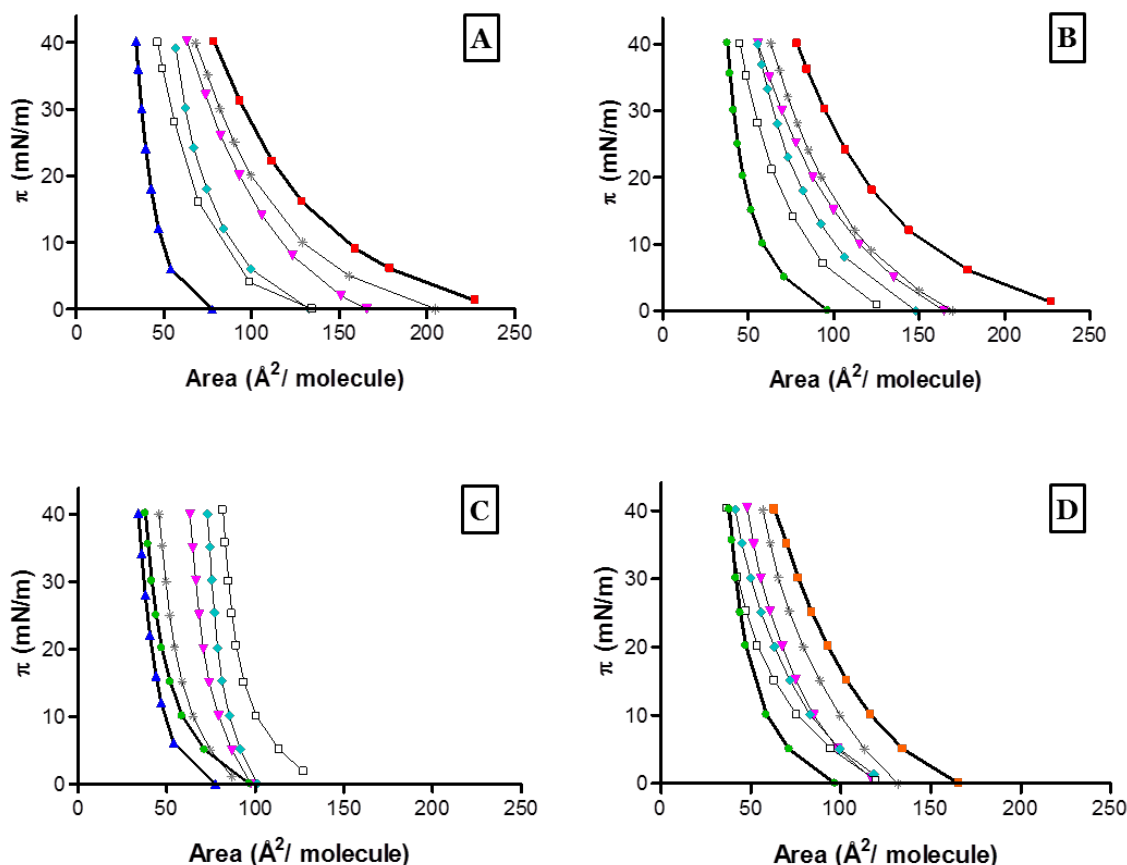


Figure 1. Surface pressure (π) - area isotherms of pure and mixed monolayers at the air water interface. PC (■), Chol (▲), Cer (●), PC-Chol (■). PC/Chol (A), PC/Cer (B), Chol/Cer (C), PC-Chol-Cer (D). Molar fractions of Cholesterol (A) and Ceramides (B,C,D) $\chi=0.2$ (x), $\chi=0.4$ (v), $\chi=0.6$ (d), $\chi=0.8$ (□).

In the PC monolayer (Figure 1A), the addition of Chol slightly modifies the shape, but shift toward smaller areas. The same behaviour was observed in the mixture of PC-Cer (Figure 1B) when the addition of Cer to the PC monolayer. Relating to Chol-Cer mixture (Figure 1C), the isotherms exhibit opposite behaviour comparing with the rest of the binary mixtures studied, the addition of Cer to the Chol monolayers shift toward bigger areas and the shape were modified.

Ternary mixture was building, with the most stable PC-Chol composition, according $\Delta_{\text{mix}}G$ values and adding Cer. For these mixture (Figure 1D), with the addition of Cer to PC-Chol (0.6:0.4, mol:mol) monolayer, the isotherms shift toward smaller areas and their shapes were slightly modified.

The surface pressure-area isotherms of the pure PC, Chol, Cer, binary mixture PC-Chol(0.6:0.4, mol:mol) and ternary mixture PC-Chol-Cer(0.36:0.24:0.40, mol:mol:mol) monolayers are depicted in Figure 2.

The characteristics of the pure molecules isotherms obtained are quite similar with those reported elsewhere [11,12] observing differences that could be occur due to the experimental conditions of the assays as subphase, pH, and compression speed.

The isotherms of the binary and ternary mixtures were found to lie between the ranges of those of the pure components. The binary mixture PC-Chol showed a bigger area per molecule comparing with the mixture of PC-Chol-Cer due to their content of PC is higher.

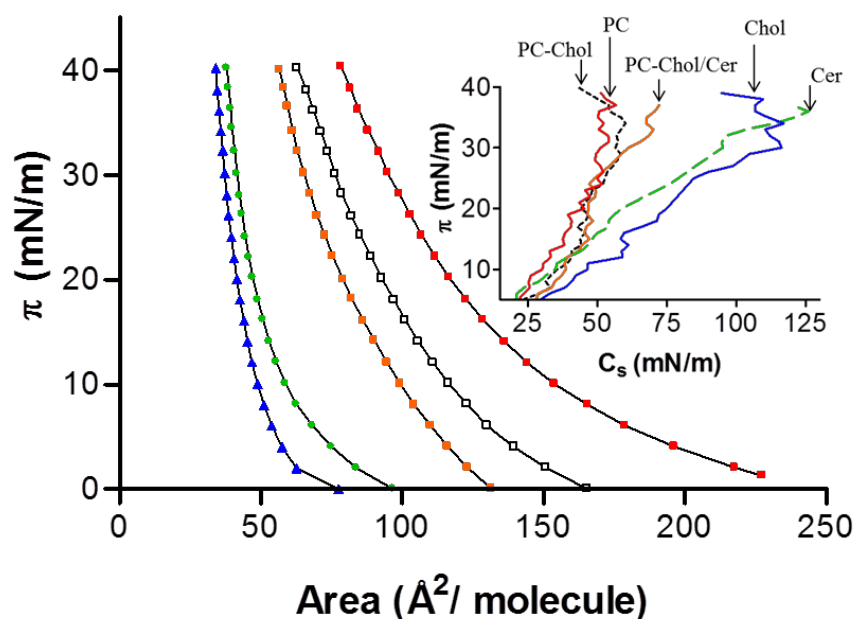


Figure 2. Surface pressure (π) - area isotherms for PC (■), Chol (▲), Cer (●), PC/Chol (0.6:0.4, mol:mol) (□), PC-Chol-Cer (0.36:0.24:0.40, mol:mol:mol) (■) monolayers at the air/water interface. INSET: Compressibility modulus of the five monolayers.

Compressibility modulus (C_s) for the systems studied was calculated from eq.4, results are depicted in the inset of Figure 2.

C_s gives information about lateral compression of the monolayer. High C_s values indicates higher stiffness of the monolayer, thus is more difficult to compress it.

At the temperature of these experiments all monolayers exhibited a liquid-expanded phase [13]. Results observed in compressibility modulus of the systems studied are in concordance with the outcome from isotherms.

As it can be seen, PC monolayer displays lower C_s values, whereas Cer and Chol exhibit higher values. On the other hand, binary and ternary mixtures presented similar mechanical compressibility with PC, as reflected by the C_s values.

Compressibility modulus was calculated for the all mixtures studied in their different molar ratios used in the Langmuir–Blodgett studies (Supplementary data).

According to the values observed, incorporation of Chol and Cer do not modify the elasticity of the monolayers of PC, neither to the mixture of PC-Chol. However, when the system is formed by Cer and Chol, the monolayers exhibit higher interfacial

stiffness, specifically in the molar fractions of $\chi_{\text{Cer}}=0.6$ and 0.8 , which their values (up to 250 mN/m) indicates solid state. These measurements are in agreement with those reported elsewhere [2,14].

Monolayers of the systems studied were evaluated by their Gibbs energy values ($\Delta_{\text{mix}}G$) were calculating from eq. 2. The more negative value of $\Delta_{\text{mix}}G$ is the more stable monolayer. Taking this into account, ternary mixture was constructed from PC-Chol(0.6:0.4, mol:mol) adding various fraction mol of Cer from 0.2 to 0.8 .

Figure 3 (A-D) shows the compositions dependence of the excess energy of mixing for all the investigated systems. Values of $\Delta_{\text{mix}}G$ have been plotted as a function of the cholesterol mole fraction (Figure 3A) or ceramides mole fraction (Figure 3B-D).

For PC-containing mixtures (Figure 3A-D) in the whole range of surface pressures, the stabilization of mixed films for all compositions was reflected by their negative $\Delta_{\text{mix}}G$ values, excepting PC with $\chi_{\text{chol}}=0.8$ which positive values indicate instability.

From Chol-Cer mixture (Figure 3C), the behaviour of the $\Delta_{\text{mix}}G$ values were different, negative values were only observed at low surface pressure (5 or 10 MN/m) and increasing Cer contents $\Delta_{\text{mix}}G$ values increased importantly, with a pronounced maximum at $\chi_{\text{cer}}=0.8$, suggesting instability of monolayers.

According to $\Delta_{\text{mix}}G$ values, for PC-Chol mixture (Figure 3A), minimum value is reached in $\chi_{\text{chol}}=0.4$, for mixture formed by PC-Cer (Figure 3B) in $\chi_{\text{cer}}=0.2$ and for the ternary mixture PC-Chol-Cer (Figure 3D) the minimal value is observed in the molar fraction of $\chi_{\text{cer}}=0.4$.

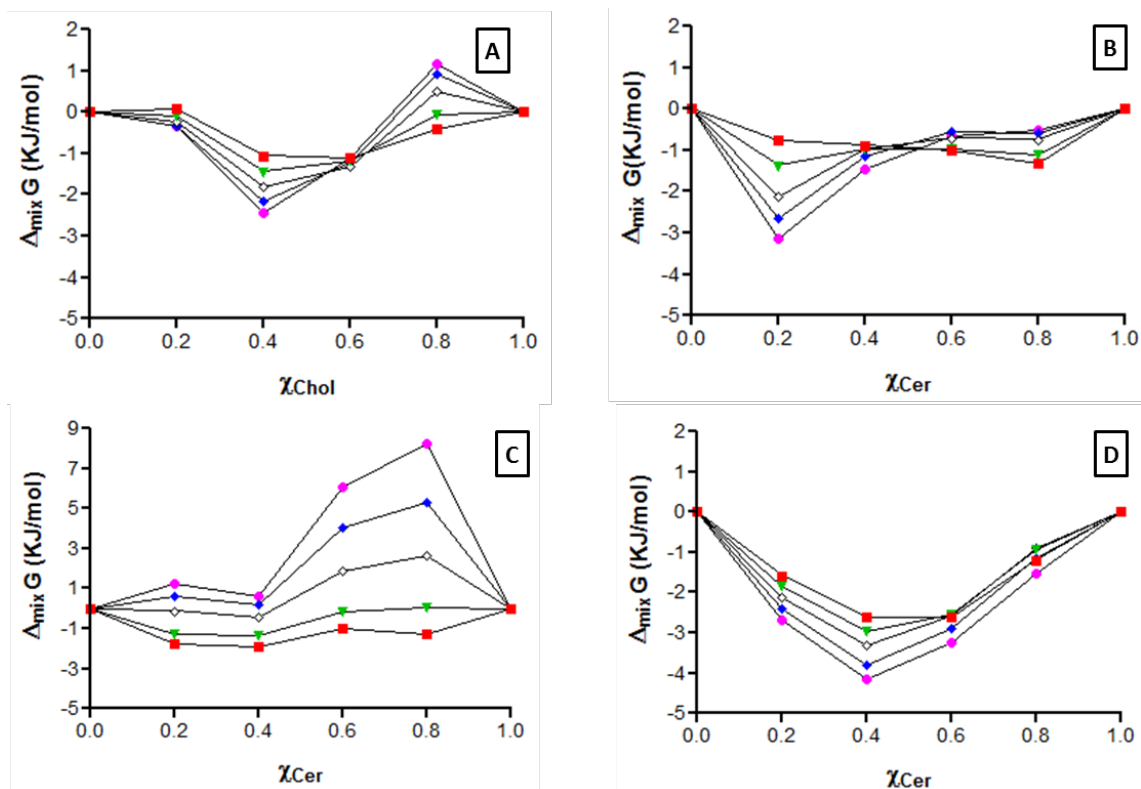


Figure 3. Gibbs energy of mixing values of PC/Chol (A), PC/Cer (B), Chol/Cer (C), PC-Chol/Cer (D) at different surface pressures 5 (■), 10 (▼), 20 (◇), 30 (◆), 40 (●)

Stronger interactions of the compounds used in this study were observed in the ternary mixture, where lowest $\Delta_{\text{mix}}G$ were acquired. The composition more stable is nearly to the *stratum corneum* composition according to Chol and Cer content[1].

To perform topographic characterization, the mixtures studied were transferred onto a mica substrate at surface pressure of $20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, and imaged with AFM incontact mode. The AFM images of PC-Chol (0.6:0.4, mol:mol), PC-Cer(0.8:0.2,mol:mol), Chol-Cer(0.6:0.4,mol:mol), PC-Chol-Cer (0.36:0.24:0.40,mol:mol:mol) are shown in Figure 5 (A-D), respectively.

All images from the system studied exhibit coexistence of two phases. This fact is in agreement with the observations using confocal fluorescence of skin *SC* lipid membranes [15].

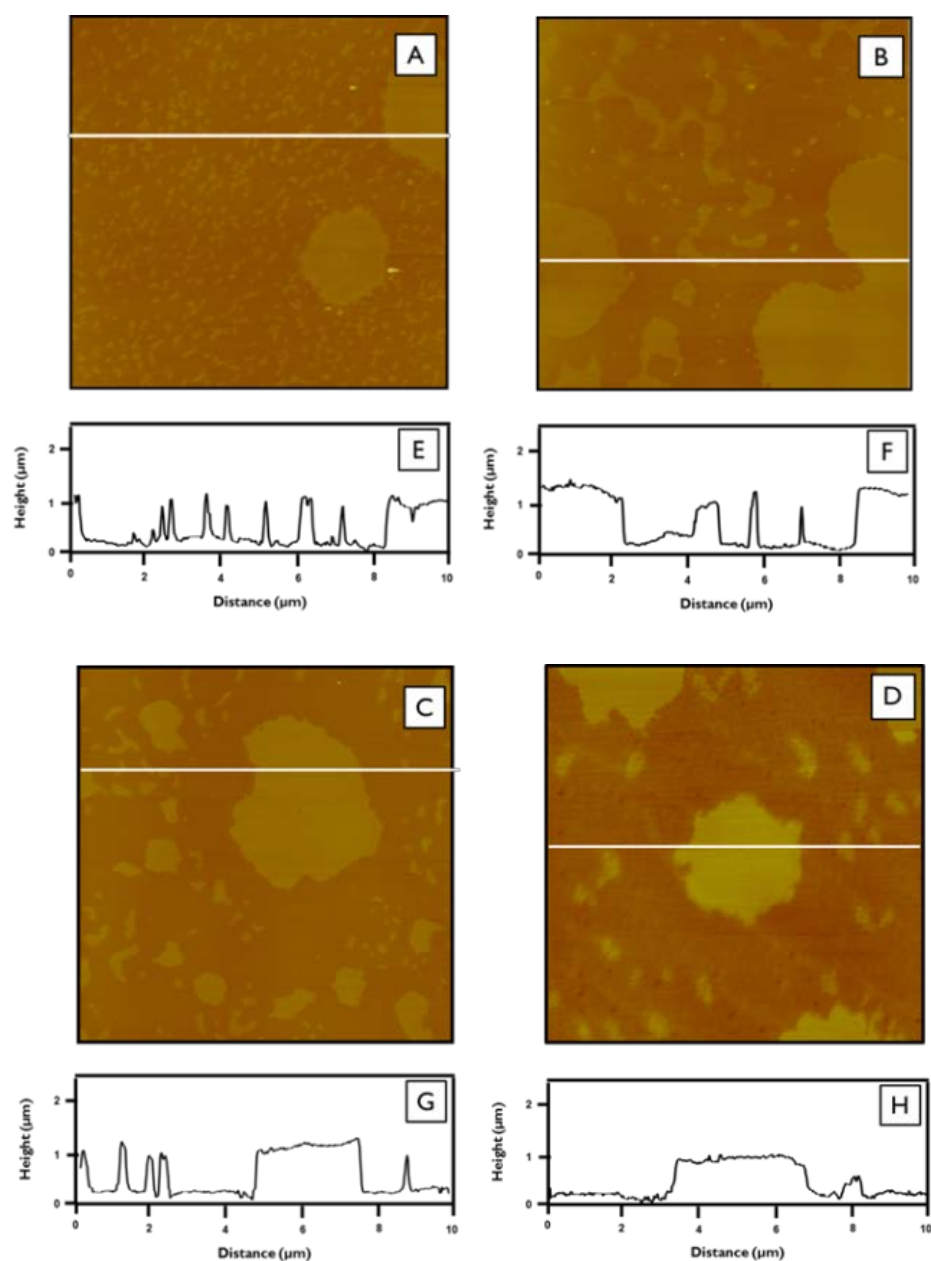


Figure 4. AFM topographic images (A-D) and height profiles along white line for PC/Chol (0.6:0.4, mol:mol) (A), PC/Cer (0.8:0.2, mol:mol)(B), Chol/Cer (0.6:0.4, mol:mol)(C), PC-Chol-Cer (0.36:0.24:0.40 mol:mol:mol) (D).

The mean values obtained from AFM images are depicted in Table 1. From LB monolayer of PC-Chol (0.6:0.4 mol:mol), height difference between the high and low domain was 1.1 ± 0.2 . High domain covered 25 % of the total area with average roughness of (R_a) 0.09 nm, and values of R_a for the lower domain were 0.06 nm.

Similar characteristics were obtained in the PC-CerandChol-Cer mixtures. In one hand, height differences between domains lie from 1.1 to 1.6 nm. On the other hand, values of covering in high domain were in the range of 26-31 %.

Previous studies with SC components revealed height difference between the high and low domain 1.6 nm from mixture of different free fatty acids (C20-C30) [16]. However due to differences in the long chain of Cer used in this study, low domains could be obtained.

