

INFLUENCIA DE LA FASE EXTERNA EN LA CANTIDAD RETENIDA DE FILTRO QUÍMICO ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE EN PIEL HUMANA

Esther Torres, Anna Calpena, Lyda Halbaut, Coloma Barbé, Montserrat Aróztegui y Joaquim Suñer

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona. etorres@ub.edu

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La exposición excesiva a las radiaciones solares puede ocasionar problemas de salud a corto y a largo plazo. Por este motivo existen en el mercado un amplio abanico de productos con filtros solares para una aplicación tópica. Se clasifican según los ingredientes activos, algunos de ellos contienen filtros químicos algunos filtros físicos y algunos ambos tipos de filtros.

- Los filtros químicos son moléculas orgánicas con propiedad de absorción de algunos de las radiaciones solares, de modo que impide selectivamente el paso de determinado rango de radiaciones ultravioletas.
- Los filtros físicos son pequeñas partículas (normalmente óxido de zinc o dióxido de titanio) no basan su acción en el efecto pantalla y reflejan tanto los rayos ultravioletas A (UVA) como los ultravioletas B (UVB).

En el caso de los filtros químicos, cuando mayor sea el tiempo de permanencia sobre la piel, y por lo tanto menor sea la absorción a través de la misma, mayor será el efecto protector. La penetración percutánea del filtro químico la determinaran, no sólo las características de este (permeación intrínseca) sino también del tipo y estado de la piel y del efecto que sobre la piel producen los sistemas dispersos empleados para la vehiculación del filtro solar.

La piel es una membrana gruesa, con diversas estructuras complejas, que recubre la superficie del cuerpo. Eso, no obstante, no puede ser considerada una simple envoltura corporal, porque que le corresponden funciones diversas y variadas tal como la protección del cuerpo en contra de distintos agentes externos, como también la participación activa en la regulación de la temperatura corporal e, incluso, en la regulación del medio interno. Por otro lado, la piel es considerada un órgano sensorial, porque se localiza el sentido del tacto y detecta distintas sensaciones como el frío o el calor. (*Ferrándiz, 1989*).

Se compone de tres capas de tejidos diferenciados: la más externa es la epidermis, la mediana la dermis y la más profunda la hipodermis. En conjunto, constituye una membrana gruesa, resistente y flexible que en la persona adulta tiene una superficie aproximada de 1,5 a 2 m², y si se considera sólo la dermis y la epidermis, pesa unos 4 kg.

El espesor de la piel varía con la edad, la zona del cuerpo y de una persona a otra. La epidermis y la dermis, en conjunto tienen un espesor que oscila entre 0,5 y 4 mm. La hipodermis es la capa que tiene un espesor más variable: en algunas zonas del cuerpo casi es inexistente mientras que en otros puede ser de algunos milímetros.

En la dermis se localizan terminaciones nerviosas, glándulas sudoríparas, glándulas sebáceas, folículos pilosos y vasos sanguíneos (figura 1). Las terminaciones nerviosas son sensibles al dolor, tacto, presión y temperaturas. Los vasos sanguíneos por donde circula la sangre proporcionan nutrientes a la piel y ayudan a regular la temperatura corporal.

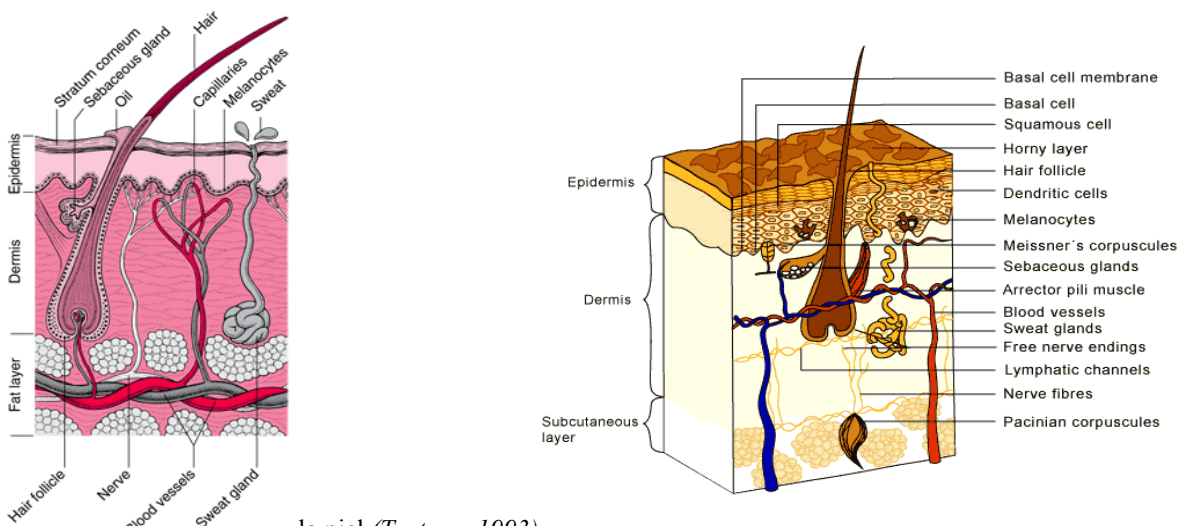


Figura 1. Estructura de la piel (Tortora, 1993).

El mecanismo de transporte de sustancias activas a través de la piel sigue un proceso de difusión pasiva. Existen dos posibles vías para la penetración transdérmica: la primera a través de los apéndices (folículos pilosos, glándulas sudoríparas o sebáceas) y la segunda, a través de la epidermis (vía intracelular e intercelular).

Un factor importante a tener en cuenta es que la piel es un órgano metabólicamente activo y, por lo tanto, muchos activos serán metabolizados después de su penetración transdérmica.

El proceso de permeación cutánea puede dividirse en tres etapas: penetración, permeación y absorción.

Penetración: Indica la entrada de cualquiera sustancia en una capa determinada o en algún órgano. Para que se produzca la penetración se necesita, en primer lugar, que se libere el activo del vehículo que lo contiene. Este activo ha de disolverse, o bien tiene de estar disuelto (disolución), y difundir hacia la interfase vehículo-estrato córneo. En esta primera fase, la formulación galénica será muy importante dado que modulará el proceso de liberación del activo.

Permeación: Esta segunda etapa está regida por un proceso de difusión del activo a través de la piel. La principal barrera que encuentran los activos para atravesar la piel es el estrato córneo. Existen tres rutas principales del paso de activos a través del estrato córneo: Transapendicular, transcelular e intercelular.