Lipid Mixtures	Height (nm)	Roughness (nm)		Covering (%)	
	Dom 1	Dom 1	Dom 2	Dom 1	Dom 2
PC/Chol (0.6:0.4, mol:mol)	1.1 ± 0.2	0.09	0.06	25	75
PC/Cer (0.8:0.2, mol:mol)	1.3 ± 0.3	0.05	0.09	31	69
Chol/Cer (0.6:0.4, mol:mol)	1.2 ± 0.1	0.08	0.05	26	74
PC-Chol-Cer (0.36:0.24,0.40 mol:mol:mol)	0.9 ± 0.1	0.07	0.05	30	70

Table 1. Height, Roughness and covering values obtained from AFM images of the lipid systems studied

The surface potential technique of Langmuir monolayer provides information about ionic interactions between monolayers and the subphase. When the degree of ionization occurs, there is an observable a significant shift[17]. We used this technique in order to observe possible changes of ionization in the lipid studied and their mixtures.

According with the results, pure lipids (PC, Chol and Cer) did not change their degree of ionization in the condition studied (Figure 5A). However, increases in the surface potential were observed in Chol and Cer above 10 mN/m.

Neither was observed changes when the lipids were mixed in binary or ternary systems (Figure 5B). Similar behavior in mixtures containing PC were observed, however ternary mixture presented higher values, followed by PC-Cer mixture, lowest values of surface potential were obtained for PC-Chol.

In relation to Chol-Cer mixture, near to 400 mV surface potential starts to increase till 900 mV, these values are highest than the observed for individual compounds.

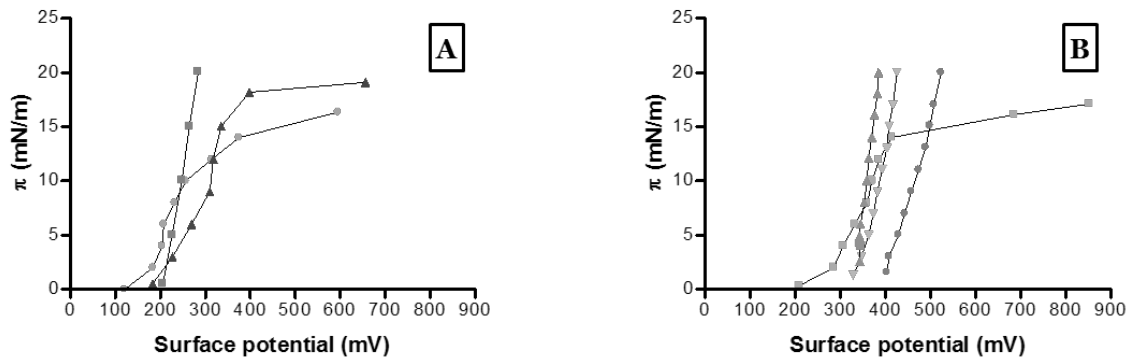


Figure 5. Surface potential of pure compounds (A) PC (■), Chol (▲), Cer (●), and mixtures of PC/Chol (0.6:0.4, mol:mol) (▲), PC/Cer (0.8:0.2, mol:mol) (▼), Chol/Cer (0.6:0.4, mol:mol) (●), PC-Chol-Cer (0.36:0.24:0.40, mol:mol:mol) (●) (B).

Conclusions

The characteristics of lipid bilayers of the liposomal formulations are closely related with the features of the monolayers, although the monolayer is only a half of the liposome structure, they can offer an overview about nano mechanics and thermodynamic parameters.

The monolayer study with the main components of the *stratum corneum*, revealed information used to develop liposomes for transdermal drug delivery. The most stable ternary mixture according to thermodynamic parameters were PC-Chol-Cer(0.36:0.24:0.40,mol:mol:mol).

Acknowledgements

M.L. Vázquez-González acknowledges a fellowship from CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México). We are grateful to the University of Barcelona for financial support.

Declaration of interest

The authors report no declarations of interest.

4. References

- [1] K.C. Madison, Barrier function of the skin: “la raison d’être” of the epidermis, *J. Invest. Dermatol.* 121 (2003) 231–241.
- [2] J.A. Bouwstra, G.S. Gooris, The Lipid Organisation in Human Stratum Corneum and Model Systems, *Open Dermatol. J.* 4 (2010) 10–13.
- [3] a. Weerheim, M. Ponc, Determination of stratum corneum lipid profile by tape stripping in combination with high-performance thin-layer chromatography, *Arch. Dermatol. Res.* 293 (2001) 191–199.
- [4] Y. Masukawa, H. Narita, E. Shimizu, N. Kondo, Y. Sugai, T. Oba, et al., Characterization of overall ceramide species in human stratum corneum., *J. Lipid Res.* 49 (2008) 1466–1476.
- [5] P.K. Gaur, S. Mishra, S. Purohit, Y. Kumar, A. Bhandari, Development of a new nanovesicle formulation as transdermal carrier: Formulation, physicochemical characterization, permeation studies and anti-inflammatory activity., *Artif. Cells. Nanomed. Biotechnol.* (2013) 1–8.
- [6] Y. Tokudome, Y. Saito, F. Sato, M. Kikuchi, T. Hinokitani, K. Goto, Preparation and characterization of ceramide-based liposomes with high fusion activity and high membrane fluidity, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 73 (2009) 92–96.
- [7] M. Suhonen, S.K. Li, W.I. Higuchi, J.N. Herron, A liposome permeability model for stratum corneum lipid bilayers based on commercial lipids, *J. Pharm. Sci.* 97 (2008) 4278–4293.
- [8] Ó. Domènech, J. Ignés-Mullol, M. Teresa Montero, J. Hernandez-Borrell, Unveiling a complex phase transition in monolayers of a phospholipid from the annular region of transmembrane proteins, *J. Phys. Chem. B.* 111 (2007) 10946–10951.
- [9] L. Picas, C. Suárez-Germà, M. Teresa Montero, J. Hernández-Borrell, Force spectroscopy study of Langmuir-Blodgett asymmetric bilayers of phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol., *J. Phys. Chem. B.* 114 (2010) 3543–3549.
- [10] S. Merino, Ó. Domènech, I. Díez-Pérez, F. Sanz, M.T. Montero, J. Hernández-Borrell, Surface thermodynamic properties of monolayers versus reconstitution of a membrane protein in solid-supported bilayers, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 44 (2005) 93–98.
- [11] C.M. Castro, M. Pinheiro, M. Lúcio, J.J. Giner-Casares, L. Camacho, J.L.F.C. Lima, et al., Insights about α -tocopherol and Trolox interaction with phosphatidylcholine monolayers under peroxidation conditions through Brewster angle microscopy, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 111 (2013) 626–635.

- [12] P. Dynarowicz-Łątka, K. Hąc-Wydro, Interactions between phosphatidylcholines and cholesterol in monolayers at the air/water interface, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 37 (2004) 21–25.
- [13] V. Kaganer, H. Möhwald, P. Dutta, Structure and phase transitions in Langmuir monolayers, *Rev. Mod. Phys.* 71 (1999) 779–819.
- [14] J.A. Bouwstra, M. Ponc, The skin barrier in healthy and diseased state, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1758 (2006) 2080–2095.
- [15] L. a Bagatolli, O.G. Mouritsen, Is the fluid mosaic (and the accompanying raft hypothesis) a suitable model to describe fundamental features of biological membranes? What may be missing?, *Front. Plant Sci.* 4 (2013) 457.
- [16] L. Norlén, I.P. Gil, A. Simonsen, P. Descouts, Human stratum corneum lipid organization as observed by atomic force microscopy on Langmuir-Blodgett films, *J. Struct. Biol.* 158 (2007) 386–400.
- [17] D.M. Taylor, O.N. Oliveira, H. Morgan, The surface potential of monolayers formed on weak acidic electrolytes: Implications for lateral conduction, *Chem. Phys. Lett.* 161 (1989) 147–150.

3.4 Desarrollo de formulaciones basadas en liposomas que biomimetizan el estrato córneo para mejorar la liberación de fármacos por vía tópica.



Development of liposomes for Transdermal Drug Delivery mimicking
stratum corneum composition

Vázquez-González, Martha L., Calpena, Ana C., Domènech, Oscar,
Montero, M. T., Hernández-Borrell, Jordi
Enviado a *International Journal of Pharmaceutics*

RESUMEN

En este estudio preparamos formulaciones de liposomas para administración transdérmica de fármacos incorporando dos moléculas: ibuprofeno y ácido hialurónico (HA). Estas formulaciones fueron desarrolladas con los principales componentes del estrato córneo (ceramidas y colesterol) y fosfatidilcolina. A través de previos estudios, establecimos la composición de los liposomas a partir de la estabilidad termodinámica de los componentes.

Los resultados que se han obtenido en estudios previos, sugieren que los promotores de la permeación (PEs) mejoran la permeación de los fármacos encapsulados, y éste incremento está relacionado con las estructuras que forman las formulaciones cuando se aplican sobre la piel humana. Los PEs utilizados en este estudio son: Tween[®] 65, Tween[®] 80 y Transcutol[®]P.

En el presente estudio, las estructuras formadas por las formulaciones desarrolladas cuando son aplicadas sobre piel humana, fueron observadas utilizando el microscopio de fuerza atómica (AFM). Nuestro objetivo es utilizar la información obtenida en las imágenes para predecir la efectividad de la permeación de los fármacos encapsulados en los liposomas desarrollados.

Aspectos relevantes en este estudio

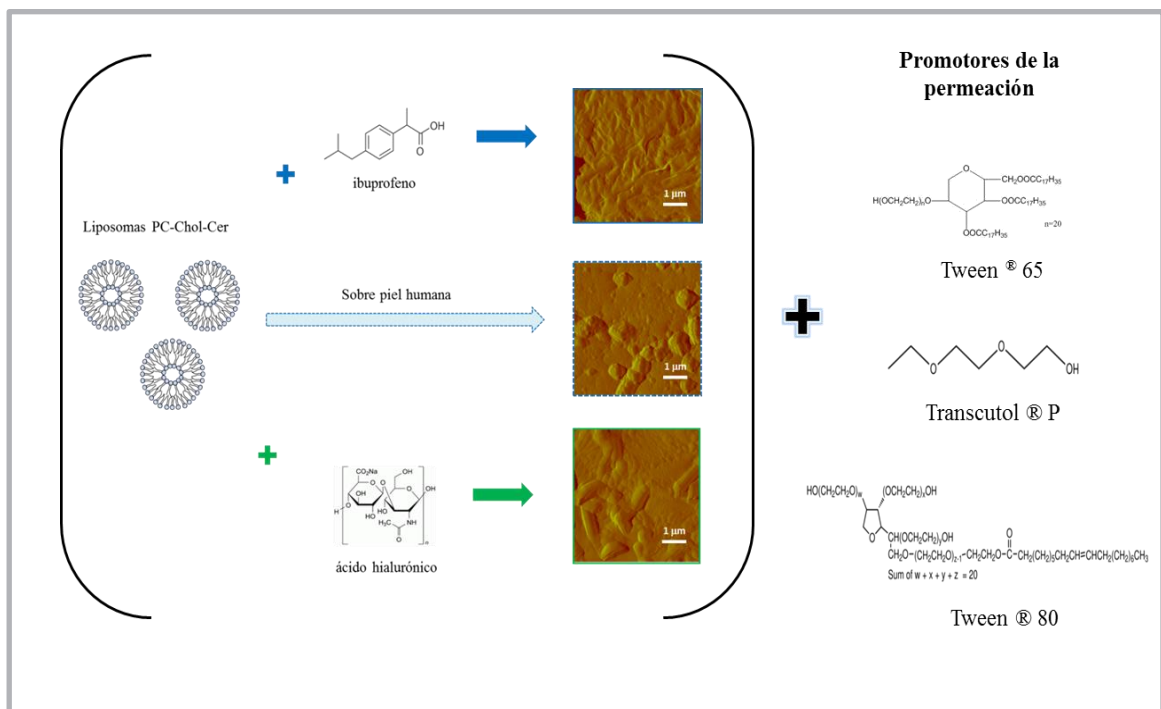
A través de la encapsulación de ibuprofeno y HA en liposomas que mimetizan la composición del estrato córneo se destacan los siguientes aspectos:

- a) Los estudios de fluidez de membrana de los liposomas, indican que la composición ternaria es más fluida en comparación con las mezclas binarias estudiadas.
- b) Las características de las vesículas no presentan diferencias significativas en su caracterización (tamaño de partícula, polidispersidad y potencial Z), cuando se incorporan los fármacos estudiados.
- c) Mediante las imágenes obtenidas con el AFM, se observan diferencias en relación a los liposomas con y sin fármaco.
- d) Los PEs adicionados a las vesículas, modifican las estructuras que forman las formulaciones aplicadas sobre la piel.

RESUMEN GRAFICO

Se encapsula ibuprofeno y ácido hialurónico en liposomas de PC-Chol-Cer. Se utiliza el microscopio de fuerza atómica, para observar las estructuras formadas por las formulaciones cuando son aplicadas sobre piel humana.

A través de la información obtenida en las imágenes se investiga para predecir la efectividad de permeación de los fármacos encapsulados. Adicionalmente, se observa el efecto de incorporar promotores de la permeación (PEs) en las formulaciones.



Development of liposomes for Transdermal Drug Delivery mimicking *stratum corneum* composition

Martha L. Vázquez-González¹, Ana C. Calpena^{2,3}, Òscar Domènech^{1,3}, M. Teresa Montero^{1,3}, Jordi H. Borrell^{1,3*}

¹Departament de Físicoquímica and ²Unitat de Farmàcia i Farmacocinètica

²Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, ³Institut de Nanociència i Nanotecnologia (IN²UB)

Av. Joan XXIII, 08028 Barcelona, Spain

Abstract

In this study we prepared liposomal formulations for transdermal drug delivery (TDD) incorporating two drugs, ibuprofen and hyaluronic acid. These formulations are formed with the main components of the *Stratum corneum* (Ceramides and Cholesterol) and phosphatidylcholine. Throughout a previous study, we establish the composition of the liposomes taking into account the thermodynamic stability of the compounds.

Our previous studies strongly suggest that supplemented liposomes with penetration enhancers (PEs) improve the permeation of the drugs encapsulated, and their enhancement is related with the structures observed onto the skin. The liposomes developed in this study are supplemented with Tween[®] 65, Tween[®] 80 and Transcutol[®] P.

We observed the structures adopted by the formulations applied onto human skin, and using the information obtained by means of AFM, we attempt to predict the effectiveness of the permeation of the drugs encapsulated in these formulations.

1. Introduction

The use of liposomes for Transdermal Drug Delivery (TDD) has been motivated due to the high efficacy reached with these systems and for all the advantages using this route of administration (Elsayed et al., 2007). Different compositions of the vesicular systems and supplementation with penetration enhancers (PEs) has been using with the aim to reach local or systemic effects. One of the strategies used for enhance TDD has been to develop liposomal formulations with similar composition to the human *Stratum Corneum* (SC) (Abraham and Downing, 1989; Gaur et al., 2013; Tokudome et al., 2009). However, the studies published have been prepared using similar composition and components of the SC.

The SC is the upper layer of the skin, and is consider the main barrier which protects the body against harmful agents. SC is formed by dead cells embed in a lipid matrix, the principal lipids in SC are ceramidas (Cer), cholesterol (Chol) and free fatty acids (Bouwstra and Ponec, 2006).

In our previous studies we designed liposomes formed by Ceramides (Cer), Cholesterol (Chol) and phosphatidylcholine (PC) to improve drug permeation based on their thermodynamic stability. In this study we include another strategy to improve drug delivery, the formulation developed was combined with different PEs with the aim to slightly destabilize the lipid membrane of the vesicles and promote the formation of planar lipid bilayer, which has been related with the enhancement of permeation of the drug encapsulated (Vázquez-González et al., 2014).

Firstly, we studied the interaction of the lipids used to prepare the liposomes means fluorimeter studies. We prepared liposomes with three binary mixtures PC-Chol, PC-Cer, Chol-Cer, and ternary mixture PC-Chol-Cer, these systems were evaluated.

Then, we prepared liposomes with the ternary mixture and incorporated two molecules: ibuprofen and hyaluronic acid. Those liposomal formulations were supplemented with Tween[®] 65, Tween[®] 80 and Transcutol[®] P, as a PEs.

Atomic Force Microscopy (AFM), were used to observe the structures adopted by the formulations and predicted the enhancement of permeation of the drugs encapsulated, relating the structures observed. In our previous studies, we used the same molecules with vesicles of PC.

2. Experimental section

2.1. Materials

L- α Phosphatidylcholine (PC) (egg yolk, 99% purity), Ceramide (bovine spinal cord $\geq 98\%$), ibuprofen, polyoxyethylene sorbitan tristearat (Tween®65), polyoxyethylene sorbitan mono oleat (Tween® 80), Hepes sodium salt, sodium hydroxide salt were purchased from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA). Cholesterol (ovine wool $>98\%$) was purchased from Avanti Polar Lipid Inc. (Alabaster, AL). Methanol, chloroform and monophosphate potassium were purchased from Panreac (Barcelona, Spain). Transcutol® P was a kind gift from Gattefossé (Saint-Priest, France). Hyaluronic acid (sodium hyaluronate) from *Streptococcus equi* was purchased from Fagron Iberica (Barcelona, Spain). Human skin was obtained from plastic surgery (Hospital de Barcelona, SCIAS, Barcelona, Spain).

The experimental protocol was approved by the Bioethics Committee of the Barcelona-SCIAS Hospital (Spain) and written informed consent forms were provided by study participants.

2.2. Liposome preparation

Liposomes were prepared according to methods published elsewhere (Domenech, et al. 2006; Picas, et al. 2010; Suarez-Germa, et al. 2012). For the fluidity studies, liposomes of binary and ternary mixtures without drugs were prepared. The amounts thermodynamically more stable of each mixture according to previous studies were used (data unpublished). Thus, the composition of each mixture were: PC-Chol (0.6:0.4, mol:mol), Chol-Cer (0.6:0.4, mol:mol), PC-Cer (0.8:0.2, mol:mol) and PC-Chol-Cer (0.36:0.24:0.40, mol:mol:mol). Briefly, chloroform-methanol (2:1 vol/vol) solution containing the appropriate amounts of the binary or ternary mixtures, were placed in a balloon and dried in a rotary evaporator at room temperature protected from light. The resulting thin film was kept under high vacuum overnight to remove any traces of organic solvent. Multilamellar liposomes were obtained by redispersion of the thin film in Hepes buffer solution (20 mM Hepes, 150 mM NaCl buffer), pH 7.4. Liposomes

were extruded through an Avanti® Mini-extruder (Avanti Polar Lipids Inc., Alabama, USA), using polycarbonate membranes with a pore size of 100 nm.

Afterwards, for the AFM studies we prepared loaded liposomes with the same amount of PC, Chol and Cer used in the fluidity studies, and incorporating the drugs (ibuprofen or hyaluronic acid (HA)). The procedure was as previously described.

Final concentration of ibuprofen and HA was assessed by HPLC after disruption of liposomes with isopropanol, drug-to-lipid mixture ratios fall typically between 0.26 and 0.37 (mol/mol).

After characterization of those vesicles, penetration enhancers (PEs) were incorporated into the liposomes with the aim of partially destabilizes the lipid bilayer, enhancing its transformation into lipid planar structures when deposited onto the skin surface.

Different concentrations of PEs (0.01–25% v/v) were added to the unloaded liposomes formed by ternary mixture PC-Chol-Cer (F1). Based on the average particle size and polydispersity values, formulations were prepared by adding extemporaneously the appropriate percentage of the corresponding PE to F1. Thus, 7% of Tween® 80, 20% of Tween® 65 and 7% of Transcutol® P were added to F1 to obtain the formulations F1-T80, F1-T65, F1-T, respectively. The same percentages of the corresponding PEs were added to liposomes containing ibuprofen (F2), to obtained F2-T80, F2-T65 and liposomes containing HA (F3) to obtained F3-T80 and F3-T. In all cases, the incorporation of PEs was prior to the observations at the microscope.

2.3. Liposome characterization

2.3.1. Particle size and Z potential

Mean particle size and polydispersity of liposomes were measured by dynamic light scattering. Electrophoretic mobility to assess the effective surface electrical charge was determined with a Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, UK). Liposomal suspensions were diluted 50-fold with Hepes buffer solution before measurement. Each sample was determined three times.

2.3. Fluorescence measurements

Bilayer fluidity was monitored using dipolar relaxation of Laurdan. Briefly, Laurdan is a polarity sensitive probe that tends to locate at the glycerol backbone of the bilayer with the lauric acid tail anchored in the phospholipid acyl chain region (Parasassi and Krasnowska, 1998). Upon excitation, the dipole moment of Laurdan increases noticeably, and water molecules in the vicinity of the probe reorient around this new dipole. When the membrane is in a fluid phase, the reorientation rate is faster than the emission process, and consequently, a red-shift is observed in the emission spectrum of Laurdan. When the bilayer packing increases, part of the water molecules is excluded from the bilayer and the dipolar relaxation of the remaining water molecules is slower, leading to a fluorescent spectrum that is significantly less shifted to the red (Domenech et al., 2009). We monitored the bilayer fluidity-dependent fluorescence spectral shift of Laurdan due to dipolar relaxation phenomena. Determinations were carried out using an SLM-Aminco 8100 spectrofluorimeter equipped with a jacketed cuvette holder. The temperature (± 0.2 °C) was controlled using a circulating bath (Haake K20, Germany). The excitation and emission slits were 4 and 4 nm and 8 and 8 nm, respectively. The lipid concentration in the liposome suspension was adjusted to 250 μ M, and Laurdan was added to give a lipid/probe ratio of 300. Generalized polarization (GP_{ex}) for emission spectra was calculated used

$$GP_{ex} = \frac{I_{440} - I_{490}}{I_{440} + I_{490}} \quad (1)$$

where I_{440} and I_{490} are the fluorescence intensities at emission wavelengths of 440 nm (gel phase, L_{β}) and 490 nm (liquid crystalline phase, L_{α}), respectively.

GP_{ex} values as a function of temperature were fitted to a Boltzmann-like equation

$$GP_{ex} = GP_{ex}^2 + \frac{GP_{ex}^1 - GP_{ex}^2}{1 + \exp\left\{\frac{T_m - T}{m}\right\}} \quad (2)$$

where GP_{ex}^1 and GP_{ex}^2 are the maximum and minimum values of GP_{ex} , T_m is the gel to fluid phase transition temperature of the studied composition, T is the temperature, and m is the slope of the transition that gives information about the cooperativity of the process.

2.4. Atomic Force Microscopy.

Atomic Force Microscopy (AFM) was carried out with a Multimode AFM controlled by Nanoscope V electronics (Bruker AXS Corporation, Santa Barbara, CA) with a nominal spring constant of $42 \text{ nN}\cdot\text{nm}^{-1}$. Spring constants of each cantilever were determined by the thermal noise method (Picas et al., 2010). Satisfactory matches with the spring constant supplied by the manufacturer were found. The instrument was equipped with an “E” scanner ($10 \mu\text{m}$).

Human skin were defrosted at room temperature and immediately glued onto a steel disc with epoxy. Afterwards, the skin was cleaned with ethanol. The formulations were applied onto the skin and incubated at 37°C for 30 minutes. After this period, the surface was rinsed gently with buffer and water, subsequently dried with nitrogen. Sample was directly mounted on the top of the AFM scanner and imaged. Images were acquired in air and in contact mode at 0° scan angle with a scan rate of 4.5 Hz. All images were processed by Nano Scope Analysis Software (Bruker AXS Corporation, Madison, WI). Environment was maintained at 24°C and 60 % of humidity.

3. Results and discussions

Liposomal formulations formed with the main components of the SC and PC were prepared incorporating two molecules, ibuprofen and hyaluronic acid. The compositions of the vesicles were previously established, according to the thermodynamic stability of the components used (submitted article).

Previous studies reported that liposomes with higher membrane fluidity delivered high amounts of the compounds encapsulated to the skin (Pérez-Cullell et al., 2000), thus it is important to verify if fluidity could increase the permeation of the ibuprofen and/or HA incorporated.

Firstly, we examined the bilayer fluidity of three binary mixtures (PC-Chol, PC-Cer, Chol-Cer) and the ternary mixture PC-Chol-Cer. To this end, we monitored the bilayer fluidity-dependent fluorescence spectral shift of Laurdan due to dipolar relaxation phenomena.

Thus, changes in fluorescence intensity of the probe as a function of temperature and excitation wavelength (λ_{ex}) in the range of temperatures from 5 to 55 °C were studied.

As can be seen in Figure 1, the excitation GP_{ex} spectra values as a function of the λ_{ex} decreases throughout the increasing temperatures used in these experiments for all mixtures studied.

We tested whether Laurdan fluorescence could be used to distinguish differences in phospholipid order from changes in membrane fluidity by examining the temperature dependence of Laurdan GP_{ex} and fluorescence anisotropy in vesicles, formed by the mixtures studied. Thorough the analysis of data obtained, we could observe transitions from different phases. Constant values of GP_{ex} as a function of λ_{ex} imply no changes in the transition phase, whereas the decrease of GP_{ex} values implies a transition to a more fluid phase (negative slope). Since formations of domains could be observed with increases in GP_{ex} values (positive slope). Additionally, high GP_{ex} values indicate presence of gel phase, while low GP_{ex} values mean presence of crystalline phase.

In the samples studied, we observed a transition from L_{β} to L_{α} phase. Besides, similar values of GP_{ex} were acquired in the binary mixtures, however in the ternary mixture GP_{ex} values were slightly lowers.

Furthermore, fitting the GP_{ex} values at 340 nm to equation 2, we obtained the T_m values of the systems studied, thus we confirmed for ternary mixture a $T_m = 5.46$ °C.

Differently in the binary mixtures, transition temperatures lie in the range of 32.7 to 39.15 °C (Table 1).

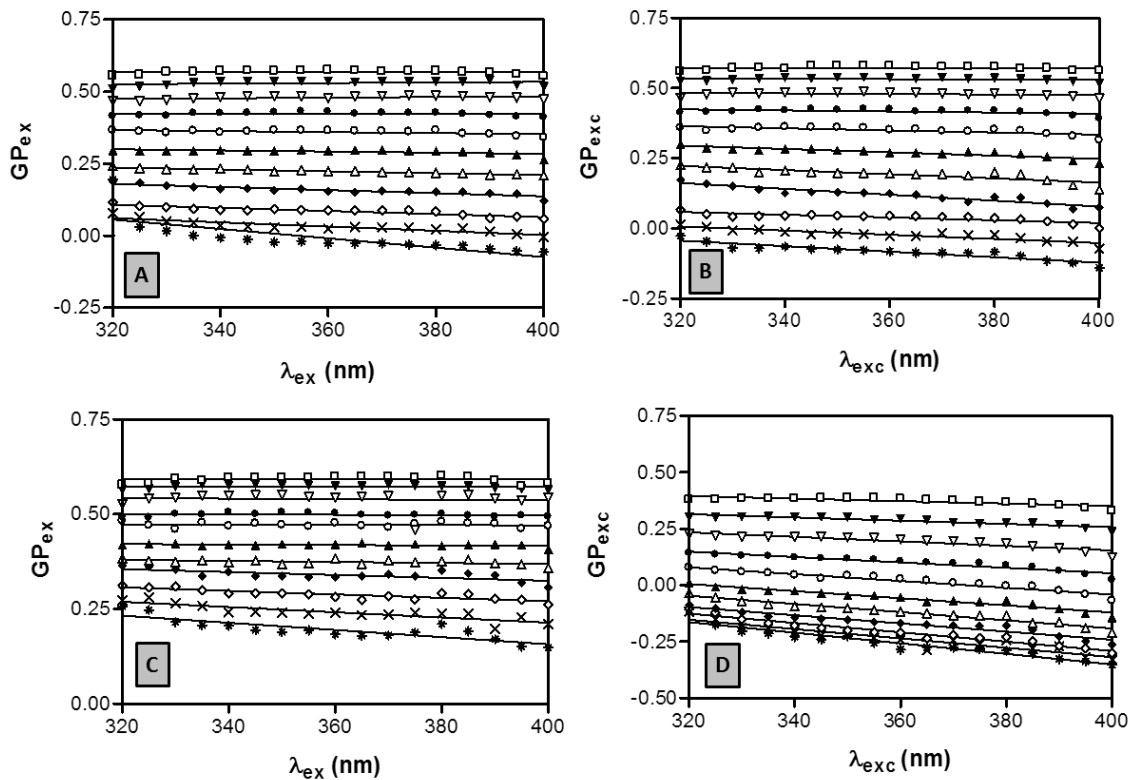


Figure 1. GP_{ex} as a function of λ_{ex} for PC-Chol (A), PC-Cer (B), Chol-Cer (C) and PC-Chol-Cer (D).
 (\square = 5 °C, ∇ = 10 °C, \triangle = 15 °C, \bullet = 20 °C, \circ = 25 °C, \blacktriangle = 30 °C, Δ = 35 °C, \blacklozenge = 40 °C, \diamond = 45 °C, \times = 50 °C, $*$ = 55 °C)

We could observe similar trends relating to transition temperatures in binary mixtures, however in ternary mixture PC-Chol-Cer we could establish that PC rules the T_m , because of the lowest transition temperature of pure compound corresponds to PC.

According to the swiftness in the transition temperature (m), for all mixtures studied we observed similar behavior in the cooperativity to the process; values ranging from 16.08 to 20.83, however the binary mixture Chol-Cer exhibited the highest value.

	PC-Chol	PC-Cer	Chol-Cer	PC-Chol-Cer
Molar fraction	0.6:0.4	0.8:0.2	0.6:0.4	0.36:0.24:0.40
T_m (°C)	32.7	33.8	39.15	5.46
m (°C)	18.38	16.08	20.83	18.06
r^2	0.9996	0.9994	0.9960	0.9993

Table 1. Transition temperature from gel to fluid phase (T_m) and cooperativity to the process (m).

According to the results obtained in the fluorescence measurements, we could corroborate absence of composition domains in all mixtures studied.

Once studied the thermotropic behavior of ternary mixture used, we prepared vesicles of this composition to encapsulate two drugs, ibuprofen and HA. Those formulas were characterized in terms of diameter size, polydispersity and Z potential (Table 2).

The parameters evaluated did not change significantly when the drugs were incorporated in the vesicles. In all cases it was observed low polydispersity and negative Z potential values, which is in concordance with the liposomes prepared only with PC previously studied (Vázquez-González et al., 2014; Vázquez-González ML et al., 2015).

	F1 Liposomes PC-Chol-Cer	F2 Liposomes PC-Chol-Cer containing ibuprofen	F3 Liposomes PC-Chol-Cer containing HA
Size (nm)	110 ± 2	118 ± 1	136 ± 3
Polydispersity	0.153	0.127	0.178
Z potential (mV)	-4.94	-7.6	-9.02

Table 2. Characterization of developed vesicles in terms of Size, polydispersity and Z potential of liposomes PC-Chol-Cer (F1), liposomes PC-Chol-Cer containing ibuprofen (F2) and liposomes PC-Chol-Cer containing HA (F3).

Once characterized the main formulas (F1, F2 and F3), Tween[®] 80, Tween[®] 65 and Transcutol[®] P were incorporated in order to promote the formation of planar structures when the formulas will be applied onto the human skin surface.

We use the AFM to observe the structures formed by the liposomes developed when applied onto the human skin surface. Firstly we acquired images from clean skin and liposomes without drugs (Figure 2).

Deflection images from clean skin showed high roughness values ($R_a = 22$ nm) and irregular surface, with height values ranging from 50 to 330 nm. Once spreading of liposomes of PC-Chol-Cer (F1), the surface becomes smoother, liposomes without PEs exhibits homogenous surface with roughness (R_a) value of 8.7 nm and step height differences of 150 ± 50 nm.

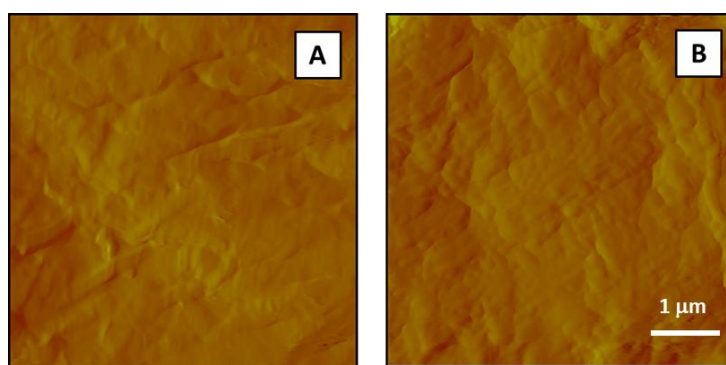


Figure 2. Deflection images from clean human skin (A) and liposomes PC-Chol-Cer (F1) after spreading to human skin surface (B). Scale bar = 1 μ m. Z scale 10 nm.

Afterward, F1 was supplemented with PEs used in this study. As it can be seen in Figure 3, differences in relation with the PEs used were observed, thus it implies different effect of each PE on the vesicle membrane. Once the formulas were supplemented with PEs, we observed in some cases the skin surfaces covered by round structures.

In the case of F1- T80 (Figure 3A), we could differentiate two regions, one of them with flat surface with an average R_a value of 4 nm where some spherical structures with average size of 200 ± 30 nm were distinguishable, the second region is covered by bigger spherical structures with diameters from 520 nm to 900 nm and R_a value of 13.1 nm. At first sight, the smaller structures could assemble to form the bigger ones; as a result the step height is 150 ± 90 nm.

Differently, the image obtained after the deposition of F1-T65 (Figure 3B) shows no spherical structures, the main R_a value of 13.8 nm and step height values of 210 ± 160 nm were observed.

After the spreading of F1-T formula, two different regions could be distinguished (Figure 3C). In one region we could observe that some structures seem to be vesicular clusters. Those structures were in the range of 540 to 600 nm in diameter value, smaller than the structures observed in Figure 3A, and with less variability in size. In this region average R_a of 16 nm were observed; the other region was covered with small structures ranging from 150 nm to 250 nm, and $R_a = 6$ nm. In this samples, a mean step height value of 230 ± 130 nm were measured.

These facts allow us to verify our first hypothesis: PEs modify the transformation of the vesicles in planar structures, after the spreading onto the clean skin, even with a complex composition as the PC-Chol-Cer mixture. In these formulas without drugs, we could state that Tween[®] 80 allows liposomes to form flatter structures than the others PEs studied, because of the lower step height difference observed in the samples of F1-T80, additionally R_a values decreases in the regions covered by smaller spherical structures (Figure 3A and 3C).

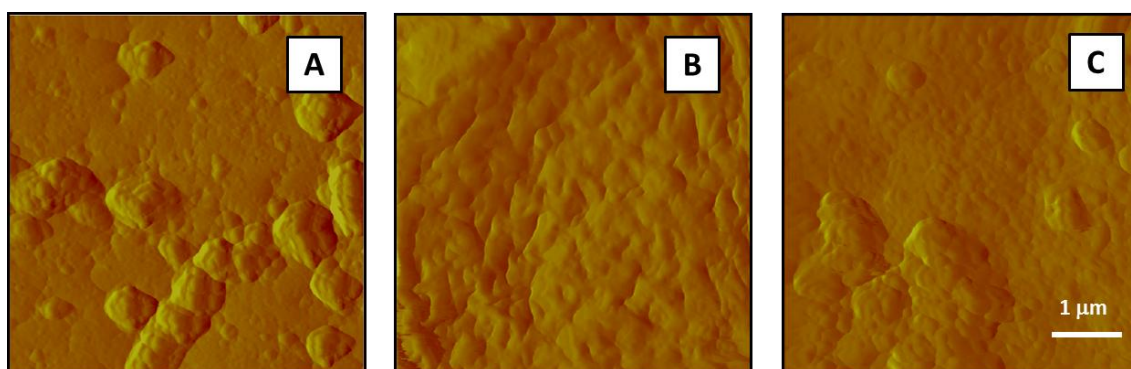


Figure 3. Deflection images from F1-T80 (A), F1-T65 (B) and F1-T (C). Scale bar = 1 μ m. Z scale 10 nm.

Once observed the liposomes without drugs, ibuprofen was incorporated and supplemented with Tween[®] 80 and Tween[®] 65 (Figure 4). The formulation without PEs, (Figure 4A) exhibits a homogeneous region in the image with average roughness of 19.7 nm and step height value of 300 ± 150 nm.

When F2 was supplemented with Tween[®]80 (Figure 4B), some structures with average width of 340 ± 50 nm can be distinguished. Regarding to roughness, we found an average R_a value of 15.8 nm, whilst the main step height was 340 ± 190 nm.

In the formula F2-T65 (Figure 4C), we observed an uniform region without formation of well-defined structures, with $R_a = 15.3$ nm and step height values ranging from 220 ± 150 nm.

Comparing with formulations without drugs, PEs acts differently in the bilayer of the vesicles containing ibuprofen, analysing some parameters such as roughness or step heights, we could established certain differentiation, in all cases values of roughness slightly increases comparing with formulas without drugs and the same PEs.

Secondly, we could expect that Tween[®] 80 acts as a better promotor of the transformation of liposomes; however we observed increases in step height differences. Besides T65 showed similar behaviour than in the formula without ibuprofen.