Absorción: Es el paso de la sustancia al sistema circulatorio (vasos sanguíneos o vasos linfáticos), considerado farmacocinéticamente como parte del compartimiento central.

El fenómeno de permeación de un activo a través de la piel es un proceso complejo en el que influyen gran cantidad de factores. Vendrá limitado por la difusión del activo a través del estrato córneo (Chien, 1982), dado que éste actúa como medio de difusión pasiva, a través del cual las moléculas penetrantes migran una vez disueltas en el vehículo siguiendo las Leyes de Fick de la difusión (Michaels, 1975).

Los productos solares considerados productos cosméticos desde el punto de vista legal, debe responder al Real Decreto 1599/1997, de 17 de octubre, sobre Productos Cosméticos (B.O.E. 31 de octubre de 1997). En el anexo VII y después de sucesivas modificaciones hay la lista positiva de filtros ultravioletas que pueden contener los productos cosméticos antisolares. En dicho Real Decreto se definen a los filtros ultravioletas como sustancias que, contenidos en los productos cosméticos de protección solar, están destinados específicamente a filtrar ciertas radiaciones para proteger a la piel de sus efectos nocivos.

Los filtros solares filtro solar disminuye de manera apreciable y selectiva la intensidad de radiaciones de una determinada longitud de onda, ya sea por absorción, refracción o reflexión. De acuerdo con la parte del espectro en la que son más activas, estas sustancias las denominamos filtros solares UVB, filtros solares UVA, filtros de amplio espectro (UVB/UVA) o infrarrojo (IR).

El Ethylhexyl methoxycinnamate es un filtro solar orgánico o químico, de origen sintético. Este ingrediente activo permite la prevención del daño solar mediante absorción de las radiaciones UVB. Así, su espectro es estrecho Es soluble con productos lipófilos..

Según la nomenclatura INCI se nombra Ethylhexyl methoxycinnamate (EHM), pero se puede nombrar 4-metoxicinamato de 2-etilhexil y metoxicinamato de octil. Este filtro está admitido legalmente, Orden 4 de junio de 1998, en la lista de filtros ultravioletas que pueden contener los productos cosméticos (anexo VII). Está permitido con una concentración máxima del 10%. Forma parte del grupo de los cinnamatos.

Se trata de uno de los filtros más utilizados a nivel mundial y del que ya hace años que se está usando este filtro en los productos solares. Así el análisis del EHM ha estado ampliamente estudiado. Uno de los análisis más utilizados para la cuantificación de este filtro ha sido la Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (CLAE). Del que destaca Santoro (2004) donde desarrolla un método rápido, selectivo y fidedigno para cuantificar simultáneamente por CLAE dos filtros solares: 3-benzofenona y el ethylhexyl metoxycinnamate. En estudios posteriores Awatramani (2005) también utiliza este mismo método cromatográfico, CLAE, para desarrollar en un mismo proceso la cuantificación de algunos filtros solares y algunos conservantes, de entre los filtros ensayados, se encuentra el EHM.

Hoy en día, para sacar un nuevo filtro solar al mercado se requieren muchos estudios toxicológicos y por tanto, tal como afirma Nohynek (2001) los nuevos productos solares tienen mecanismos de protección seguros, ya que su aprobación comporta una evaluación rigurosa tanto de su seguridad como de su eficacia. Sin embargo, la absorción percutánea de los filtros puede ser posible, y el filtro EHM puede ser uno de ellos. Recientemente, Calderilla-Fajardo (2006) estudió en voluntarios sanos la influencia de dos sucroesteres en la penetración percutánea del filtro EHM formulado en varios sistemas tales como nanocápsulas, nanoemulsiones y emulsiones. Los resultados obtenidos sugieren que la cantidad del filtro EHM detectado al estrato córneo y la que ha penetrado profundamente dependen fuertemente de la naturaleza de la formulación, de la medida de partículas del sistema y del tipo de promotor. Anteriormente, Brinon (1999) ya vio como la difusión (estudiada en piel de cerdo) del filtro EHM a través de la dermis podía ser un paso determinante para su penetración transcutánea y que esta podía verse afectada de manera diferente por los vehículos tensoactivos no iónicos.

Existen diferentes métodos para estudiar la absorción de un activo cosmético. Por un lado hay los métodos *in vitro* utilizando entre otros las membranas artificiales, como también piel de animales tipo cerdo, rata, o bien, piel humana, principalmente excedentes de cirugía plástica. Y por otro lado, hay los métodos *in vivo* donde tanto pueden utilizarse animales como humanos. Tal como dice Bronaugh (1991) si se hace con cuidado y con unas técnicas adecuadas que superen los problemas inherentes, la permeación puede ser medida de manera fidedigna por técnicas *in vivo* e *in vitro*.

Así, Walters (1998) propone que utilizar piel humana puede proporcionar datos que permiten realizar cálculos de manera cuidadosa, sobre todo para filtros solares y para otros ingredientes cosméticos. Además, considera que es una de las aproximaciones más viables para calcular la absorción dérmica.

Son de gran importancia los componentes de la formulación que contiene el activo a ensayar, así Watkinson (1995) en estudios realizados con membrana de silicona demostró que los vehículos pueden alterar el grado de penetración de la sustancia que, a la vez, también está relacionado con el grado de penetración del mismo vehículo. Carpenter (1996) estudió, con voluntarios sanos un polímero que dentro de una formulación de un producto solar mitigaba la penetración de los filtros a través de la piel. Por lo

tanto, a parte de la propia formulación también hay sustancias que pueden realizar esta función como retenedora, es decir, mantener más tiempo el filtro solar y su formulación en las capas más superficiales de la piel aumentando la eficacia de este. Monti (1993) trabajando con derivados del filtro químico benzofenona, con piel de ratón sin pelo, observó que la presencia de un derivado de amonio cuaternario además de inducir una elevada eficacia por los queratinocitos cutáneos, podía dificultar o reducir la absorción transdérmica. Marginean y col. (1996) evaluaron la permeación in vitro en piel humana del EHM y el Butyl methoxydibenzoil con una serie de cinco diferentes tipos de emulsiones (emulsión O/A, preparación O/A libre de emulgente, emulsión A/O, emulsión silicónica A/Si y emulsión O/A con cristales líquido lamelar). El filtro EHM fue detectado en diferentes proporciones dependiendo del vehículo donde se encontraba. El filtro EHM fue encontrado en gran cantidad en la preparación O/A libre de emulgente. La emulsión O/A que contenía cristal líquido lamelar y la emulsión silicónica A/S resultaron ser las que daban un tanto por cien más bajo en la permeación del filtro. Igualmente Treffel (1996) trabajó con el filtro EHM y dos vehículos diferentes, donde demostró que la penetración y retención, así como también el esperado SPF de los filtros solares podía ser optimizado por un adecuado vehículo. Tal como afirmó Surber (2006) donde decía que cada activo o droga, a cada concentración, requiere un vehículo diferente para optimizar la terapia o función del producto.