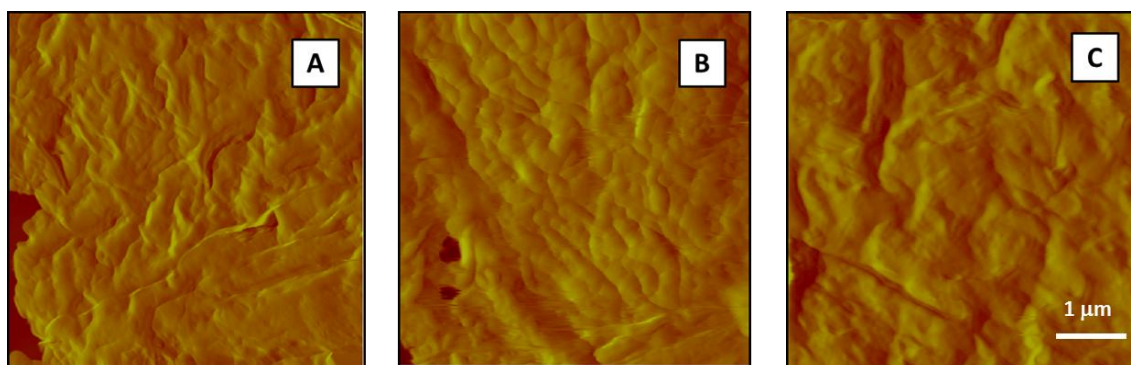


Figure 4. Deflection images from liposomes containing ibuprofen F2 (A), supplemented with Tween[®]80 F2-T80 (B) and Tween[®] 65 F2-T65 (C). Scale bar = 1 μ m. Z scale 10 nm.

Concerning to the formulations containing HA, the images showed clear differences in presence and absence of PEs. The formulation without PEs (F3) shows two regions (Figure 5A), a planar region (white stars) with R_a of 2.98 nm and a second region displaying diverse spherical structures with diameters from 166 to 284 nm and a mean R_a value of 10.3 nm. Step height differences were 305 ± 182 nm. Furthermore, when the formulation is supplemented with Tween[®]80, spherical structures not well defined were observed (Figure 5B), with average R_a values of 9.5 nm and a step height difference of 370 ± 210 nm.

In addition, formulation supplemented with Transcutol[®]P (Figure 4C) showed two regions, the first (white stars) exhibited a continuous planar structure with R_a of 7.6 nm. In the second region we observed some cylindrical shaped structures, with diameters ranging from 166 nm to 284 nm and average roughness of 13.48 nm. The mean step height was 180 ± 120 nm respects to the first region.

Comparing the effect to incorporate HA in the vesicles formed by PC-Chol-Cer, we observed that PEs modify the deposition to the vesicles onto the human skin surface. In one hand, when F3 is supplemented with Tween[®]80 (F3-T80) the average roughness slightly decreases; on the other hand, F3-T showed the image slightly flatter surface, due to the step height measured. Due to this information, we could state that Transcutol[®] P, promotes better the transformation of liposomes in planar structures when HA is incorporated.

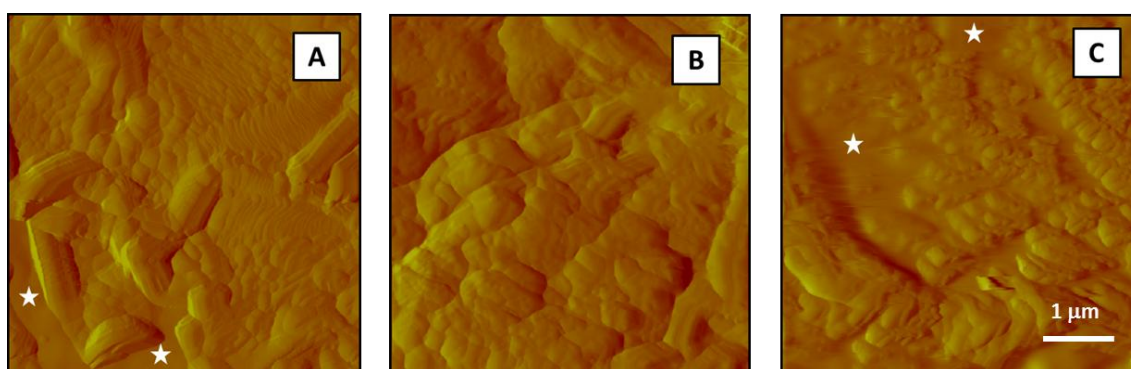


Figure 5. Deflection images from liposomes containing HA F3 (A), supplemented with Tween[®]80 (F3-T80) (B), and Transcutol[®]P(F3-T) (C). Scale bar = 1 μ m. Z scale 10 nm.

Summarising, we observed in the images acquired by means of AFM, that the composition of the vesicles plays a fundamental role in the process of the deposition and subsequent extension onto the human skin. As previous works revealed, when we spread liposomal formulations onto clean skin it becomes smoother. In these formulas, the same trend was observed, however the properties of the drug incorporate play an important role as well.

Taking into account the composition of the vesicles used in this study (PC-Chol-Cer), we observed that incorporation of ibuprofen or HA exhibited clear differences, indicating the effect of each molecule in the elasticity of the bilayer membrane, and consequently in the deposition onto the human skin surface.

The liposomes without drugs (F1), exhibited the lowest average values of roughness, however in the vesicles containing HA (F3), some planar structures were observed. In the case of liposomes containing ibuprofen (F2), homogeneous structures were observed with the highest values of roughness, comparing with F1 and F3. According with this information, we could state that incorporation of HA allows transformation of liposomes into planar structure better than ibuprofen. This fact is mainly related with the place in which the molecules are incorporated in the vesicles, according with their polarity ibuprofen is mainly in the bilayer, since HA is entrapped in the aqueous phase of the liposome. Apparently, the incorporation of the drugs could influence the effect of the PEs.

Acknowledgements

M.L. Vázquez-González acknowledges a fellowship from CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México). We are grateful to the University of Barcelona for financial support.

Declaration of interest

The authors report no declarations of interest.

4. References

- Abraham, W., Downing, D.T., 1989. Preparation of model membranes for skin permeability studies using stratum corneum lipids. *J. Invest. Dermatol.* 93, 809–813.
- Bouwstra, J.A., Ponc, M., 2006. The skin barrier in healthy and diseased state. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*
- Domenech, O., Francius, G., Tulkens, P.M., Van Bambeke, F., Dufrêne, Y., Mingeot-Leclercq, M.P., 2009. Interactions of oritavancin, a new lipoglycopeptide derived from vancomycin, with phospholipid bilayers: Effect on membrane permeability and nanoscale lipid membrane organization. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1788, 1832–1840.
- Elsayed, M.M., Abdallah, O.Y., Naggar, V.F., Khalafallah, N.M., 2007. Lipid vesicles for skin delivery of drugs: reviewing three decades of research. *Int. J. Pharm.* 332, 1–16.

Gaur, P.K., Mishra, S., Purohit, S., Kumar, Y., Bhandari, A., 2013. Development of a new nanovesicle formulation as transdermal carrier: Formulation, physicochemical characterization, permeation studies and anti-inflammatory activity. *Artif. Cells. Nanomed. Biotechnol.* 1–8.

Parasassi, T., Krasnowska, E.K., 1998. Laurdan and Prodan as polarity-sensitive fluorescent membrane probes. *J. Fluoresc.* 8, 365–373.

Pérez-Cullell, N., Coderch, L., de la Maza, a, Parra, J.L., Estelrich, J., 2000. Influence of the fluidity of liposome compositions on percutaneous absorption. *Drug Deliv.* 7, 7–13.

Picas, L., Suárez-Germà, C., Teresa Montero, M., Hernández-Borrell, J., 2010. Force spectroscopy study of langmuir-blodgett asymmetric bilayers of phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol. *J. Phys. Chem. B* 114, 3543–3549.

Tokudome, Y., Saito, Y., Sato, F., Kikuchi, M., Hinokitani, T., Goto, K., 2009. Preparation and characterization of ceramide-based liposomes with high fusion activity and high membrane fluidity. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 73, 92–96.

Vázquez-González, M.L., Bernad, R., Calpena, A.C., Domènech, O., Montero, M.T., Hernández-Borrell, J., 2014. Improving ex vivo skin permeation of non-steroidal anti-inflammatory drugs: Enhancing extemporaneous transformation of liposomes into planar lipid bilayers. *Int. J. Pharm.* 461, 427–436. d

Vázquez-González ML, Calpena AC, Domènech Ò, Montero MT, B.J., 2015. Enhanced topical delivery of hyaluronic acid encapsulated in liposomes: A surface-dependent phenomenon. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 134, 31–39.

Capítulo 4.

Discusión general



Discusión general

Los principales objetivos que persigue el desarrollo de nuevas formas farmacéuticas son el aumento de la biodisponibilidad, la disminución de los efectos secundarios y la reducción de las dosis terapéuticas. El objetivo específico es que el medicamento se distribuya con eficacia hasta llegar a la dianas específicas (1). Para este fin, existen numerosas estrategias que tienen en común facilitar el transporte del fármaco a través de las diversas barreras del cuerpo humano. Al margen del uso de inyectables, que evitan en gran parte esas barreras, las otras vías de administración se caracterizan por presentar superficies altamente complejas a través de las que el principio activo debe, normalmente, adsorberse y difundirse previamente a la distribución, en algunos casos pasivamente y en otros mediante mecanismos activos de transporte de membrana.

La vía tópica, ha sido objeto de una extensa investigación por la aparente facilidad tanto de administración como de acceso al torrente sanguíneo. Sin embargo, la piel posee una compleja estructura formada por tres capas, epidermis, dermis e hipodermis (2), y específicamente la capa más externa de la epidermis, el estrato córneo, que ha sido identificado como la principal barrera para el acceso de los fármacos a través de la piel (3).

El estrato córneo es una estructura en si misma compleja, formada por células queratinizadas que están rodeadas por una matriz lipídica de diversa composición. Los lípidos presentes en esta matriz lipídica son ceramidas (15 tipos identificados), colesterol y ácidos grasos. En este sentido, es conocido que los liposomas, vesículas lipídicas que encierran un espacio acuoso en su interior, podían ser vehículos ideales para la administración tópica. En realidad, desde su desarrollo en los años 60, llamaron la atención de diversos laboratorios cosméticos que los comercializaron como “reparadores” de la piel. Fue el caso del exitoso producto “Capture®”, que vehiculaba un producto hidratante. En realidad el atractivo de los liposomas como vehículos de administración tópica era y es, su compatibilidad con la composición lipídica presente en el estrato córneo.

Cuando se analiza la estructura del estrato córneo se comprueba que se pueden establecer dos tipos principales de interacciones de las formulaciones con esta barrera (4). El primer tipo se produciría por interacción con los componentes de los espacios intercorneocitarios y el segundo tipo, se produciría por interacción con las membranas citoplasmáticas de los corneocitos. En el caso de utilizar liposomas, el primer tipo de interacciones se dará entre los lípidos que constituyan las vesículas y los lípidos de la matriz intercorneocital. La interacción con las membranas de los corneocitos, sería más compleja y se producirían fenómenos de adsorción y/o fusión, pero no se produciría, como en otro tipo de células, endocitosis debido a su incapacidad para fagocitar (5). Por su parte, el paso a través de la matriz lipídica, plantea enormes dudas sobre la integridad de los liposomas debido a la interacción con los componentes presentes en este medio. Aspectos como el intercambio lipídico, la deformación de los liposomas y su composición, son factores de difícil control. Por este motivo, en este trabajo de investigación se planteó desarrollar una forma farmacéutica racional, vehiculada mediante liposomas, cuya composición fuera biomimética con los componentes lipídicos del estrato córneo. La necesidad de conocer la interacción a nivel molecular, se planteó tras el diseño de una forma farmacéutica de liposomas de PC, un lípido común y que es ampliamente utilizado como modelo de fosfolípido formador de liposomas. Además, también se vio la necesidad de hacer un seguimiento de los fenómenos fisicoquímicos que suceden al aplicar estas formas farmacéuticas sobre la superficie de la piel humana.

Se han diseñado dos formas farmacéuticas de liposomas para vehiculizar dos principios activos diferentes, Ibuprofeno y ácido hialurónico (AH). El primero tiene una naturaleza anfipática y un bajo peso molecular, y el segundo es altamente higroscópico y de alto peso molecular. En ambos casos se aplicó la misma metodología de producción, se estudió su estabilidad física, se determinó su eficacia terapéutica mediante ensayos de permeación *in vitro* y *ex vivo*. Mediante el AFM se investigó el tipo de estructuras que se forman sobre las superficies, en este sentido no solo se trabajó con piel humana, sino también con membranas artificiales comúnmente utilizadas para la liberación de fármacos *in vitro* (celulosa), se estudiaron también las modificaciones de las propiedades elásticas que se producen en las formulaciones desarrolladas al ser aplicadas. Nuestra hipótesis de trabajo fue que al añadir extemporáneamente un agente activador del borde de la membrana *edge activator*, los liposomas se podían

desestabilizar parcialmente y de forma parcialmente controlada. De esta manera, se activaría la liberación del principio activo en el momento en que se produce el contacto con la superficie de aplicación y aumentaría su biodisponibilidad.

Un activador de penetración de membrana, no es otra cosa que un surfactante de cadena simple de hidrocarburos, que desestabiliza la bicapa de los liposomas promoviendo su elasticidad (6). Aunque estos compuestos actúan como promotores de la permeación (PEs), las cantidades en las que han sido incorporadas en las formulaciones desarrolladas, no sugieren que su principal función, por sí solos sea la de incrementar la permeabilidad del fármaco vehiculizado en los liposomas. Así, al estudiar el efecto de los PEs sobre los liposomas de ibuprofeno y AH, se observó que no tenían la misma capacidad disruptiva. Esto se atribuyó a la naturaleza del principio activo encapsulado. Se sabe que por su naturaleza anfipática, el ibuprofeno se encapsula parcialmente en la bicapa además de en la fase acuosa. En cambio AH se encapsula exclusivamente en el espacio acuoso.

En los estudios preliminares realizados, se vio que la actividad superficial de los PEs era variable dependiendo de la naturaleza química del mismo. De entre los experimentos de caracterización de los liposomas se observó una evolución diferente del potencial Z, que resultó predictiva de la mayor estabilidad de los liposomas de AH; esto es, de los liposomas que encapsulan un principio hidrosoluble. Puesto que la literatura muestra que el ibuprofeno, debido a su naturaleza anfipática tiene tendencia a intercalarse entre los lípidos de la bicapa del liposoma (7) los resultados indican que existe una mayor compactación de los fosfolípidos si el principio activo es hidrosoluble.

En base a esta información y a los experimentos realizados, se seleccionaron sendos PEs para cada uno de los principios activos estudiados. Los liposomas con ibuprofeno fueron suplementados con Tween[®] 65 y Tween[®] 80, mientras que los liposomas con AH, con Tween[®] 65 y Transcutol[®] P. Esta selección fue por tanto meramente empírica y se realizó en base a la estabilidad de los liposomas (evolución del tamaño, polidispersidad y potencial zeta). En cualquier caso, la interacción molecular específica debería tener una base racional que no se contempló como objetivo de esta tesis.

Del análisis de los resultados se infiere, por el comportamiento general de nuestros experimentos, que la adición de PEs incrementa significativamente la liberación del fármaco tanto en piel como celulosa, e incrementa las cantidades de fármaco retenido a

nivel dérmico. Así lo indican los parámetros biofarmacéuticos, y en especial las cinéticas de permeación.

Analizando los resultados obtenidos en los ensayos de permeación *in vitro*, se estableció que el modelo cinético que describe la liberación del ibuprofeno a través de la celulosa, independientemente del PE incorporado, fue el propuesto por Korsmeyer-Peppas (8). El exponente n de este modelo, es el que ha sido propuesto para explicar el mecanismo de liberación del fármaco. En el caso de los liposomas con ibuprofeno, este parámetro se encontró que deja de manifiesto que el ibuprofeno sigue un mecanismo de liberación por difusión simple (8) que sigue las leyes de Fick.

En el caso de los liposomas con AH, la liberación máxima se consiguió con la formulación suplementada con Transcutol[®] P y la cinética de liberación siguió en todos los casos el modelo dictado por las leyes de Fick.

Aunque todas las formulaciones fueron ajustadas al mismo patrón cinético de liberación, existen diferencias significativas en los valores de los parámetros obtenidos, tanto en la constante de velocidad como en el porcentaje máximo liberado.

Los ensayos de permeación *ex vivo* con piel humana, indicaron que el PE que mejor actúa para la liberación del fármaco en celulosa, es el mismo que permea las mayores cantidades de fármaco en la piel. Es remarcable que los liposomas, sean con ibuprofeno o AH, suplementados con PEs, mostraron los mayores valores de flujo y los porcentajes de fármaco permeado, y que éstos valores fueron similares a los valores de flujo que proporciona la formulación comercial, con la que se comparó (Ibufén[®]), lo que implica que una reducción de concentración de los liposomas que contienen ibuprofeno (hasta 20%) da como resultado la misma biodisponibilidad local que la formulación farmacéutica comercial. Esta observación abre numerosas perspectivas, de ser generalizable, para el desarrollo de nuevas formulaciones de liposomas suplementados con PEs como coadyuvantes.

Los estudios de permeación *in vitro* y *ex vivo*, así como la determinación cuantitativa de cantidades de fármaco retenidos por la piel humana, parecen estar relacionados con los siguientes aspectos: primero, con el efecto de desestabilización de estos PEs en liposomas (9,10) y seguido con una posible interacción de los PE con los componentes del estrato córneo (11). Esto conduce a la desestabilización de la estructura vesicular por

la formación de micelas mixtas con los fosfolípidos usados para formar los liposomas (12,13).

Estos resultados se atribuyeron, a la acción de los PE sobre los liposomas. Pero en este punto era necesario tener constancia de las estructuras que resultaban tras la adición de PEs. Es importante destacar que la adición se realizó extemporáneamente, por lo que medir su efecto “in situ” es difícil. Por eso se recurrió a la observación microscópica. La microscopía de fuerza atómica se consideró la más conveniente por que puede realizarse en condiciones totalmente biomiméticas. Esto es, puede caracterizarse topográficamente la piel, en aire, sin necesidad de colorantes o marcadores. Igualmente, pueden observarse el tipo de estructuras que se forman a una resolución nanométrica. En general, la adición de PEs induce la formación de regiones planas cuya diferente altura sugiere la formación de bicapas y multicapas originadas por la disrupción parcial de las vesículas. Prueba de ello es que mediante el AFM se observan algunos liposomas no totalmente extendidos.

Las formulaciones desarrolladas fueron depositadas en dos tipos de membranas: la celulosa y piel humana y se observaron las estructuras que se forman después de su deposición utilizando el AFM.