En el mercado comercial de productos llamados solares, las emulsiones ocupan un lugar relevante. Así pues, aunque la dificultad que comporta formular y estabilizar sistemas emulsionados, constituyen un alto porcentaje en el mercado de productos solares. Hay que decir también que, al tratarse de sistemas polifásicos, permiten vehicular los activos cosméticos en una u otra fase en función de su liposolubilidad, así como introducir polvos micronizados debidamente vehiculados.

Por lo tanto las emulsiones son sistemas idóneos para vehicular filtros químicos y filtros solares físicos, si bien serán necesarios estudios de preformulación para estabilizarlas.

Así al tratarse de productos destinados muchas veces a tomar el sol en la playa, las características del excipiente influyen notablemente en el efecto del filtro, básicamente debido al poco tiempo de permanencia de la protección que ofrece el producto cuando es hidrodispersable y por tanto desaparece en contacto con la agua.

Por parte del formulador: la existencia de fases hidrófilas y lipófilas en las emulsiones (A/O, O/A, A/O/A...) permiten un amplio abanico de ubicación de los componentes activos, así como el uso de varios productos activos en una misma fórmula.

Pero se debe tener en cuenta que, además de las características hidrofílicas o lipofílicas de la fase externa del sistema disperso, muchos componentes de la formulación, ubicados en la misma para mejorar la aplicabilidad o estabilizar el sistema pueden propiciar la penetración del filtro químico a través de la piel, disminuir su eficacia y propiciar el indeseable paso a capas más profundas e incluso a la circulación

sistémica. La mayor o menor oclusividad, la presencia de tensoactivos (no iónicos, anfotéricos...) entre otros son causa de modificaciones en el estrato córneo de la piel que pueden variar la permeación. Aún así, hay que remarcar que el relativamente bajo porcentaje de emulgente necesario para formular emulsiones es un factor evaluable positivamente en este aspecto.

El objetivo de este trabajo es estudiar la influencia de la fase externa en la cantidad retenida en piel humana del filtro químico *Ethylhexyl methoxycinnamate* (EHM), vehiculado en sistemas dispersos con diferentes características estructurales y de hidrofilia /lipofilia, así como provistos del filtro físico más habitualmente empleado en formulaciones tópicas (dióxido de titanio) con la finalidad de estudiar la posible influencia del sistema disperso y de la materia prima en la permeación del filtro a través de la piel.

Este trabajo ha requerido realizar estudios de preformulación y formulación de sistemas dispersos A/O y O/A de características idóneas para poder llevar a cabo un trabajo comparativo, así como la preparación y realización de una técnica de evaluación con piel humana. Las dos formulaciones han sido comparadas con un producto de referencia P[®] presente en el mercado.

MATERIAL Y MÉTODOS

Ingredientes de las emulsiones

a) Filtros solares:

Filtro químico: *Ethylhexyl methoxycinnamate* (Eusolex[®] 2292) de Merck Farma y Química.

Filtros físicos: Dispersión oleosa de dióxido de titanio (Solaveil[®] CT-100) y dispersión acuosa de TiO₂ (Solaveil[®] CT-10W), ambos productos suministrados por Química Massó.

b) Tensioactivos/emulgentes

Glycerol monostearat and PEG-100 stearate (Arlacel[®] 165 F); PEG-30 Dipolyhydroxystearate (Arlacel[®] 135); Sorbitan monostearate (Span[®] 60); Polyoxyethylene 20 sorbitan monostearate (Tween[®] 60V) suministrados por Química Massó.

c) Componentes de la fase oleosa

Hydrogenated castor oil (Cutina[®] HR) de Cognis; *Triethylhexanoin* (Estol[®] 3609) y *Polyperfluoroethoxymethoxy Difluoromethyl Distearamide* (Fomblin[®] HC/SA) suministrados por Química Massó y *Paraffinum liquidum* (Parafina líquida) de calidad farmacéutica.

d) Componentes de la fase acuosa

Glycerin (Glicerol) de Roig Farma; *Hydroxypropyl Starch Phosphate* (Structure[®]ZEA) de ISISA; *Magnesium sulphate heptahydrate* de Fluka Bio Chemika. *Water* (Agua) de calidad Milly-Q (Milli-Q Academic, Millipore).

e) Aditivos: Conservantes

Phenoxyethanol, methylparaben, butylparaben, propylparaben, ethylparaben. (Phenoxyparaben[®]) suministrado por Química Massó; Diazolidinylurea, methylparaben, propylparaben, propylene glycol (Kemaben[®] 2) por Química Massó.

Reactivos

- Etanol absoluto 99,9% (UV-IR-HPLC) del laboratorio Panreac.

Methanol Spectrophotometric grade (Sigma-Aldrich Química).

Acetonitrile, Chromasolv[®] Plus per HPLC 99,9% (Sigma-Aldrich Química).

Ácido fosfórico 85% (Baker).

Agua (R).

Soluciones

A partir de los reactivos nombrados anteriormente se han preparado las siguientes soluciones:

– Solución de etanol y agua (60:40)

Solución receptora de las celdas de Franz en las experiencias de permeación y en la preparación de la recta de calibrado.

– Fase móvil:

12% agua Milli-Q (0,5 ml H₃PO₄ 85% / 1) / 88 % Metanol

Solución utilizada como fase móvil para la determinación cuantitativa por CLAE del EHM.

Material biológico

Piel humana abdominal procedente de lipectomía de cirugía plástica.

Para poner de manifiesto que las conclusiones en el estudio son extrapolables a toda una población se realizan los estudios con muestras de piel de diferentes voluntarios.

La variabilidad interindividual será la misma en todas las experiencias. Todos los estudios que se llevarán a cabo se harán con las pieles de los mismos voluntarios para poder establecer las comparaciones necesarias.

Metódica analítica: Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (CLAE)

La metódica analítica del EHM se ha realizado por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (CLAE) mediante un equipo *Alliance 2695 Waters* a una longitud de onda de 311 nm.

Las condiciones cromatográficas utilizadas en la determinación del EHM se indican a la tabla 1.

Disolvente:	Etanol/agua (60/40)
Columna:	LiChrocart 125-4/LiChrospher 60 RP-Select B (5µm)
Fase móvil:	12% agua Milli-Q (0,5 ml H ₃ PO ₄ 85% / 1) / 88 % MeOH
Volumen de inyección:	10 µl
Flujo:	1 ml / min
Longitud de onda:	311 nm

Tabla 1: Condiciones experimentales para el análisis cromatográfico del EHM. (Ramón, 2003)

Técnica del ensayo de permeación

Para los estudios de permeación de formas semisólidas o líquidas se ha utilizado el sistema de las celdas propuesta por Franz (Franz, 1975). Esta técnica está descrita por Calpena (1999) y adaptada a las condiciones de trabajo.

Los estudios de permeación se han realizado de la misma forma:

- **Temperatura:** 37°C en todas las formulaciones
- **Medio receptor:** Etanol/ agua (60/40)
- **Medio de reposición:** Etanol/ agua (60/40)
- **Volumen de extracción/ reposición:** 0,3 ml
- **Velocidad agitación:** 600-700 r.p.m.
- **Cantidad de siembra:** 300 mg por las formulaciones
- **Duración del experimento:** 24 horas aproximadamente
- **Tiempo de toma de muestra:** a los tiempos prefijados a cada experiencia.

Para garantizar que todo el activo que atraviesa la membrana quede disuelto en la solución receptora, es necesario no llegar a este medio a una concentración superior al 10-20% de la concentración a saturación (condiciones SINK) a lo largo de toda la experiencia.

Cálculo del porcentaje de recuperación

Previamente a la determinación de las cantidades remanentes de las pieles realizadas en las experiencias de permeación se ha procedido a determinar el mejor método extractivo para el filtro *Ethylhexyl methoxycinnamate* para poder calcular el porcentaje de recuperación.

Se mantiene la piel a 37°C con a solución de concentración conocida de filtro durante 24h; A posteriori se sumerge en el medio extractivo etanol/agua (60:40) mediante la técnica de ultrasonidos.

Método operatorio para la determinación de la cantidad remanente de EHM en piel

Previamente se lava la membrana con solución de laurel sulfato sódico al 0.05%, después se aplica la técnica de ultrasonidos (20 minutos) con el medio seleccionado y controlando la temperatura. La concentración de activo cosmético de cada muestra se determinó por el método de CLAE ($\lambda= 311\text{nm}$). Los resultados han sido comparados mediante análisis no paramétrico (U-Mann Whitney) con un nivel de significación de 0.05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Elaboración de las emulsiones

En un estudio previo se han desarrollado dos emulsiones simples (O/A y A/O), estabilizadas con emulgentes no iónicos y aditivos reológicos de características adecuadas para vehicular en las diferentes fórmulas los mismos porcentajes de filtros solares (10% EHM, TiO_2 en forma de dispersión acuosa 12.5% y oleosa 8%). Los lotes se han elaborado en condiciones totalmente estandarizadas.

En la figura 2 se esquematiza la ubicación teórica del filtro químico EHM y de los filtros físicos (TiO_2 dispersión oleosa y TiO_2 dispersión oleosa) en las dos emulsiones elaboradas O/A y A/O.

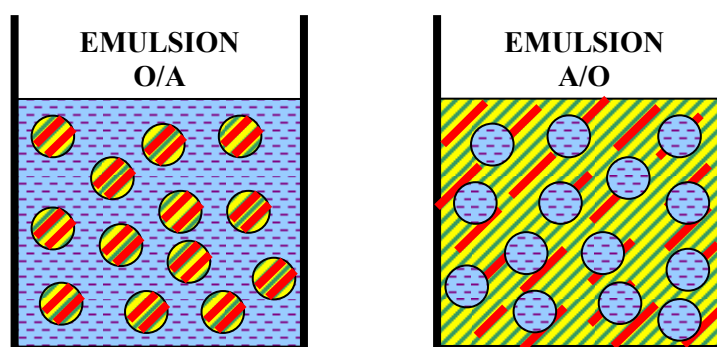
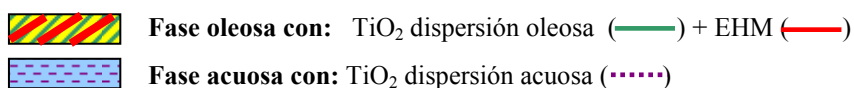


Fig. 2: Ubicación teórica de los diferentes filtros solares en los emulsiones O/A y A/O elaboradas.



Validación de la metodología analítica por CLAE

La metodología analítica para el *Ethylhexyl methoxycinnamate* ha resultado ser lineal, exacta y precisa con un error relativo (E%) comprendido entre -3,842 y 1,150 y un coeficiente de variación (CV%) <4%.

El límite de detección del EHM en el rango establecido de (1,563-12,5 $\mu\text{l/ml}$) ha resultado ser (0,312 \pm 0,213) y el límite de cuantificación (0,946 \pm 0,646).

Resultados de los porcentajes de recuperación

Seleccionado el mejor solvente para hacer la extracción del EHM (etanol/agua 60/40) el resultado del tanto por ciento de recuperación en la piel humana de 3 donantes diferentes es el siguiente:

% Recuperación EHM	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO
113			
121	113	94,2	121
94,2			

Tabla 2: % recuperación del EHM de las pieles expresadas como valores individuales, mediana mínimo y máximo

Dada la variabilidad de los métodos de extracción con muestras biológicas y a la vista de los resultados se puede considerar que el método extractivo es de aproximadamente del 100%.

Resultados: Determinación de las cantidades remanentes de EHM en piel

Una vez realizadas las experiencias del estudio de permeación O/A, A/O y P[®] como un 10 % de EHM (Torres, 2006) se han determinado las cantidades retenidas de EHM en la piel.