En relación a las imágenes obtenidas, de los liposomas que contienen ibuprofeno o ácido hialurónico en celulosa, se observaron diversas estructuras, muy probablemente atribuidas a la disrupción incompleta de las vesículas. Es importante mencionar que el uso de celulosa es frecuente como modelo para el estudio de la permeación de fármacos, y que se utiliza ampliamente para extrapolar los resultados sobre piel. Sin embargo, cuando el sustrato es la piel, se observa un comportamiento diferente. Previamente a la observación de las formulaciones, se caracterizó la interficie biológica, la piel es un tejido con una superficie muy rugosa, formada por grandes regiones con diferencias de alturas que exhiben valles, plataformas y orillas profundas que no siguen ningún patrón. Sin embargo, después de la deposición de las formulaciones, la rugosidad disminuye y se observa cubierta por diferentes tipos de estructuras. La adición de PEs promueve claramente la formación de las estructuras planas, debido a las regiones, parecidas a bicapas o multicapas de lípidos, en coexistencia con liposomas no fusionados y/o intactos observadas. En cambio, el análisis de las imágenes de liposomas con AH, indican que la transformación de liposomas en bicapas planas o multicapas no fue

completa en las mismas condiciones que con ibuprofeno. Los liposomas con Transcutol[®] P parecían sufrir rotura parcial dejando entidades esféricas en la superficie con diámetros mayores a los observados en la formulación de liposomas en ausencia de PEs.

Utilizamos el modo de AFM-FS para conocer las propiedades nanomecánicas de las estructuras que se producen después de la deposición de las formulaciones sobre celulosa y piel humana. AFM-FS es un modo de trabajo que permite obtener el balance entre las fuerzas de adhesión y las fuerzas de cohesión del sistema lipídico estudiado. Cuando la punta del AFM ejerce presión sobre la capa lipídica los fosfolípidos que entran en contacto con ésta tienden a adherírsele, por tanto, cuando el AFM intenta apartar la punta de la muestra encuentra una resistencia a liberarla de ese contacto. La fuerza de adhesión (F_{adh}) entre los fosfolípidos y la superficie de la punta del AFM da información de la facilidad con que el sistema lipídico puede extenderse sobre las superficies, en particular la superficie de la piel humana o de la celulosa. Se observaron diferencias entre las estructuras adoptadas y las fuerzas de adhesión presentadas por las formulaciones depositadas en celulosa o en la piel. Sin embargo, aunque la celulosa es comúnmente utilizada como modelo para poner a prueba la permeabilidad de fármacos, nuestros datos de AFM –demuestran que este sustrato no mimetiza plenamente las propiedades fisicoquímicas de la piel humana. Así, la diferencia de tamaños en las estructuras de una misma formulación depositadas en diferente sustrato refleja claramente la influencia del sustrato en las estructuras adoptadas, lo que a su vez está relacionado con las F_{adh} observadas.

Analizando las propiedades nanomecánicas por medio del modo AFM-FV, se puede establecer la relación que existe entre el valor medio de estas fuerzas y la permeación de fármacos. Para el AH, las formulaciones con valores bajos en las F_{adh} presentaron las mayores cantidades de fármaco permeado. Esta misma correlación se observó con mayor claridad en las formulaciones de liposomas con ibuprofeno.

Una vez observado el efecto causado por la incorporación de PEs sobre los liposomas de PC con los fármacos utilizados en la presente investigación, se planteó el diseño de una nueva estrategia para aumentar la eficacia de los liposomas para la administración transdérmica de fármacos, basada en los fenómenos de fusión intermembranarios (15). Esta estrategia consistió en desarrollar una formulación biomimética con la matriz

lipídica intercorneocitaria. Diversos grupos de investigación han desarrollado formulaciones con los componentes del estrato córneo (16–18) sin embargo, las proporciones de los componentes utilizados han sido en función a los datos encontrados en la bibliografía (19). Como se ha puesto de manifiesto, la composición de las vesículas tiene un papel importante en la permeación de los fármacos a través de la piel, por lo que se requiere optimizar su composición (20).

En nuestra investigación, el modelo de membrana para mimetizar el estrato córneo fue ideado en base a los compuestos más abundantes en el estrato córneo: ceramidas (Cer) y colesterol (Chol), y en base a la estabilidad termodinámica deducida de su comportamiento en monocapas se seleccionó la mejor opción para producir los liposomas.

Con este objetivo, se realizaron una serie de experimentos, utilizando la balanza de Langmuir. Los resultados obtenidos mostraron que la composición termodinámicamente más estable fue PC-Chol-Cer (0.36:0.24:0.40, mol:mol:mol). Esta composición presenta un contenido de Cer y Chol, similar al que se ha encontrado en el estrato córneo (21).

Aunque los estudios se realizaron en monocapas, la información obtenida ofrece una idea clara de la configuración de la bicapa lipídica y las propiedades observadas son fácilmente extrapolables a los liposomas (22).

Posteriormente, teniendo la composición biomimética más favorable desde un punto de vista termodinámico, se prepararon liposomas incorporando ibuprofeno o AH. La caracterización fisicoquímica de las vesículas en términos de tamaño de partícula, polidispersidad y potencial zeta, no mostro diferencias significativas en relación al fármaco encapsulado y a las vesículas sin fármaco. Estas diferencias tampoco se observaron comparando con liposomas de PC. Este hecho sugirió que la adición de PEs podría incorporarse en el desarrollo de nuevas formulaciones. De esta forma, se estudió el efecto de los PEs para favorecer la formación de bicapas planas sobre la piel, siguiendo nuestra inicial hipótesis de estudio.

Después de caracterizar las formulaciones desarrolladas, se observaron mediante el AFM las estructuras adoptadas al ser aplicadas sobre piel humana, con el objetivo de desarrollar una metodología de predicción de la efectividad de permeación de los fármacos, a través de la observación de regiones planas y disminución en los valores de rugosidad.

En general, para la composición biomimética (PC-Chol-Cer), fue necesaria mayor cantidad de PEs para conseguir una ligera desestabilización en la bicapa de las vesículas, lo cual podría sugerir diferencias en las estructuras formadas por las formulaciones cuando son aplicadas sobre la piel, en relación a los liposomas de PC. Sin embargo, a través de las imágenes obtenidas observamos patrones similares. En general, se observó que la composición de las vesículas ejerce un papel fundamental en el proceso de la deposición y posterior extensión sobre la piel humana (23), lo cual se verificó al comparar la formulación biomimética con los liposomas de PC. En las vesículas de PC-Chol-Cer se observaron incrementos en los valores medios de rugosidad y diferencias en alturas de las estructuras formadas tanto para el ibuprofeno como para el AH.

Tal como se ha puesto de manifiesto en trabajos anteriores, cuando los liposomas se depositan sobre la piel, su rugosidad disminuye. Este mismo efecto fue observado con los liposomas de composición biomimética.

Comparando la deposición de las formulaciones en relación al fármaco encapsulado, se observaron claras diferencias en los liposomas con ibuprofeno y las vesículas con HA, lo que indica el efecto de cada molécula en la elasticidad de la bicapa de las vesículas, y consecuentemente en la deposición sobre la superficie de la piel humana.

Los liposomas sin fármaco, mostraron valores de rugosidad más bajos, sin embargo en las vesículas que contienen AH, se observaron algunas estructuras planas. En el caso de liposomas que contienen ibuprofeno, las regiones homogéneas se observaron con los más altos valores de rugosidad, comparando con los liposomas sin fármaco y los que contienen AH.

Debido a que la transformación de los liposomas en capas planas y en consecuencia su función de efecto reservorio pueda estar actuando debido a la fusión de los liposomas con los componentes de la matriz lipídica del estrato córneo (24), la aplicación de una formulación de composición biomimética podría permitir que el mecanismo de adsorción y/o fusión de las vesículas con el estrato córneo pueda gobernar la permeación de fármacos encapsulados (25).

Integrando la información obtenida en las imágenes, se puede establecer que el PE que puede aumentar la permeación del ibuprofeno es Tween[®]65, mientras que Transcutol[®] P

es capaz de incrementar la eficacia para el AH cuando se incorporan en liposomas de composición biomimética.

El desarrollo de esta tesis ha seguido un esquema “up-bottom” ya que se partió de observaciones fenomenológicas del comportamiento de formulaciones de liposomas de composición convencional con PC. Sin embargo, los resultados de permeación ratificaron nuestra hipótesis inicial sobre la relación entre capas planas como formas que activaban la permeación a través de la piel y sugirieron la necesidad de estudiar las interacciones específicas entre los lípidos que constituían los liposomas.

Estos resultados guiaron nuestra investigación hasta el estudio de los niveles de interacción molecular de los lípidos, para diseñar formulaciones farmacéuticas racionales biomiméticas, además de abrir nuevas perspectivas en relación al uso del AFM como técnica de predicción de la eficacia de los sistemas de administración transdérmica de fármacos.

Si bien, los resultados obtenidos en esta investigación han dado lugar al desarrollo de formulaciones farmacéuticas con un gran potencial para la administración tópica de fármacos, existen diversos factores a considerar en las sucesivas etapas del desarrollo farmacéutico. Por una parte, la agregación y fusión de las vesículas, así como la permeación del fármaco a través de la membrana vesicular hacen que la estabilidad de los sistemas vesiculares siga siendo un factor limitante para su uso a nivel comercial. Lo cual es un parámetro crítico en el desempeño del fármaco vehiculizado en los liposomas (26). Generalmente las formulaciones de liposomas no cumplen los criterios requeridos de estabilidad a largo plazo si se almacenan en suspensiones acuosas, debido a que el fármaco incorporado en las vesículas permea hacia el medio, lo que puede dar como resultado un cambio en su perfil farmacocinético del fármaco (27). Una de las alternativas que se ha propuesto para eliminar este inconveniente es la liofilización, diversos estudios han demostrado que la liofilización aumenta la estabilidad y la vida útil de las formulaciones basadas en liposomas, algunos de los liposomas en el mercado o en las fases de ensayos clínicos se presentan en forma de polvo liofilizado (28).

Otra alternativa susceptible a ser aplicada para solventar la estabilidad de las formulaciones basadas en liposomas, es la incorporación de la formulación liposomal en un gel o ungüento (29). Sin embargo, las formulaciones farmacéuticas desarrolladas en

la presente investigación pueden ser susceptibles a combinar alguna de las estrategias anteriormente expuestas para incrementar su estabilidad y vida útil, o bien pueden de ser aplicadas en un dispositivo especial, que permita almacenar de forma independiente los activadores de membrana y por otra los liposomas, de esta forma al momento de la aplicación se combinaría la cantidad adecuada de cada uno de los componentes para ser aplicados.

Finalmente, otro aspecto a considerar para continuar con el desarrollo farmacéutico de las formulaciones diseñadas en este estudio, es el escalado industrial. A principios de los años noventa fue comercializada la primera formulación farmacéutica basada en liposomas para aplicación tópica, esta vehiculizaba un antimicótico (Pevaryl creme, Janssen-Cilag), posteriormente algunos productos más formados por vesículas multilamelares hicieron su aparición. Es importante mencionar, que no todos los productos comercializados han tenido que someterse a evaluación en todas las fases clínicas que involucra el desarrollo farmacéutico, debido a que son considerados productos OTC *over the counter*, lo cual implica que no se requiere una prescripción médica para adquirirlos. Este es un factor importante a resaltar, debido a que los costes y tiempo implicados en los ensayos clínicos, representan la mayor inversión en el desarrollo de un producto farmacéutico.

En este sentido, el primer aspecto a evaluar son los costes de los materiales utilizados para la producción de los liposomas, generalmente se utiliza la fosfatidilcolina que es un fosfolípido natural ampliamente utilizado para la administración transdérmica de fármacos, debido a su bajo impacto en los costes de fabricación y su compatibilidad con los lípidos presentes en el estrato córneo, sin embargo cuando la composición de las vesículas es más compleja, como en nuestro caso el modelo de membrana diseñado para biomimetizar el estrato córneo, los costes pueden incrementar notoriamente, debido a que los lípidos utilizados requieren un proceso de extracción más complejo.

Es por ello que comparar la eficacia de cada una de las formulaciones puede ayudar a definir el costo beneficio de cada una de las formulas desarrolladas.

Capítulo 5.

Conclusiones



Conclusiones

Se confirmó que la adición de potenciadores de la permeación a liposomas mejora la liberación de ácido hialurónico e ibuprofeno a través de la piel humana.

El proceso de transformación de liposomas en bicapas lipídicas planas o estructuras de múltiples capas como se observó a través del AFM proporciona sentido para una alta concentración de fármaco permeado a través de la piel.

En consecuencia, este tipo de formulaciones son capaces de mejorar la biodisponibilidad local del ibuprofeno. Por lo tanto, podemos asumir que los liposomas cargados con ibuprofeno suplementados con surfactantes no iónicos logran el mismo efecto terapéutico que la formulación comercial evaluada.

Cuando los liposomas se depositan sobre superficies orgánicas (celulosa) o biointerfaces (piel) se convierten parcialmente interrumpidas, aplanadas y transformadas en cierta medida en bicapas lipídicas planas. PEs tienen un efecto definido en este proceso, que parece gobernado principalmente por la interacción entre las formulaciones de liposomas y la naturaleza de las superficies.

Se sabe que la liberación de fármacos de liposomas se ve aumentada por la incorporación de PEs en la fórmula. Sin embargo, nuestros AFM y FV mediciones nos llevan a concluir que las fuerzas de adhesión, entre otros factores, tales como la tensión interfacial, pueden estar detrás del complejo mecanismo de permeación a través de la piel.

El estudio monocapas con los principales componentes del *estrato córneo*, reveló información utilizada para desarrollar liposomas para la administración transdérmica de fármacos. La mezcla ternaria más estable de acuerdo con los parámetros termodinámicos eran PC- Chol -Cer (0,36: 0,24: 0,40, mol:mol:mol).

La composición de las vesículas ejerce un papel fundamental en el proceso de la deposición y posterior extensión sobre la piel humana. En las vesículas de PC-Chol-Cer se observaron incrementos en los valores medios de rugosidad y diferencias en las alturas de las estructuras formadas, en comparación con las formulaciones de PC.

Se puede correlacionar la información obtenida por medio de las imágenes de AFM con el efecto promotor de la permeación del fármaco incorporado en los liposomas. Para los fármacos estudiados, los valores de las F_{adh} más bajos favorecieron la permeación del fármaco encapsulado.

Capítulo 6.

Bibliografía



Bibliografía

1. Michael M. Liposomes and the skin. In: Gregoriadis G, A.T. F and PHM, editor. *Liposomes in Drug Delivery*. SWITZERLAND: harwood academic publishers; 1993. p. 125–35.
2. Thomas BJ, Finnin BC. The transdermal revolution. *Drug Discov Today*. 2004;9(16):697–703.
3. Escobar-Chávez J. Nanocarrier systems for transdermal drug delivery. *Recent Adv Nov Drug Carr Syst*. 2012;
4. Ritesh Bathe. Transdermal drug delivery system: formulation, development and evaluation-An overview. *Int J Biomed Adv Res*. 2014;05(01):79–80.
5. Allen TM, Cullis PR. Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science*. 2004;303(5665):1818–22.
6. Gregoriadis G A.T. F. Liposomes in drug delivery: clinical diagnostic and ophthalmic potential drugs. *Drugs*. 1993;45:15–28.
7. Shivakumar H, Narasimha S. Topical and Transdermal Drug delivery. In: Kulkarni VS, editor. *Handbook of non-invasive drug delivery systems and personal care products*. USA: Elsevier; 2010. p. 1–36.
8. El Maghraby GM, Williams AC, Barry BW. Can drug-bearing liposomes penetrate intact skin? *J Pharm Pharmacol*. The School of Pharmacy, Faculty of Medical and Health Sciences, University of Auckland, Private Bag 92019, Auckland, New Zealand.; 2006;58(4):415–29.
9. Cevc G, Blume G. Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. *Biochim Biophys Acta. Medizinische Biophysik-Forschungslaboratorien, Technischen Universitat Munchen, Germany.*; 1992 Feb 17;1104(1):226–32.
10. Elsayed MM, Abdallah OY, Naggar VF, Khalafallah NM. Lipid vesicles for skin delivery of drugs: reviewing three decades of research. *Int J Pharm*. Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, University of Alexandria, Egypt. 2007 Mar 6;332(1-2):1–16.

11. El Maghraby GM, Barry BW, Williams a C. Liposomes and skin: from drug delivery to model membranes. *Eur J Pharm Sci.* 2008 Aug 7;34(4-5):203–22.
12. Torin Huzil J, Sivaloganathan S, Kohandel M, Foldvari M. Drug delivery through the skin: Molecular simulations of barrier lipids to design more effective noninvasive dermal and transdermal delivery systems for small molecules, biologics, and cosmetics. *Wiley Interdiscip Rev Nanomedicine Nanobiotechnology.* 2011;3(5):449–62.
13. Hadgraft J, Lane ME. Skin permeation: The years of enlightenment. *Int J Pharm.* 2005;305(1-2):2–12.
14. Prausnitz MR, Langer R. Transdermal drug delivery. *Nat Biotechnol.* 2008;26(11):1261–8.
15. FDA Clinical trials [Internet]. [cited 2015 Jun 28]. Available from: https://clinicaltrials.gov/ct2/results/browse?term=transdermal+route&brwse=cond_alpha_q
16. Calatayud MA. Estudio de la administración transdérmica de fármacos para la migraña. Cardenal Herrera; 2013.
17. Menon GK. New insights into skin structure: Scratching the surface. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2002.
18. Bouwstra JA, Ponec M. The skin barrier in healthy and diseased state. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes.* 2006. p. 2080–95.
19. Flour M. Pathophysiology of vulnerable skin [Internet]. *World Wide Wounds.* 2009 [cited 2015 Jun 19]. Available from: <http://www.worldwidewounds.com/2009/September/Flour/vulnerable-skin-1.html>
20. Michaels A, Chandrasekaran, Shaw J. Drug Permeation Through Human Skin: Theory and in Vitro experimental Measurement. *AIChE J.* 1975;21(5):985–96.
21. Wertz PW. Lipids and barrier function of the skin. *Acta Dermato-Venereologica, Suppl.* 1999;(208):7–11.
22. Wertz, P. W., Bergh B. The physical, chemical and functional properties of lipids in the skin and other biological barriers. *Chem Phys Lipids.* 1998;91:85–96.