O/A 10%	Extracción EHM (µg)	Peso piel (g)	Qret EHM (µg/g/cm ²)
P1	3,53E+01	6,63E-02	2,09E+02
P2	6,39E+01	4,35E-02	5,78E+02
P3	8,21E+01	6,02E-02	5,37E+02
P4	3,82E+01	7,60E-02	1,98E+02
P5	2,82E+01	6,57E-02	1,69E+02
P6	5,22E+01	8,47E-02	2,43E+02

A/O 10%	Extracción EHM (µg)	Peso piel (g)	Qret EHM (µg/g/cm ²)
P1	2,30E+01	6,60E-02	1,37E+02
P2	3,70E+01	7,87E-02	1,85E+02
P3	2,33E+01	6,16E-02	1,49E+02
P4	1,20E+02	1,44E-01	3,27E+02
P5	2,00E+01	6,24E-02	1,26E+02
P6	2,31E+01	1,10E-01	8,23E+01

P[®]	Extracción EHM (µg)	Peso piel (g)	Qret EHM (µg/g/cm²)
P1	3,30E+01	8,08E-02	1,61E+02
P2	4,41E+01	8,91E-02	1,95E+02
P3	8,70E+01	7,16E-02	4,78E+02
P4	8,58E+01	7,95E-02	4,25E+02
P5	2,74E+01	7,04E-02	1,53E+02
P6	3,08E+01	7,33E-02	1,65E+02
P7	2,79E+01	1,11E-01	9,88E+01

Tabla 3: Valores de las cantidades extraídas de EHM de cada replicado, peso de piel y cantidades remanentes de EHM en la piel aproximadamente a las 24 horas de su aplicación de las formulaciones al 10% de filtro.

Q retenida EHM (µg/g/cm ²)	Mediana	Máximo	Mínimo
O/A 10%	2,26E+02	5,78E+02	1,69E+02
A/O 10%	1,43E+02	3,27E+02	8,23E+01
P[®]	1,65E+02	4,78E+02	9,88E+01

Tabla 4: Cantidades remanentes de EHM en piel aproximadamente a las 24 horas de su aplicación de las formulaciones al 10% con los valores de mediana, máximo y mínimo.

Los resultados del tratamiento estadístico obtenidos de las cantidades retenidas en la piel del *Ethylhexyl methoxycinnamate* después de la retirada de las formulaciones del compartimiento donador, es decir, del activo retenido a la piel ponen de manifiesto los siguientes resultados, después de realizar un test de comparación de medias no paramétrico *U de Mann Whitney* entre los diversas formulaciones:

Tratamiento estadístico de las distintas formulaciones de la Q _{ret}	p
A/O, O/A y P [®] al 10% de EHM	0,053

Tabla 5: Significación estadística en la comparación de cantidades remanentes en piel realizadas por las diversas formulaciones estudiadas.

No hay diferencias estadísticamente significativas entre las cantidades retenidas de filtro en piel de las formulaciones con un 10 % de EHM.

CONCLUSIONES

A la vista de los resultados se puede afirmar que el EHM queda retenido en la piel humana. La fase externa no influye en la cantidad retenida porque probablemente pasadas las 24 horas del experimento se ha obtenido el estado de equilibrio estacionario.

BIBLIOGRAFIA

Consultar versión en inglés.

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren agradecer a las empresas Químicas Massó, Meck Farma y Química e Isisa por su cooperación. Así como agradecer al Dr. Humet del Hospital de Barcelona, SCIAS por proveer muestras de piel humana excedentes de cirugía plástica.

VERSIÓN EN INGLÉS

THE INFLUENCE OF THE EXTERNAL PHASE IN THE RETAINED AMOUNT OF CHEMICAL FILTER ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE IN HUMAN SKIN

Esther Torres, Ana Calpena, Lyda Halbaut, Coloma Barbé, Montserrat Aróztegui and Joaquim Suñer

Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology. Faculty of Pharmacy.

University of Barcelona. etorres@ub.edu

INTRODUCTION AND OBJECTIVE

Excessive exposure to sun radiation may cause short and long-term health problems. Consequently, a number of different sunscreen brands are currently available for topical application. They are classified on the basis of their active ingredients, as products containing chemical filters, physical filters or both.

- Chemical filters are organic molecules with the property of selectively absorbing certain sun radiations, thus preventing them from reaching deep skin layers where they could cause damage.
- Physical filters are small particles (usually zinc oxide or titanium dioxide), which scatter and reflect both ultraviolet B (UVB) and ultraviolet A (UVA) radiation.

For chemical filters, the longer the remaining time on the skin and the lower the cutaneous absorption, the better the sun protection. The percutaneous penetration of a chemical filter does not only depend on its characteristics (intrinsic permeation) but also on the skin's characteristics (type and state), and on the effects on the skin of the dispersed system containing the filter.

The skin is a thick membrane that coats the body's surface and includes several complex structures. However, it cannot be considered a simple cover. The skin plays the essential roles of acting as a barrier and regulating exchanges between the outside world and the controlled internal body environment. The skin is also considered a sensory organ, since sensations like touch and temperature are perceived at this level (*Ferrándiz, 1989*).

The skin is composed of three layers of differentiated tissue: the outermost layer called epidermis, the intermediate layer called dermis and the deepest layer called the subcutaneous layer or fat layer. As a whole, the skin is a thick, resistant and flexible membrane with a surface area of about 1.5-2 m² in adults. The weight of the dermis and the epidermis is about 4 kg.

The skin thickness varies with age and body location, and is different for different persons. In general, the thickness of the epidermis plus the dermis is about 0.5 to 4 mm, while that of the subcutaneous fat layer is more variable from some millimeters to absent in the different body areas.

The dermis includes nerve endings, sweat glands, sebaceous glands, hair follicles and blood vessels (figure 1). Free nerve endings are sensitive to pain, touch, pressure and temperature. Blood vessels provide nutrients to the skin and help regulate the body temperature.

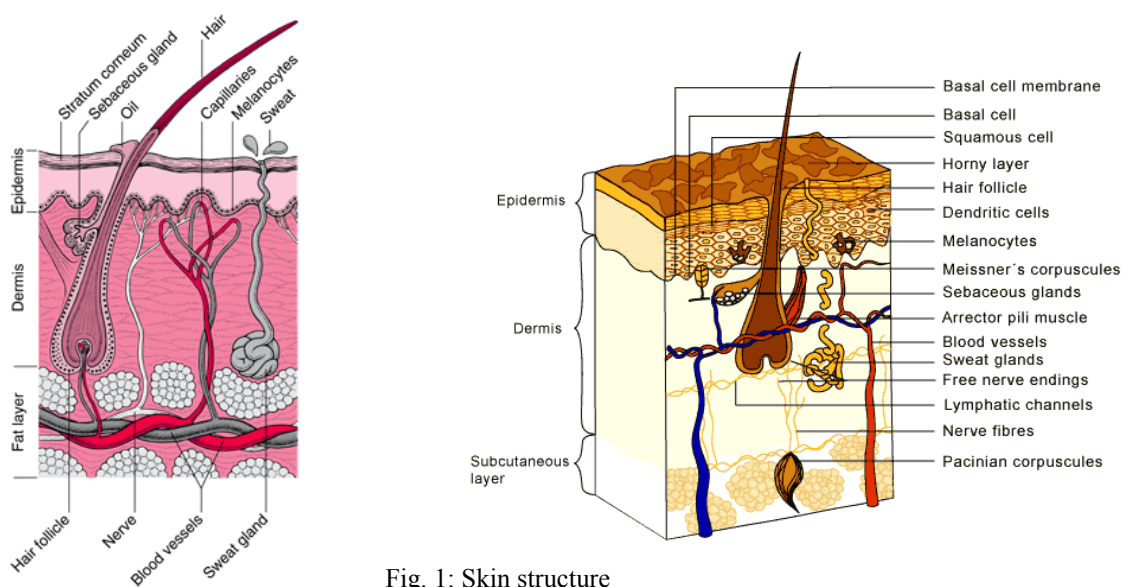


Fig. 1: Skin structure

Active substances are transported through the skin by a passive diffusion process. Transdermal penetration follows one of two possible ways: penetration via skin appendages (sweat glands, sebaceous glands, hair follicles); or penetration via the epidermis (intracellular and intercellular routes).

It is important to keep in mind that the skin is a metabolically active organ and consequently, many active compounds will be metabolized upon transdermal penetration.

Three stages can be considered in the cutaneous permeation process:

Penetration: entrance of a substance into a certain tissue layer or organ. For an active ingredient to penetrate, it must first be released from the vehicle. The active compound has to dissolve - or must have

been previously dissolved (dissolution) - and diffuse toward the vehicle-stratum corneum interface. The drug formulation is critical at this stage, since it modulates the active compound release.

Permeation: governed by diffusion of the active substance through the skin. The stratum corneum is the main barrier to this process. The three main routes to go across the stratum corneum are: trans-appendages, trans-cellular and intercellular.

Absorption: substances enter the circulatory system (blood vessels or lymphatic vessels), considered as a part of the central compartment from the pharmacokinetics point of view.

Permeation of active substances through the skin is a complex process influenced by a number of factors; it is limited by drug diffusion through the stratum corneum (*Chien*, 1982), which acts as a passive diffusion medium where diffusing particles move following the *Fick's* laws once dissolved in a vehicle (*Michaels*, 1975).

Solar products legally considered as cosmetics must fulfill the requirements of the *Spanish Real Ordinance 1599/1997, dated October 17th 1997 about Cosmetic Products (B.O.E. October, 31, 1997)*. Annex VII includes a list of ultraviolet filters allowed for use in cosmetic sunscreen products (note that this list has been modified several time by others RD). This Real Ordinance includes the following definition of ultraviolet filters: substances included in cosmetic sun-protection products, specifically aimed to filter certain sun radiations in order to protect the skin from their deleterious effects.

A solar filter must noticeably and selectively reduce the intensity of sun radiations, within a certain wavelength range, either by absorption, refraction or reflection. Depending on the portion of the solar spectrum where they are more active, these substances are called ultraviolet B (UVB) filters, ultraviolet A (UVA) filters, wide spectrum (both UVA/UVB) filters or infrared (IR) filters.

Ethylhexyl methoxycinnamate is a synthetic organic (chemical) solar filter. This active ingredient helps preventing sun damage by absorbing UVB radiation; it is a narrow spectrum filter. This compound is soluble in lipophilic substances.

The INCI name for *Ethylhexyl methoxycinnamate* is EHM. Spanish synonyms are: *4-metoxicinamato de 2-etilhexil* and *octil metoxicinamato*. This filter has been legally included (*Order June, 4th, 1998*) into the list of allowed ultraviolet filters for cosmetic products (annex VII), with a maximum allowed concentration of 10 %. This compound belongs to the cinnamates group.

These chemical filters are the most extensively used worldwide and have been included in solar products for years. EHM has been exhaustively studied; it is usually quantified by using High Pressure Liquid Chromatography (HPLC). *Santoro* (2004) developed a rapid, selective and reliable method for the

simultaneous quantification of two solar filters (*3-benzophenone* and EHM) by using HPLC. In later studies, *Awatramani* (2005) also used this chromatographic method for quantification of some solar filters (including EHM) and preservatives.

At present, a number of toxicological studies are required before delivering a new filter to the market. Protection is guaranteed with new solar products, since they have been exhaustively evaluated in terms of safety and effectiveness (*Nohynek*, 2001). However, percutaneous absorption may occur with some filters, including EHM. *Change-Fajardo* (2006) conducted a recent study on healthy volunteers about the influence of two surfactants on the percutaneous penetration of EHM formulated as nanocapsules, nano-emulsions and emulsions. The results suggested that the EHM amount in the stratum corneum and deeper skin layers strongly depended on the formula, the particle size and the kind of enhancers that had been used. In an earlier study, *Brinon* (1999) observed that EHM diffusion through the dermis (pig skin) could be the key step for transcutaneous penetration and that it could be influenced in different ways by non-ionic surfactants.

Absorption of a cosmetic active ingredient may be studied by using different methods: *in vitro* methods based on the use of artificial membranes, animal skin (e.g. pig, rat) or human skin, (mainly from plastic surgery); or *in vivo* methods with animals or human volunteers. *Bronaugh* (1991) claimed that permeation could be reliably measured *in vivo* as well as *in vitro* provided that measurements were carried out carefully and using the appropriate techniques to overcome inherent problems.

According to *Walters* (1998) the use of human skin provides data that allow for careful calculations, mainly regarding solar filters and other cosmetic ingredients. Additionally, he considered this method to be one of the feasible approaches to calculate dermal absorption.

Skin penetration of a solar filter may be influenced by other ingredients in the formulation. *Watkinson* (1995) demonstrated that the vehicle may influence the degree of penetration of a filter, which is in turn related to the degree of penetration of the vehicle. *Carpenter* (1996) conducted a study on healthy volunteers, to test a polymer (included in a sunscreen product) aimed at reducing filter penetration into the skin. Certain substances may retain the solar filter and its formulation on the superficial skin layers for longer times, thus enhancing the effectiveness of the filter. *Monti* (1993) observed in a study with a benzophenone chemical filter on the skin of hairless mice, that the presence of a quaternary ammonium derivative, besides inducing high effectiveness of cutaneous keratinocytes, could hinder or even reduce transdermal absorption. *Marginean et al.* (1996) evaluated *in vitro* the permeation into human skin of EHM and *Butyl methoxydibenzoil* for series of five different types of emulsion (O/A emulsion, surfactant-free O/A preparation, A/O emulsion, silicone A/S emulsion and O/A emulsion with lamellar liquid crystal). Different proportions of EHM were detected depending on the vehicle. Large amounts of EHM were found with the surfactant-free O/A preparation, whereas the lowest permeation was observed with the O/A emulsion with lamellar liquid crystal and the silicone A/S emulsion. *Treffel* (1996) studied EHM

with two different vehicles and demonstrated that the penetration, retention and prospective SPF of solar filters could be optimized by using a suitable vehicle. *Surber* (2006) claimed that every active ingredient, at every concentration, requires a different vehicle for the product's therapeutic effects or specific function to be optimal.