23. Rabionet M, Gorgas K, Sandhoff R. Ceramide synthesis in the epidermis. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. 2014;1841(3):422–34.
24. Masukawa Y, Narita H, Shimizu E, Kondo N, Sugai Y, Oba T, et al. Characterization of overall ceramide species in human stratum corneum. *J Lipid Res*. 2008;49:1466–76.
25. van Smeden J, Hoppel L, van der Heijden R, Hankemeier T, Vreeken RJ, Bouwstra JA. LC/MS analysis of stratum corneum lipids: ceramide profiling and discovery. *J Lipid Res*. 2011;52(6):1211–21.
26. Boncheva M. The physical chemistry of the stratum corneum lipids. *Int J Cosmet Sci*. 2014;36(6):505–15.
27. A. WK, S. RM. *Dermatological and Transdermal Formulations*. *Dermatological and Transdermal Formulations*. 2002. p. 1–39.
28. Baroni A, Buommino E, De Gregorio V, Ruocco E, Ruocco V, Wolf R. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clinics in Dermatology*. 2012. p. 257–62.
29. Barry B. Reflections on transdermal drug delivery. *Pharm Sci Technol Today* 2. 1999;41–3.
30. El Maghraby GM, Williams AC, Barry BW. Skin hydration and possible shunt route penetration in controlled estradiol delivery from ultradeformable and standard liposomes. *J Pharm Pharmacol*. 2001;53(10):1311–22.
31. Henry S, McAllister D V., Allen MG, Prausnitz MR. Microfabricated microneedles: A novel approach to transdermal drug delivery. *J Pharm Sci*. 1998;87(8):922–5.
32. Weaver JC, Vaughan TE, Chizmadzhev Y. Theory of electrical creation of aqueous pathways across skin transport barriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1999. p. 21–39.
33. Turner NG, Kalia YN, Guy RH. The effect of current on skin barrier function in vivo: Recovery kinetics post-iontophoresis. *Pharm Res*. 1997;14(9):1252–7.
34. Lee S, Kollias N, McAuliffe DJ, Flotte TJ, Doukas AG. Topical drug delivery in humans with a single photomechanical wave. *Pharm Res*. 1999;16(11):1717–21.

35. Barry BW. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2001. p. 101–14.
36. Barry BW. Is transdermal drug delivery research still important today? *Drug Discov Today*; 2001 Oct 1;6(19):967–71.
37. Du Plessis J, Pugh WJ, Judefeind A, Hadgraft J. Physico-chemical determinants of dermal drug delivery: Effects of the number and substitution pattern of polar groups. *Eur J Pharm Sci*. 2002;16(3):107–12.
38. Valenta C, Wanka M, Heidlas J. Evaluation of novel soya-lecithin formulations for dermal use containing ketoprofen as a model drug. *J Control Release*. 2000;63(1-2):165–73.
39. Bangham AD. Liposomes: the Babraham connection. *Chem Phys Lipids*. 1993;64(1-3):275–85.
40. Müller RH, Radtke M, Wissing SA. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2002.
41. Mason TG, Wilking JN, Meleson K, Chang CB, Graves SM. Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. *Journal of Physics: Condensed Matter*. 2006. p. R635–66.
42. Bangham AD. Surrogate cells or Trojan horses. The discovery of liposomes. *Bioessays*. 1995;17(12):1081–8.
43. Mezei M, Gulasekharam V. Liposomes - a selective drug delivery system for the topical route of administration. I. Lotion dosage form. *Life Sci*. 1980;26(18):1473–7.
44. Shivakumar HN, Narasimha S. Topical and Transdermal Drug delivery. In: Kulkarni VS, editor. *Handbook of non-invasive drug delivery systems and personal care products*. USA: Elsevier; 2010. p. 1–36.
45. Pierre MBR, Dos Santos Miranda Costa I. Liposomal systems as drug delivery vehicles for dermal and transdermal applications. *Arch Dermatol Res*. 2011 Nov;303(9):607–21.
46. Mezei M. Liposomes as a skin drug delivery system. In: Breimer DD, Speiser P, editors. *Topics in Pharmaceutical Sciences*. Amsterdam; 1985. p. 345–58.

47. Fresta M, Puglisi G. Corticosteroid dermal delivery with skin-lipid liposomes. *J Control Release*. 1997;44(2-3):141–51.
48. Ferreira LS, Ramaldes GA, Nunan EA, Ferreira LA. In vitro skin permeation and retention of paromomycin from liposomes for topical treatment of cutaneous leishmaniasis. *Drug Dev Ind Pharm*. 2004;30(3):289–96.
49. Puglia C, Trombetta D, Venuti V, Saija A, Bonina F. Evaluation of in-vivo topical anti-inflammatory activity of indometacin from liposomal vesicles. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 2004.
50. Bouwstra JA, Honeywell-Nguyen PL. Skin structure and mode of action of vesicles. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2002.
51. Honeywell-Nguyen PL, Bouwstra JA. Vesicles as a tool for transdermal and dermal delivery. *Drug Discov Today Technol*. 2005;2(1):67–74.
52. Sinico C, Fadda AM. Vesicular carriers for dermal drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*. 2009;6(8):813–25.
53. Handjani-Vila RM, Ribier A, Rondot B, Vanlerberghie G. Dispersions of lamellar phases of non-ionic lipids in cosmetic products. *Int J Cosmet Sci*. 1979;1(5):303–14.
54. Manconi M, Sinico C, Valenti D, Lai F, Fadda AM. Niosomes as carriers for tretinoin: III. A study into the in vitro cutaneous delivery of vesicle-incorporated tretinoin. *Int J Pharm*. 2006;311(1-2):11–9.
55. Paolino D, Cosco D, Muzzalupo R, Trapasso E, Picci N, Fresta M. Innovative bola-surfactant niosomes as topical delivery systems of 5-fluorouracil for the treatment of skin cancer. *Int J Pharm*. 2008;353(1-2):233–42.
56. Planas ME, Gonzalez P, Rodriguez L, Sanchez S, Cevc G. Noninvasive percutaneous induction of topical analgesia by a new type of drug carrier, and prolongation of local pain insensitivity by anesthetic liposomes. *Anesth Analg*. 1992;75(4):615–21.
57. Cevc G. Transdermal drug delivery of insulin with ultradeformable carriers. *Clinical Pharmacokinetics*. 2003. p. 461–74.
58. Cevc G, Blume G. New, highly efficient formulation of diclofenac for the topical, transdermal administration in ultradeformable drug carriers,

- Transfersomes. *Biochim Biophys Acta. Medizinische Biophysik*, Technische Universität München, Munich, Germany. cevc@idea-ag.de; 2001 Oct 1;1514(2):191–205.
59. Van den Bergh BA. Elastic liquid state vesicles as a tool for topical drug delivery. Leiden University The Netherlands; 1999.
 60. Honeywell-Nguyen PL, Arenja S, Bouwstra JA. Skin Penetration and Mechanisms of Action in the Delivery of the D 2-Agonist Rotigotine from Surfactant-Based Elastic Vesicle Formulations. *Pharm Res.* 2003;20(10):1619–25.
 61. Honeywell-Nguyen PL, Groenink HWW, De Graaff AM, Bouwstra JA. The in vivo transport of elastic vesicles into human skin: Effects of occlusion, volume and duration of application. *J Control Release.* 2003;90(2):243–55.
 62. Touitou E, Alkabes M DN. Ethosomes: novel lipid vesicular system for enhanced delivery. *Pharm Res.* 1997;305–6.
 63. Touitou E, Dayan N, Bergelson L, Godin B, Eliaz M. Ethosomes - Novel vesicular carriers for enhanced delivery: Characterization and skin penetration properties. *J Control Release.* 2000;65(3):403–18.
 64. Paolino D, Lucania G, Mardente D, Alhaique F, Fresta M. 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.* 2005;106(1-2):99–110.
 65. Elsayed MMA, Abdallah OY, Naggar VF, Khalafallah NM. Deformable liposomes and ethosomes as carriers for skin delivery of ketotifen. *Pharmazie.* 2007;62(2):133–7.
 66. Verma DD. Invasomes – novel topical carriers for enhanced topical delivery: characterization and skin penetration properties. Marburg/ Lahn; 2002.
 67. Dragicevic-Curic N, Scheglmann D, Albrecht V, Fahr A. Temoporfin-loaded invasomes: Development, characterization and in vitro skin penetration studies. *J Control Release.* 2008;127(1):59–69.
 68. Dragicevic-Curic N, Gräfe S, Gitter B, Fahr A. Efficacy of temoporfin-loaded invasomes in the photodynamic therapy in human epidermoid and colorectal tumour cell lines. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2010;101(3):238–50.

69. Trauer S, Richter H, Kuntsche J, Büttemeyer R, Liebsch M, Linscheid M, et al. Influence of massage and occlusion on the ex vivo skin penetration of rigid liposomes and invasomes. *Eur J Pharm Biopharm.* 2014;86(2):301–6.
70. Vázquez-González, M.L., Bernad, R., Calpena, A.C. DÒ. Improving ex vivo skin permeation of non-steroidal anti-inflammatory drugs: Enhancing extemporaneous transformation of liposomes into planar lipid bilayers. *Int J Pharm.* 2013;461:427–36.
71. Flaten GE, Dhanikula AB, Luthman K, Brandl M. Drug permeability across a phospholipid vesicle based barrier: A novel approach for studying passive diffusion. *Eur J Pharm Sci.* 2006;27(1):80–90.
72. Flaten GE, Bunjes H, Luthman K, Brandl M. Drug permeability across a phospholipid vesicle-based barrier. 2. Characterization of barrier structure, storage stability and stability towards pH changes. *Eur J Pharm Sci.* 2006;28(4):336–43.
73. Kanzer J, Tho I, Flaten GE, Hölig P, Fricker G, Brandl M. In-vitro permeability screening of melt extrudate formulations containing poorly water-soluble drug compounds using the phospholipid vesicle-based barrier. *J Pharm Pharmacol.* 2010;62(11):1591–8.
74. Flaten GE, Kottra G, Stensen W, Isaksen G, Karstad R, Svendsen JS, et al. In vitro characterization of human peptide transporter hPEPT1 interactions and passive permeation studies of short cationic antimicrobial peptides. *J Med Chem.* 2011;54(7):2422–32.
75. Flaten GE, Awoyemi O, Luthman K, Brandl M, Massing U. The Phospholipid Vesicle-Based Drug Permeability Assay: 5. Development Toward an Automated Procedure for High-Throughput Permeability Screening. *JALA - J Assoc Lab Autom.* 2009;14(1):12–21.
76. Ciotti SN, Weiner N. Follicular liposomal delivery systems. *J Liposome Res.* Johnson & Johnson Consumer Products, Skillman, NJ 08558, USA.; 2002;12(1-2):143–8.
77. Niemiec SM, Ramachandran C, Weiner N. Influence of nonionic liposomal composition on topical delivery of peptide drugs into pilosebaceous units: an in vivo study using the hamster ear model. *Pharm Res.* College of Pharmacy, University of Michigan, Ann Arbor 48109-1065, USA.; 1995;12(8):1184–8.
78. Touitou E, Levi-Schaffe F, Dayan N, Alhaique F, Ricciari F. Modulation of caffeine skin delivery by carrier design: Liposomes versus permeation enhancers.

- Int J Pharm. 1994;103:131–6.
79. Ganesan MG, Weiner ND, Flynn GL, Ho NFH. Influence of liposomal drug entrapment on percutaneous absorption. *International Journal of Pharmaceutics*. 1984. p. 139–54.
 80. Kato A, Ishibashi Y, Miyake Y. Effect of egg yolk lecithin on transdermal delivery of bunazosin hydrochloride. *J Pharm Pharmacol*. 1987;39(5):399–400.
 81. Leopold CS, Lippold BC. Enhancing effects of lipophilic vehicles on skin penetration of methyl nicotinate in vivo. *J Pharm Sci*. 1995;84(2):195–8.
 82. El Maghraby GM, Williams AC, Barry BW. Skin delivery of oestradiol from deformable and traditional liposomes: mechanistic studies. *J Pharm Pharmacol*;51(10):1123–34.
 83. Zellmer S, Pfeil W, Lasch J. Interaction of phosphatidylcholine liposomes with the human stratum corneum. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 1995;1237(2):176–82.
 84. El Maghraby GMM, Williams AC, Barry BW. Skin delivery of oestradiol from lipid vesicles: Importance of liposome structure. *Int J Pharm*. 2000;204(1-2):159–69.
 85. Kirjavainen M, Urtti A, Jääskeläinen I, Marjukka Suhonen T, Paronen P, Valjakka-Koskela R, et al. Interaction of liposomes with human skin in vitro - The influence of lipid composition and structure. *Biochim Biophys Acta - Lipids Lipid Metab*. 1996;1304:179–89.
 86. Cevc G, Gebauer D, Stieber J, Schatzlein A, Blume G. Ultraflexible vesicles, Transfersomes, have an extremely low pore penetration resistance and transport therapeutic amounts of insulin across the intact mammalian skin. *Biochim Biophys Acta*; 1998;1368(2):201–15.
 87. Han I, Kim M, Kim JC. Enhanced transfollicular delivery of adriamycin with a liposome and iontophoresis. *Exp Dermatol*. 2004;13(2):86–92.
 88. Singh P, Roberts MS. Skin permeability and local tissue concentrations of nonsteroidal anti-inflammatory drugs after topical application. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994;268(1):144–51.
 89. Hadgraft J, du Plessis J, Goosen C. The selection of non-steroidal anti-

- inflammatory agents for dermal delivery. *Int J Pharm.*;207(1-2):31–7.
90. Mitragotri S, Johnson ME, Blankschtein D, Langer R. An analysis of the size selectivity of solute partitioning, diffusion, and permeation across lipid bilayers. *Biophys J.* 1999;77(3):1268–83.
 91. Shah AK, Wei G, Lanman RC, Bhargava VO, Weir SJ. Percutaneous absorption of ketoprofen from different anatomical sites in man. *Pharm Res.* 1996;13(1):168–72.
 92. Kretsos K, Kasting GB. Dermal capillary clearance: Physiology and modeling. *Skin Pharmacology and Physiology.* 2005. p. 55–74.
 93. Singh P, Roberts MS. Dermal and underlying tissue pharmacokinetics of lidocaine after topical application. *J Pharm Sci.* 1994;83(6):774–82.
 94. Heyneman CA, Lawless-Liday C, Wall GC. Oral versus topical NSAIDs in rheumatic diseases: a comparison. *Drugs.* 2000;60(3):555–74.
 95. Higaki K, Asai M, Suyama T, Nakayama K, Ogawara KI, Kimura T. Estimation of intradermal disposition kinetics of drugs: II. Factors determining penetration of drugs from viable skin to muscular layer. *Int J Pharm.* 2002;239(1-2):129–41.
 96. Kriwet K, Müller-Goymann CC. Diclofenac release from phospholipid drug systems and permeation through excised human stratum corneum. *Int J Pharm.* 1995;125(2):231–42.
 97. Cevc G, Vierl U, Mazgareanu S. Functional characterisation of novel analgesic product based on self-regulating drug carriers. *Int J Pharm.* 2008;360(1-2):18–28.
 98. El Zaafarany GM, Awad GAS, Holayel SM, Mortada ND. Role of edge activators and surface charge in developing ultradeformable vesicles with enhanced skin delivery. *Int J Pharm.* 2010;397(1-2):164–72.
 99. Shahiwala A, Misra A. Studies in topical application of niosomally entrapped Nimesulide. *J Pharm Pharm Sci.* 2002;5(3):220–5.
 100. Rainsford KD. Ibuprofen: Pharmacology, efficacy and safety. *Inflammopharmacology.* 2009. p. 275–342.
 101. Arapoglou V, Katsenis K, Syrigos KN, Dimakakos EP, Zakopoulou N, Gjødsbøl K, et al. Analgesic efficacy of an ibuprofen-releasing foam dressing compared

- with local best practice for painful exuding wounds. *J Wound Care*. 2011;20(7):319–20, 322–5.
102. Sibbald RG, Coutts P, Fierheller M, Woo K. A pilot (real-life) randomised clinical evaluation of a pain-relieving foam dressing: (Ibuprofen-foam versus local best practice). *Int Wound J*. 2007;4(SUPPL.1):16–23.
 103. Cigna E, Tarallo M, Bistoni G, Anniboletti T, Trignano E, Tortorelli G, et al. Evaluation of polyurethane dressing with ibuprofen in the management of split-thickness skin graft donor sites. *In Vivo* 2009;23(6):983–6.
 104. Carafa M, Marianecchi C, Di Marzio L, Rinaldi F, Meo C, Matricardi P, et al. A new vesicle-loaded hydrogel system suitable for topical applications: preparation and characterization. *J Pharm Pharm Sci*; 2011;14(3):336–46.
 105. Nie T, Wong CC, Alston N, Aro P, Constantinides PP, Rigas B. Phospho-ibuprofen (MDC-917) incorporated in nanocarriers: Anti-cancer activity in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol*. 2012;166(3):991–1001.
 106. Demidova-Rice TN, Hamblin MR, Herman IM. Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 1: normal and chronic wounds: biology, causes, and approaches to care. *Adv Skin Wound Care*. 2012;25(7):304–14.
 107. Jiang D, Liang J, Noble PW. Hyaluronan in tissue injury and repair. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2007;23:435–61.
 108. Longaker MT, Adzick NS, Hall JL, Stair SE, Crombleholme TM, Duncan BW, et al. Studies in fetal wound healing, VII. Fetal wound healing may be modulated by hyaluronic acid stimulating activity in amniotic fluid. *J Pediatr Surg*. 1990;25(4):430–3.
 109. Fraser JR, Laurent TC, Laurent UB. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med*. 1997;242(1):27–33.
 110. Neudecker BA, Csoka AB, Mio K, Maibach HI SR. Hyaluronan: the natural skin moisturizer. In: P E, HI M, editors. *Cosmeceuticals Drugs vs Cosmetics*. New York; 2000.
 111. Wiest L, Kerscher M. Native hyaluronic acid in dermatology--results of an expert meeting. *Journal of the German Society of Dermatology : JDDG*. 2008. p. 176–80.