In the sunscreen products market, emulsions are highly prized. In spite of the difficulties to formulate and stabilize emulsified systems, they account for a high proportion of available solar products. Emulsions are polyphasic systems; they allow incorporating filters in the aqueous or the oily phase depending on their liposolubility, and adding micronized particles filters. Thus, emulsions are suitable systems for sunscreen formulations with chemical and/or physical solar filters, although preformulation studies are necessary to attain stability.

When sunscreen products are used on the beach, the excipients characteristics may markedly influence the filter effects, shortening the time it remains on the skin, mainly in the case of non waterproof products.

To the formulator, the presence of hydrophilic and lipophilic phases in emulsions (A/O, O/A, A/O/A...) allows for a wide range of locations of the active components, as well as for the use of different active products in the same formula. Besides the hydrophilic and lipophilic characteristics of the external phase of the dispersed system, it should be kept in mind that several components in the formulation – possibly included to improve application or to stabilize the system – might promote penetration of the chemical filter through the skin, reduce its effectiveness or facilitate unwanted filter movement into deeper layers and even into the systemic circulation. Higher or lower occlusivity, the presence of surfactants (no-ionic, amphoteric,...) may produce modifications in the stratum corneum of the skin, which may in turn modify the filter permeation. In this regard, it is necessary to emphasize that relatively low proportions of surfactant are required to produce emulsions.

The objective of the present study was to evaluate the influence of the external phase of different formulations on the amount of the chemical filter *Ethylhexyl methoxycinnamate* (EHM) retained in human skin, with the purpose of studying the possible influence of the dispersed system and the raw materials on the permeation of the filter through the skin.

The studied formulations were emulsions with different structural and hydrophilic/lipophilic characteristics. All of them also included titanium dioxide, the most commonly used physical filter in sunscreen products.

This study required preformulation and formulation studies, aimed at producing different suitable A/O and O/A emulsions for comparative evaluation, as well as development of the evaluation technique in

human skin. Both formulations were compared with a sunscreen product available on the market, which was used as the reference product (P[®]).

MATERIAL AND METHODS

Ingredients of the emulsions

a) Solar filters

Chemical filter: *Ethylhexyl methoxycinnamate* (Eusolex[®] 2292) supplied by Merck Farma y Química.

Physical filters: Oily dispersion of titanium dioxide (Solaveil[®] CT-100) and aqueous dispersion of TiO₂ (Solaveil[®] CT-10W), both products supplied by Química Massó.

b) Surfactants

Glycerol monostearate and PEG-100 stearate (Arlacel[®]165 F); *PEG-30 Dipolyhydroxystearate* (Arlacel[®] 135); *Sorbitan monostearate* (Span[®] 60); *Polyoxyethylene 20 sorbitan monostearate* (Tween[®] 60) supplied by Química Massó.

c) Oily phase ingredients

Hydrogenated castor oil (Cutina[®] HR) from Cognis; *Triethylhexanoin* (Estol[®] 3609) and *Polyperfluoroethoxymethoxy Difluoromethyl Distearamide* (Fomblin[®] HC/SA) supplied by Química Massó. Paraffinum liquidum of pharmaceutical quality.

d) Aqueous phase ingredients

Glycerin (Glicerol) from Roig Farma; *Hydroxypropyl Starch Phosphate* (Structure[®] ZEA) from ISISA; *Magnesium sulphate heptahydrate* from Fluka Bio Chemika. Water Milli-Q quality (Milli-Q Academic, Millipore).

e) Preservatives

Phenoxyethanol, methylparaben, butylparaben, propylparaben, ethylparaben. (Phenoxyparaben[®]) supplied by Química Massó; *Diazolidinylurea, methylparaben, propylparaben, propylene glycol* (Kemaben[®] 2) from Química Massó.

Reagents

- Ethanol absolute 99.9 % (UV-IR-HPLC) from Panreac.
- Methanol Spectrophotometric grade (Sigma-Aldrich Chemistry).
- Acetonitrile, Chromasolv[®] Plus for HPLC 99.9 % (Sigma-Aldrich Chemistry).
- Phosphoric acid 85 % (Baker).

- Water (R).

Solutions

The following solutions were prepared using the above mentioned ingredients:

- Solution ethanol : water (60:40)

Receptor solution for the permeation experiments with the Franz's cells and validation studies (linearity).

- Mobile phase: 12 % Milli-Q water (0.5 ml H₃PO₄ 85% / L) / 88 % Methanol

Solution used as mobile phase for EHM quantitative determination by HPLC.

Biological material

Abdominal human skin from lipectomy plastic surgery.

These studies were carried out on skin samples from different volunteers; results were extrapolated and conclusions extended to a real population.

Since all studies were carried out using skin samples from the same volunteers, inter-individual variability was assumed to be the same for all experiments, and results were assumed to be comparable.

Analytical method: HPLC

Analytical determination of EHM was carried out by High Pressure Liquid Chromotography (HPLC) using an Alliance 2695 Waters device, 311 nm wavelength.

Table 1 shows the chromatographic conditions used for EHM determination.

Solvent	Ethanol/water (60/40)
Column	LiChrocart 125-4/LiChrospher 60 RP-Select B (5µm)
Mobile phase	12 % water Milli-Q (0.5 ml H ₃ PO ₄ 85% / l) / 88 % MeOH
Injection volume	10 µl
Flow	1 ml /min
Wavelength	311 nm

Table 1: Experimental conditions for the HPLC analysis of EHM. (Ramón, 2003)

Permeation test method

For the permeation studies of semisolid formulas, we used Franz's cells (Franz, 1975) as described by Calpena (1999), adapted to our working conditions.

All permeation studies were conducted following the same method:

- **Temperature:** 37°C for all formulas
- **Receptor medium:** Ethanol/water (60:40)
- **Reinstatement medium:** Ethanol/water (60:40)
- **Extraction volume/reinstatement:** 0.3 ml
- **Agitation speed:** 600-700 rpm.
- **Sample amount:** 300 mg for each formula
- **Experiment duration:** 24 hours approximately
- **Times for sample collection:** pre-set for each test.