112. Engström-Laurent A. Changes in hyaluronan concentration in tissues and body fluids in disease states. *Ciba Found Symp.* 1989;143:233–40; discussion 240–7, 281–5.
113. Engström-Laurent A, Laurent UB, Lilja K, Laurent TC. Concentration of sodium hyaluronate in serum. *Scand J Clin Lab Invest.* 1985;45(6):497–504.
114. Stern R, Maibach HI. Hyaluronan in skin: aspects of aging and its pharmacologic modulation. *Clin Dermatol.* 2008;26(2):106–22.
115. Longas MO, Russell CS, He XY. Evidence for structural changes in dermatan sulfate and hyaluronic acid with aging. *Carbohydr Res.* 1987;159(1):127–36.
116. Greco RM, Iocono JA, Ehrlich HP. Hyaluronic acid stimulates human fibroblast proliferation within a collagen matrix. *J Cell Physiol.* 1998;177:465–73.
117. Voigt J, Driver VR. Hyaluronic acid derivatives and their healing effect on burns, epithelial surgical wounds, and chronic wounds: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Wound Repair Regen.* 2012;20:317–31.
118. Weigel PH, Frost SJ, LeBoeuf RD, McGary CT. The specific interaction between fibrin(ogen) and hyaluronan: possible consequences in haemostasis, inflammation and wound healing;143:248–61.
119. Manna F, Dentini M, Desideri P, De Pità O, Mortilla E, Maras B. Comparative chemical evaluation of two commercially available derivatives of hyaluronic acid (Hylaform® from rooster combs and Restylane® from streptococcus) used for soft tissue augmentation. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 1999;13(3):183–92.
120. Price RD, Berry MG, Navsaria HA. Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence. *Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery.* 2007. p. 1110–9.
121. Risberg B. Adhesions: preventive strategies. *Eur J Surg Suppl.* 1997;(577):32–9.
122. Balazs EA, Denlinger JL. Viscosupplementation: A new concept in the treatment of osteoarthritis. *Journal of Rheumatology.* 1993. p. 3–9.
123. Raymond C R, Paul J S MEQ. *Handbook Pharmaceutical Excipients*, Sixth Edition. 2009;
124. Fischmeister I, Hellgren L, Vincent J. Infrared spectroscopy for tracing of

- topically applied ointment vehicles and active substances on healthy skin. *Arch Dermatol Res.* 1975;253(1):63–9.
125. Foreman MI, Clanachan I, Kelly IP. The diffusion of nandrolone through occluded and non-occluded human skin. *J Pharm Pharmacol.* 1978;30(3):152–7.
 126. Brody I. Ultrastructure of the stratum corneum. *Int J Dermatol.* 1977;16:245–56.
 127. Ruozi B, Tosi G, Leo E, Vandelli MA. Application of atomic force microscopy to characterize liposomes as drug and gene carriers. *Talanta.*; 2007;73(1):12–22.
 128. Ruozi B, Tosi G, Forni F, Fresta M, Vandelli MA. Atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy: two techniques for rapid characterization of liposomes. *Eur J Pharm Sci.*; 2005 May;25(1):81–9.
 129. Sitterberg J, Ozcetin A, Ehrhardt C, Bakowsky U. Utilising atomic force microscopy for the characterisation of nanoscale drug delivery systems. *Eur J Pharm Biopharm.* 2010;74(1):2–13.
 130. Fung CK, Xi N, Yang R, Seiffert-Sinha K, Lai KW, Sinha AA. Quantitative analysis of human keratinocyte cell elasticity using atomic force microscopy (AFM). *IEEE Trans Nanobioscience.*; 2011 Mar;10(1):9–15.
 131. Gaikwad RM, Vasilyev SI, Datta S, Sokolov I. Atomic force microscopy characterization of corneocytes: Effect of moisturizer on their topology, rigidity, and friction. *Ski Res Technol.* 2010;16(3):275–82.
 132. Binnig G, Quate CF. Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters.* 1986. p. 930–3.
 133. Gerber C, Lang HP. How the doors to the nanoworld were opened. *Nat Nanotechnol.* 2006;1(1):3–5.
 134. Ralston J, Larson I, Rutland MW, Feiler AA, Kleijn M. Atomic force microscopy and direct surface force measurements (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry.* 2005. p. 2149–70.
 135. Shibata M, Yamashita H, Uchihashi T, Kandori H, Ando T. High-speed atomic force microscopy shows dynamic molecular processes in photoactivated bacteriorhodopsin. *Nat Nanotechnol.* 2010;5(3):208–12.
 136. Garcia-Manyes S, Sanz F. Nanomechanics of lipid bilayers by force spectroscopy

- with AFM: A perspective. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. 2010. p. 741–9.
137. Schneider J, Dufrêne YF, Barger WR, Lee GU. Atomic force microscope image contrast mechanisms on supported lipid bilayers. *Biophys J*. 2000;79(2):1107–18.
 138. Menon GK, Cleary GW, Lane ME. The structure and function of the stratum corneum. *International Journal of Pharmaceutics*. 2012. p. 3–9.
 139. Roberts MS, Walters KA. *Dermal Absorption and Toxicity Assessment*. *Drugs and the Pharmaceutical Sciences*. 1998. 785 p.
 140. Irfan M, Verma S, Ram A. Preparation and characterization of Ibuprofen loaded transferosome as a novel carrier for transdermal drug delivery system. *Asian J Pharm Clin Res*. 2012;5(3):162–5.
 141. Peppas NA. Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers. *Pharm Acta Helv.*; 1985;60(4):110–1.
 142. Cevc G, Blume G. Hydrocortisone and dexamethasone in very deformable drug carriers have increased biological potency, prolonged effect, and reduced therapeutic dosage. *Biochim Biophys Acta*. 2004 May 27;1663(1-2):61–73.
 143. Wachter C, Vierl U, Cevc G. Adaptability and elasticity of the mixed lipid bilayer vesicles containing non-ionic surfactant designed for targeted drug delivery across the skin. *J Drug Target* ; 2008;16(7):611–25.
 144. Hofland HE, Bouwstra JA, Boddé HE, Spies F, Junginger HE. Interactions between liposomes and human stratum corneum in vitro: freeze fracture electron microscopical visualization and small angle X-ray scattering studies. *Br J Dermatol*. 1995;132(6):853–66.
 145. Simões SI, Tapadas JM, Marques CM, Cruz MEM, Martins MBF, Cevc G. Permeabilisation and solubilisation of soybean phosphatidylcholine bilayer vesicles, as membrane models, by polysorbate, Tween 80. *Eur J Pharm Sci*. 2005;26:307–17.
 146. Romero EL, Morilla MJ. Highly deformable and highly fluid vesicles as potential drug delivery systems: Theoretical and practical considerations. *International Journal of Nanomedicine*. 2013. p. 3171–86.
 147. Wilschut J. Membrane fusion in lipid vesicle systems. In: Wilschut, J., Hoekstra

- D, editor. Membrane fusion. New York: Marcel Dekker Inc; 1991. p. 89–126.
148. Wertz PW, Abraham W, Landmann L, Downing DT. Preparation of liposomes from stratum corneum lipids. *The Journal of investigative dermatology*. 1986. p. 582–4.
 149. Tokudome Y, Saito Y, Sato F, Kikuchi M, Hinokitani T, Goto K. Preparation and characterization of ceramide-based liposomes with high fusion activity and high membrane fluidity. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2009;73(1):92–6.
 150. Suhonen M, Li SK, Higuchi WI, Herron JN. A liposome permeability model for stratum corneum lipid bilayers based on commercial lipids. *J Pharm Sci*. 2008;97(10):4278–93.
 151. Gaur PK, Mishra S, Purohit S, Kumar Y, Bhandari A. Development of a new nanovesicle formulation as transdermal carrier: Formulation, physicochemical characterization, permeation studies and anti-inflammatory activity. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2013;(July):1–8.
 152. Madison KC. Barrier function of the skin: “la raison d’etre” of the epidermis. *J Invest Dermatol.*; 2003;121(2):231–41.
 153. Moghaddam B, Ali MH, Wilkhu J, Kirby DJ, Mohammed AR, Zheng Q, et al. The application of monolayer studies in the understanding of liposomal formulations. *Int J Pharm.*; 2011;417(1-2):235–44.
 154. Picas L, Milhiet PE, Hernandez-Borrell J. Atomic force microscopy: A versatile tool to probe the physical and chemical properties of supported membranes at the nanoscale. *Chem Phys Lipids*; 2012;165(8):845–60.
 155. Vázquez-González ML, Bernad R, Calpena AC, Domènech O, Montero MT, Hernández-Borrell J. Improving ex vivo skin permeation of non-steroidal anti-inflammatory drugs: Enhancing extemporaneous transformation of liposomes into planar lipid bilayers. *Int J Pharm*. 2014;461(1-2):427–36.
 156. El Maghraby GMM, Williams AC, Barry BW. Can drug-bearing liposomes penetrate intact skin? *J Pharm Pharmacol*. 2006;58(4):415–29.
 157. Nounou MI, El-Khordagui LK, Khalafallah NA, Khalil SA. Liposomal formulation for dermal and transdermal drug delivery: past, present and future. *Recent Pat Drug Deliv Formul*. 2008;2:9–18.

158. Chen C, Han D, Cai C, Tang X. An overview of liposome lyophilization and its future potential. *J Control Release*. 2010;142(3):299–311.
159. Sharma A, Sharma US. Liposomes in drug delivery: Progress and limitations. *Int J Pharm*. 1997;154(2):123–40.
160. Martin FJ. Pharmaceutical manufacturing of liposomes. In: P T, editor. *Specialized drug delivery systems, manufacturing and production technology*. New York : Marcel Dekker Inc; 1990. p. 267–316.

Apéndices



Apéndice A

Abreviaturas

AH	Acido hialurónico
AFM	Microscopio de fuerza atómica
PEs	Promotores de la permeación
PC	Fosfatidilcolina
SLBs	Bicapas lipídicas soportadas
EC	estrato córneo
Chol	Colesterol
Cer	Ceramidas
F_{adh}	Fuerza de adhesión
C_s	Módulo de compresibilidad
LB	Langmuir-Blodgett

Apéndice B

Contribuciones a congresos relacionados con esta Tesis

Vázquez-González,M.L, Calpena AC, Doménech Ò, Hernández-Borrell J

“Interaction of liposomes for transdermal drug delivery onto the human skin using atomic force microscopy”

Poster

4th Nano Today conference, Dubai (2015)

Vázquez-González,M.L, Calpena AC, Doménech Ò, Hernández-Borrell J

“Accessing to deep layers of the skin: development of liposomal formulation to enhance transdermal permeation of hyaluronic acid”

Poster

Skin Forum 14th Annual Meeting, Praga, Republica Checa (2014)

Vázquez-González,M.L, Calpena AC, Doménech Ò, Hernández-Borrell J

“Effect of liposomes as Transdermal Drug Delivery on the human skin: Study of the Nanomechanical changes”

Poster

Congreso: 5^a Jornada del Institut de Nanociència i Nanotecnologia In²UB, Barcelona, Spain (2014)

Vázquez-González,M.L

“Development of drug delivery systems to improve transdermal permeation”

Comunicación oral

Jornada d’Investigadors Predoctorals Interdisciplinària, Barcelona, Spain (2014)

Vázquez-González,M.L, Calpena AC, Domenech O, Hernandez-Borell J

“Nanomechanical study of Human Skin using the Atomic Force Microscopy: Effect of Supported Lipid Bilayers on its Viscoelastic Properties”

Poster

5 th International conference on mechanics of biomaterials and tissues, Sitges, Spain
(2013)

Vázquez-González,M.L, Calpena AC, Domenech O, Bernad R, Hernandez-Borell J

“Enhance of hyaluronic acid release: Development of the transformation of liposomes into planar lipid bilayers”

Comunicación oral y Poster

X Spanish-Portuguese Conference on Controlled Drug Delivery, Valencia , Spain
(2013)

Vázquez-González,M.L

“Improving transdermal permeation of hyaluronic acid through the transition of liposomes into planar lipid bilayers”

Comunicación oral

Skin Forum 13th Annual Meeting, Londres, Reino Unido (2013)

Vázquez-González,M.L, Calpena AC, Domenech O, Bernad R, Hernandez-Borell J

“Characterization and in vitro skin permeation of liposomes with an anti inflammatory drug”

Póster

Skin and Formulations, Lyon, Francia (2012)

Vázquez-González,M.L Calpena AC, Domenech O, Bernad R, Hernandez-Borell J.

“Improved in vitro skin permeation of liposomes with an anti-inflammatory drug through planar bilayers”

Póster

5ª Jornada del Institut de Nanociència i Nanotecnologia In²UB, Barcelona, España
(2012)

Interaction of liposomes for transdermal drug delivery onto the human skin using atomic force microscopy

Authors & affiliations:

Vázquez-González, M.L.^a, Calpena A^b., Domènech, O.^a, Hernandez-Borrell, J.^a

^a Department of Physical chemistry, Faculty of Pharmacy,, University of Barcelona, Spain

^b Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy,, University of Barcelona, Spain

Abstract: (Your abstract must use **Normal style** and must fit in this box. Your abstract should be no longer than 300 words. The box will 'expand' over 2 pages as you add text/diagrams into it.)

Introduction. Transdermal drug delivery (TDD) has made great advances in last decades as alternative of oral delivery and hypodermic injection. However, no all drugs are suitable to administrate by this route and new efforts are focused in understand how drugs can penetrate the *Stratum Corneum* (SC) barrier to reach the deep skin layers. Liposomes have been used before as topical drug delivery system, however the liberation of drugs to the skin is not fully understood. The Atomic Force Microscopy (AFM) has been demonstrated as a valuable tool to unveil the nanostructure of many tissues and cells as well as a technique to quantify the molecular interaction between different drugs with biological samples.

Methods: To bring light to how drugs can permeate trough the SC, in this study we have studied how the different liposome formulations could enhance the delivery of drugs through the SC through the formation of planar lipid bilayers. These formulations have been characterized by AFM observing the interactions of the liposomes with human skin including characterization of its nanomechanical properties.

Results: We have evaluated the structures formed by the different liposome formulations on SC by AFM. We observed that liposomes tend to form planar lipid structures on the human skin. In one hand liposomes with ibuprofen supplemented with Tween 80[®] (Figure 1C and D) showed an homogenously covering of the surface of the skin evidenced by the holes (black arrows in the image) formed due to defects on the

skin surface. On the other hand the commercial formulation ibufen[®] didn't cover the skin surface but formed round structures on it.

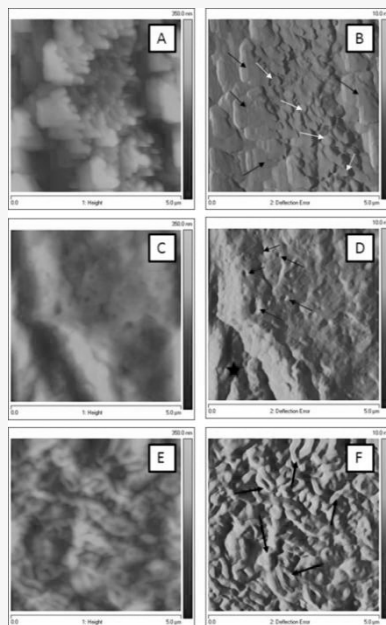


Figure 1. AFM height and deflection images from different liposome formulations applied onto human skin.

Discussion: In this study we obtained relevant information related to how the formulations studied can liberate the drug from liposomes towards the SC trough the formation of planar lipid layers covering the skin. These observations open new perspectives to understand the different drug permeation depending on the formulation applied in the TDD.

Accessing to deep layers of the skin: development of liposomal formulation to enhance transdermal permeation of hyaluronic acid

Martha L. Vázquez-González⁴, Ana C. Calpena^{2,3}, Oscar Domènech^{1,3}, Jordi Hernández-Borrell^{1,3}

¹ Department of Physical chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona, Spain

² Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona Spain

³ Institut de Nanociència i Nanotecnologia IN²UB, Barcelona, Spain

Hyaluronic acid is the major component of the skin extracellular matrix and is involved in different biologic processes such as hydration, nutrient exchange, and cell differentiation and motility (Wiest & Kerscher, 2008).

Liposomal formulations as transdermal drug delivery systems have been widely used to improve drug permeation of different drugs. Our previous studies strongly suggest that the formation of supported lipid bilayers (SLBs) onto the skin is related with the increase of the permeation of drugs through the stratum corneum². (Martha L. Vázquez-González, et.al, 2013)

In this work we developed and characterized liposomal formulations incorporating different penetration enhancers (PE's). Liposomes were prepared using L- α Phosphatidylcholine and hyaluronic acid, once prepared Tween 80 and Transcutol were incorporated to promote the transformation of the liposomes into planar lipids bilayers. *Ex vivo* permeation studies were performed using Franz diffusion cells and human skin obtained from abdominoplasty surgery with thickness from 400 to 200 μm was used as permeation membrane.

According with the results, liposomal formulation without PE's can be effective for local effects due to their capacity to retain the highest quantities of hyaluronic acid. In contrasts, incorporation of PE's of the liposomes with hyaluronic acid are capable to permeated to the deepest layers of the skin and can be reach a systemic effect.

Acknowledgments: Vázquez-González M.L is a recipient of fellowship from CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México).

Nanomechanical changes of the human skin: Effect of liposomes as Transdermal Drug Delivery

Vázquez-González M.L.(1), Calpena AC(2), Doménech Ò(1), Hernández-Borrell J(1)

(1) Departament of Physical chemistry, Faculty of Pharmacy, Barcelona University, Barcelona, Spain

(2) Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Spain

The use of liposomes as drug delivery system for topical application has been exploited extensively in past decades. The hardness and elastic modulus of the outer layer of skin (keratin layer) are important for the effective and accurate delivering of drugs¹. Our studies strongly suggest that the formation of supported lipid bilayers (SLBs) onto the skin is related with the increase of the permeation of drugs through this barrier².

In the present study we have used the force spectroscopy mode of atomic force microscopy (FS-AFM) to investigate the nanomechanical properties of human skin with and without the presence of SLBs formed under different conditions. The tissue was characterized by obtaining force maps of the scanned areas. From these images, cover and uncovered by SLBs of different compositions and loaded with several drugs, we can estimate the adhesion forces of the different regions studied.

The results obtained in this study show significant differences in adhesion force, enabling for nanomechanical differentiation between the skin and the SLB formed from liposomes deposited onto the tissue. AFM images and force curves of several samples were evaluated evidencing an increase of adhesion forces in the human skin covered by SLB of liposomal formulation with different drugs.

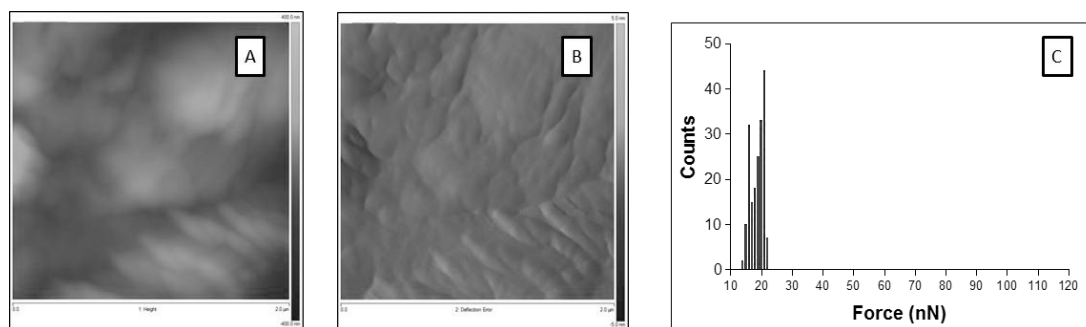


Figure 1. AFM images of natural human skin, height (A) and deflection (B) images. Histogram represents adhesion forces of human skin without SLB (C).

¹ Kendall, M.A.F., Chong, Y.F. & Cock, A. “The mechanical properties of the skin epidermis in relation to targeted gene and drug delivery”. *Biomaterials* 28, 4968–4977. (2007).

² Vázquez-González, M.L., et al., “Improving ex vivo skin permeation of non-steroidal anti-inflammatory drugs: Enhancing extemporaneous transformation of liposomes into planar lipid bilayers”. *Int. J. Pharm.*, 461, 427-436 (2013).

Nanomechanical Study of Human Skin using the Atomic Force Microscope: Effect of Supported Lipid Bilayers on its Viscoelastic Properties

Authors & affiliations:

Vázquez-González, M.L., Hernandez-Borrell, J., Domènech, O.

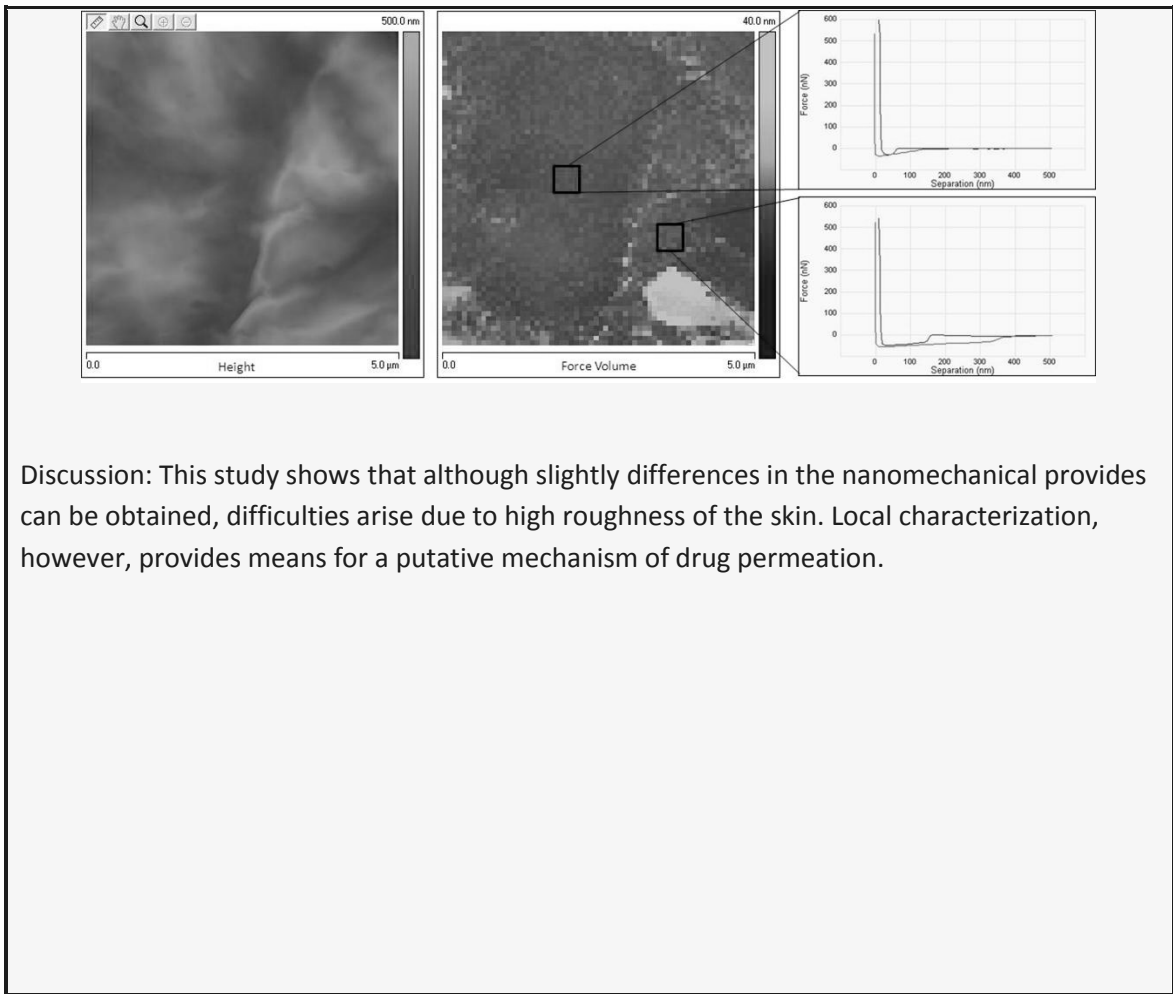
Departament de Físicoquímica, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Spain

Abstract: (Your abstract must use **Normal style** and must fit in this box. Your abstract should be no longer than 300 words. The box will 'expand' over 2 pages as you add text/diagrams into it.)

Introduction: The use of liposomes as drug delivery system for topical application has been exploited extensively in the past decades. However, the interaction of liposomes with the skin is not well established. In one hand, our studies strongly suggest that the formation of supported lipid bilayers (SLBs) on the skin is related with the increase of the permeation of drugs through the human skin. On the other hand, Atomic Force Microscopy (AFM) has emerged as a powerful technique to characterize mechanical properties of thin films at the nanoscale. Therefore, in this study we have used the force spectroscopy (FS) mode of AFM to investigate the nanomechanical properties of human skin with and without the presence of SLBs spread under different conditions.

Methods: Human skin (400 μm of thickness) was glued onto a magnetic steel disc through double-sided scotch, cleaned with a solution of 60% of ethanol and dried under a nitrogen stream to remove any contaminant adsorbed on it. Afterwards, the sample was mounted on the AFM and scanned in contact mode and in air. Environment was maintained at 24 $^{\circ}\text{C}$ and 60 % of humidity.

Results: The tissue was characterized through FS-AFM obtaining force maps of the scanned areas. From these images, cover and uncovered by SLBs of different compositions and loaded with several drugs, we can differentiate the adhesion forces of the regions studied.



Discussion: This study shows that although slightly differences in the nanomechanical provides can be obtained, difficulties arise due to high roughness of the skin. Local characterization, however, provides means for a putative mechanism of drug permeation.

ENHANCE OF HYALURONIC ACID RELEASE: DEVELOPMENT OF THE TRANSFORMATION OF LIPOSOMES INTO PLANAR LIPID BILAYERS

Vázquez-González M.L.¹, Calpena AC², Domenech O¹, Bernad R³, Hernandez-Borell J¹

¹Departament of Physical chemistry, Faculty of Pharmacy, Barcelona University, Barcelona, Spain

² Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Spain

³ Labiana Pharmaceuticals S.L.U

INTRODUCTION

Liposomes are colloidal vesicles formed basically by phospholipids. Liposomes are capable of encapsulating hydrophilic molecules in the aqueous internal space or lipophilic and amphiphilic molecules their concentric bilayers¹.

The use of liposomes as drug delivery systems has been developed for many years and at present is considered of great potential. Specifically, transdermal delivery of drugs has shown reduce the main the skin barrier: stratum corneum².

Although a large number of transdermal studies have used liposomes that carry a variety of therapeutic agents, there is no experimental evidence explaining how the effect of the drugs encapsulated is achieved and related to the carrier structure³.

Hyaluronic acid it is present in the intercellular matrix of most vertebrate connective tissues, especially in the skin. Its biocompatibility lead to its use in medical and pharmaceuticals applications, as a supplemental for joint fluid arthritis patients and regeneration of surgical wounds⁴.

We have used the concept of supported lipid bilayer systems⁵ to enhance hyaluronic acid release promoting the transformation of liposomes into planar structures onto the skin.

In this study we prepared different formulations of elastic liposomes with the aim of enhancing skin delivery through the formation of planar lipid bilayers. These formulations are formed from LUVs loaded with hyaluronic acid and small amounts of various enhancers like Tween 65[®], Tween 80[®] and Transcutol[®].

RESULTS AND DISCUSION

Understanding the kinetics of drug release is a prerequisite to improve or design topical drug delivery formula. In this study, we have prepared liposomes containing hyaluronic acid. Different surfactants has been incorporated with the aim to slightly destabilized the lipid membrane and to promote the formation of supported lipid bilayer systems when are spreading on the surface. According with the release study results, incorporation of surfactants promotes the release of hyaluronic acid to the receptor media.

Release profiles indicated a sustained delivery of hyaluronic acid from liposomal formulations. The highest percentages of hyaluronic acid delivered were obtained from the formulation with Transcutol[®] with 84.01 %.

The values obtained in release studies was fitting in different kinetic models, the results shows that release of hyaluronic acid take place according to Korsmeyer- Peppas kinetic model. Due to release exponent values are below 0.43, diffusion is the principal mechanism of drug release from the formulations.

REFERENCES

- ¹Shivakumar HN, Narasimha S. Topical and Transdermal Drug delivery. In: Vitthal S. Kulkarni, editor. Handbook of non-invasive drug delivery systems and personal care products. 1st ed. USA: Elsevier; 2010. p. 1-36.
- ²Pierre MB, Dos Santos Miranda Costa I. Liposomal systems as drug delivery vehicles for dermal and transdermal applications. Arch Dermatol Res 2011 Nov;303(9):607-621.
- ³Bahia AP, Azevedo EG, Ferreira LA, Frezard F. New insights into the mode of action of ultradeformable vesicles using calcein as hydrophilic fluorescent marker. Eur J Pharm Sci 2010 Jan 31;39(1-3):90-96.
- ⁴Brown, M. and Jones, S. (2005), Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, 19: 308–318.
- ⁵Tanaka M, Sackmann E. Polymer-supported membranes as models of the cell surface. Nature 2005 Sep 29;437(7059):656-663.

Improving transdermal permeation of hyaluronic acid through the transition of liposomes into planar lipid bilayers

Martha Vázquez^{1,4}, Rafael Bernad⁴, Ana Calpena^{2,3}, Oscar Domènech^{1,3}, Jordi Hernández-Borrell^{1,3*}

¹ Department of Physical chemistry, Faculty of Pharmacy, Barcelona University, Barcelona, Spain

² Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Barcelona University, Barcelona Spain

³ Institut de Nanociència i Nanotecnologia IN²UB, Barcelona, Spain

⁴ Labiana Pharmaceuticals S.L.U., Barcelona, Spain

Liposomal formulations as transdermal drug delivery systems have been widely used to improve drug permeation and deposition in the stratum corneum of different drugs.

However the mechanism in which the formulations achieve these results is not completely clear. In this work we have prepared different liposomal formulations with the aim to improve the transdermal permeation of hyaluronic acid. We have developed and characterized liposomes formulations incorporating different enhancers.

Liposomes were prepared through thin film hydration method using L- α Phosphatidylcholine, once prepared Tween 80 and Transcutol were incorporated to promote the transformation of the liposomes into planar lipids bilayers. Formulations were characterized in terms of particle size diameter, size distribution, entrapment efficiency and in vitro drug release. *Ex vivo* permeation studies were performed using Franz diffusion cells and human skin obtained from abdominoplasty surgery was used as a permeation membrane.

Stable and regular Liposomal formulations suitable for combination with different enhancers were developed. Liposomes containing hyaluronic acid and Transcutol showed the highest quantities of hyaluronic acid released (84%).

At the end of the permeation assay were measured the amount of hyaluronic acid retained in the skin. Liposomes without enhancers presented the highest quantities of hyaluronic acid retained in the skin (1.8 g/g skin cm²). According with these results, liposomal formulations developed are capable to increase the quantities of hyaluronic acid permeated through human skin.

Acknowledgments: This research has been supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation through grant Torres Quevedo PTQ-11-04462 to R.B.

CHARACTERIZATION AND *IN VITRO* SKIN PERMEATION OF LIPOSOMES WITH AN ANTI INFLAMMATORY DRUG

Vazquez ML¹, Hernandez-Borell¹ J, Calpena AC², Domenech O¹, Bernad R³

¹Departament of Physical chemistry, Faculty of Pharmacy, Barcelona University, Barcelona, Spain

²Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Spain

³Labiana Pharmaceuticals S.L.U

E-mail: martha.vazq@gmail.com

Purpose: To develop and evaluate liposomal formulation with an anti inflammatory drug for topical administration.

Methods: Liposomes were prepared through thin film hydration method using L- α Phosphatidylcholine and different enhancers. The formulations were examined for their characteristics such as particle size diameter, size distribution, stability, including in vitro drug release. Permeation studies were performed using Franz diffusion cells and human skin obtained from abdominoplasty surgery was used as a permeation membrane.

Results: The formulation obtained presents average size of 168 nm and a polydispersity of 0.19 and was stable for 70 days.

The formulation containing 0.0025 % of polyoxyethylenesorbitan tristearat as permeation enhancer gave drug release pattern comparable to that of the reference product.

Conclusions: These assays show that the release of the anti inflammatory drug incorporated in liposomes takes place in a sustained release according to Weibull kinetic model.

The results obtained show that the average flux is 2.33 mcg/hr cm² and the drug accumulated in skin at 1.44 mg/g cm². These results demonstrate the possibility to use this formulation for topical purposes.

The transdermal permeation assay of these liposomes on human skin shows that the drug will achieve a local action instead of systemic due to its low steady state concentrations

CHARACTERIZATION AND IN VITRO SKIN PERMEATION OF LIPOSOMES WITH AN ANTI INFLAMMATORY DRUG THROUGH PLANAR BILAYERS

Vazquez ML(1), Calpena AC2, Domenech O(1), Bernad R(3), Hernandez-Borell J (1)

(1) Department of Physical chemistry, Faculty of Pharmacy, Barcelona University, Barcelona, Spain

(2) Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of

(3) Labiana Pharmaceuticals S.L.U

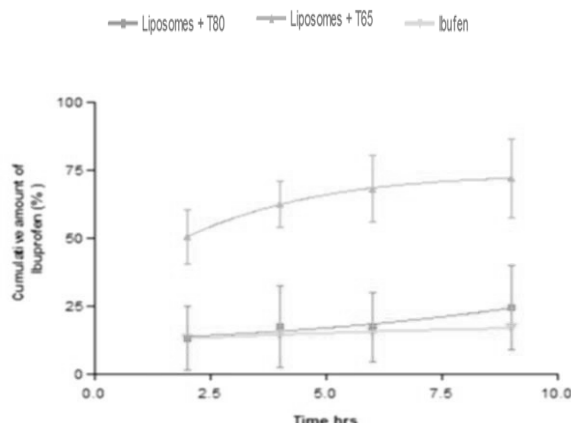
The aim of this work was to develop and evaluate liposomal formulation with an anti-inflammatory drug for topical administration. These vesicles consist of phospholipids and an edge activator. An edge activator is often a single-chain surfactant, with a high radius of curvature, which destabilizes the lipid bilayers of the vesicles and increases their deformability¹

Liposomal formulations were prepared using different enhancers as Isopropyl alcohol, Propylene glycol and nonionic surfactants (Tween 65 and Tween 80). Ibuprofen was used as a drug control. Liposomes were characterized by their characteristics such as particle size diameter, size distribution and stability. *In vitro* drug release and *ex vivo* skin delivery of Ibuprofen were performed using Franz diffusion cells in order to probe the potential of topical administration for this formulations

These assays show that the release of the anti-inflammatory drug incorporated in liposomes takes place in a sustained release according to Korsmeyer-Peppas model.

According with the *ex vivo* permeation assays quantities of Ibuprofen delivered in both liposomal formulations are superior to the commercial formulation as well as drug accumulated in the skin. Although the quantities of Ibuprofen in the liposomal formulation are lower the best results obtained is probably because almost all the Ibuprofen contained in liposomes were delivered.

In addition to the stability, these results demonstrate the possibility to use this formulation for topical purposes



¹ M. Elsayed, "Lipid vesicles for skin delivery of drugs: reviewing three decades of research", *Int. J. Pharm.*, 332, 1-16 (2007).

Apendice C

Agradecimientos

El presente trabajo de investigación se ha llevado a cabo gracias a la convergencia de diversas sincronías, tanto en el ámbito académico, como fuera de él. Dedico unas líneas y mi eterno agradecimiento para todos los que han contribuido.

Agradezco a la Universitat de Barcelona y en concreto a la Facultat de Farmacia por abrirme sus puertas y acogerme desde el primer momento, por ofrecerme una total apertura para expandirme, por ser mi casa en los 6 últimos años de mi vida. Especialmente al departamento de Fisicoquímica y cada uno de sus miembros.

Agradezco a la Dra. Ana Calpena, por su apoyo y por estar siempre al tanto de mis necesidades académicas y personales. Gracias Ana, por todo lo que me has aportado desde el primer momento.

Al Dr. Jordi Borrell, por acogerme en su grupo de investigación, por formarme a nivel de investigación, por su profesionalidad y amistad. Gracias Jordi, por hacer brillar mi trabajo y darle tu toque de magia.

A Labiana Pharmaceuticals S.L.U por su contribución en los primeros años, para el desarrollo de la presente investigación.

Al grupo de Biomembranas, por acogerme y hacerme sentir parte del equipo desde el primer momento, sois unos investigadores y personas increíbles, que siempre serán mi referente por la forma de hacer ciencia, por enseñarme aspectos fundamentales para un investigador. La disciplina, compañerismo y calidad en el trabajo, son algunas características que los distinguen de entre muchos otros grupos de investigación.

Al Dr. Òscar Domènech por su aportación en el desarrollo de la presente investigación. Gracias Oscar, por todo el tiempo que has empleado para enseñarme, gran parte de lo que ahora sé de liposomas es resultado de todas las horas que has invertido en enseñarme a detalle cada una de las técnicas que utilizamos. Gracias por tu paciencia e implicación.

A la Dra. M. Teresa Montero, por su invaluable colaboración en la revisión de los artículos publicados. Gracias Tere, por tu apoyo y tu visión para percibir los detalles que en ocasiones nadie más es capaz de ver.

A la Dra. Carme Suárez, por su total apertura y disposición para ayudarme hasta en el más mínimo detalle. Gracias Carme, por tu amistad y compañía los primeros años de la tesis.

A la Dra. María Luisa Garduño por su guía. Gracias por ayudarme a ver más allá y compartir conmigo tu experiencia. Sabes que este proyecto no hubiese sido posible sin tus consejos que ampliaron mi visión. Gracias por todo el apoyo profesional y personal.

A mis compañeros de doctorado, algunos de ellos desde el máster, con los cuales he tenido la fortuna de compartir algo más que un laboratorio o congresos, gracias por compartir y crecer al mismo tiempo que hacíamos la tesis. Gracias a todos, doctores ! Paloma Florez, Daniele Rubert, Helen Alvarado, Guadalupe Abrego, Mireia Mallandrich, Cristina Cañadas, Alexander Parra, Fran Fernández.

Finalmente, pero no menos importante, agradezco a todos mis amigos y familia que he formado en los últimos años. Gracias a la familia Pablos Castillo por ser mi familia, Janeth, Jose Luis y Ricardo, por todo lo que me han compartido, gracias por su apoyo.

Gracias Janeth Castillo, Rigoberto Rosas, Asención Nieto, Beatriz Puertas, Mabel Navarro, Miriam Pablos, Nancy Olmos, por estar allí siempre.

Gracias a mi familia y amigos en México, a mi madre, mis hermanas Marisela, Patricia y mis queridos sobrinos, Miguel, Anahí, Brenda, Sofía, Nayelly, Emiliano y Yamileth, por su apoyo en la distancia, que nunca he sentido lejano, por ser el soporte en el cual se han cimentado mis metas, por compartir lo mejor y esperarme siempre. Gracias por recargarme las baterías cada año en mis visitas y por su incondicionalidad.



Esta investigación se ha llevado a cabo con el apoyo de una beca doctoral del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México