To ensure that the whole amount of filter that crossed the membrane was dissolved in the receptor solution, the concentration was kept below 10-20 % of the saturation concentration (SINK conditions) throughout the experiment.

Calculation of the recovery percentage

Prior to determining the amount of retained filter in the skin, in the permeation experiments, we selected the best extractive method for Ethylhexyl methoxycinnamate in order to calculate the recovery percentage.

The skin samples were incubated in a solution with a well-known filter concentration at 37°C for 24h, and subsequently placed into the extractive medium ethanol/water (60:40) where they underwent the ultrasonic technique.

Operative method for determining the ehm amount remaining in the skin

The membrane was first washed with a 0.05 % sodium lauryl sulphate solution and subsequently subjected to the ultrasonic technique (20 minutes) with the selected medium under controlled temperature. The EHM concentration was determined for each sample using HPLC ($\lambda = 311$ nm). The results were compared using non-parametric statistics (U-Mann Whitney) with a 0.05 significance level.

RESULTS AND DISCUSSION

Emulsion preparation

Two simple emulsions (O/A and O/A) had been developed in a previous study and stabilized with non-ionic surfactants and rheological agents, which had the necessary characteristics to prepare the different

formulas with the same proportions of solar filters (10% EHM and TiO₂ in aqueous dispersion 12.5 % and oily dispersion 8 %). The batches had been prepared under completely standardized conditions.

Figure 2 sketches the theoretical locations of the chemical (EHM) and the physical (TiO₂) filters into both O/A and A/O emulsions.

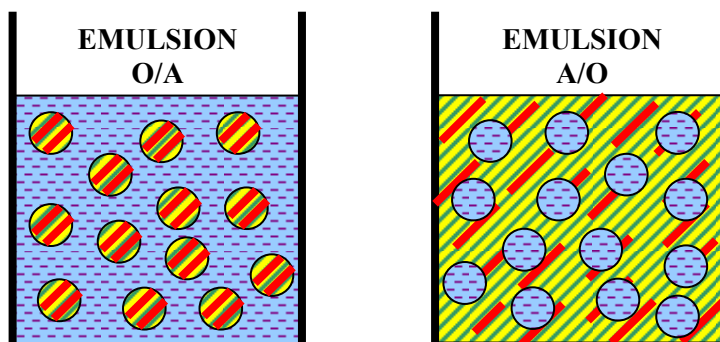






Fig. 2: Theoretical location of the different solar filters in emulsions O/A and A/O.

 **Oily phase with :** TiO₂ oily dispersion () + ~~EHM~~ () 

 **Aqueous phase with :** TiO₂ aqueous dispersion () 

Validation of the analytical method by HPLC

Validation results showed that the analytical method for the *Ethylhexyl methoxycinnamate* was lineal, accurate and precise with a relative error (E %) ranging between -3.842 and 1.150 and a coefficient of variation (CV %) < 4 %.

The detection limit for EHM within the established range of 1.563 - 12.5 µl/ml was 0.312 ± 0.213 and the quantification limit was 0.946 ± 0.646 .

Results of the recovery percentages

The best solvent for EHM extraction is ethanol/water 60:40. Table 2 shows the recovery percentages in human skin from 3 different donors:

EHM Recovery (%)	Mean	Minimum	Maximum
113			
121	113	94.2	121
94.2			

Table 2: EHM recovery (%) in human skin expressed as mean, minimum and maximum values.

Due to the variability of extraction methods with biological samples and on the basis of these results, the EHM recovery with this method can be estimated in approximately 100%.

Results: Determination of the EHM amount remaining in the skin

After the EHM permeation study with O/A, A/O and P® emulsions containing 10% of filters (*Torres, 2006*), we measured the EHM amount retained in the skin. Table 3 and 4 show the results.

O/A 10%	EHM Extraction (µg)	1.1. SKIN WEIGH T (g)	Qret EHM (µg/cm²)
P1	3.53E+01	6.63E-02	2.09E+02
P2	6.39E+01	4.35E-02	5.78E+02
P3	8.21E+01	6.02E-02	5.37E+02
P4	3.82E+01	7.60E-02	1.98E+02
P5	2.82E+01	6.57E-02	1.69E+02
P6	5.22E+01	8.47E-02	2.43E+02

A/O 10%	EHM Extraction (µg)	1.2. SKIN WEIGH T (g)	Qret EHM (µg/cm²)
P1	2.30E+01	6.60E-02	1.37E+02
P2	3.70E+01	7.87E-02	1.85E+02
P3	2.33E+01	6.16E-02	1.49E+02
P4	1.20E+02	1.44E-01	3.27E+02
P5	2.00E+01	6.24E-02	1.26E+02
P6	2.31E+01	1.10E-01	8.23E+01

P[®]	EHM Extraction (μg)	Skin weight (g)	Qret EHM ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
P1	3.30E+01	8.08E-02	1.61E+02
P2	4.41E+01	8.91E-02	1.95E+02
P3	8.70E+01	7.16E-02	4.78E+02
P4	8.58E+01	7.95E-02	4.25E+02
P5	2.74E+01	7.04E-02	1.53E+02
P6	3.08E+01	7.33E-02	1.65E+02
P7	2.79E+01	1.11E-01	9.88E+01

Table 3: The EHM amounts extracted from each replication, skin weight and the EHM amounts in the skin 24 hours after application of the emulsions containing 10 % filter.

Q Retained EHM ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Mean	Minimum	Maximum
O/A 10%	2.26E+02	5.78E+02	1.69E+02
A/O 10%	1.43E+02	3.27E+02	8.23E+01
P[®]	1.65E+02	4.78E+02	9.88E+01

Table 4: EHM amounts remaining in the skin approximately 24 hours after application of the emulsions containing 10 % filter (mean, maximum and minimum values).

Table 5 shows the results of the non parametric comparison (Mann Whitney U) of the EHM amounts remaining (retained) in the skin after removing the different emulsions from the donor compartment.

Statistical treatment of the Qret for the different formulations	p
A/O, O/A and P [®] with 10% EHM	0.053

Table 5: Statistical significance of the comparison of EHM amounts remaining in the skin, with the different studied formulations.

These results (table 5) indicated no statistically significant differences between the filter amounts retained in the skin with the different formulations containing 10 % EHM.

CONCLUSIONS

Our results evidence that EHM is retained in the human skin. We observed no influence of the external phase of the tested emulsions on the retained EHM amount, probably because stationary balance had been reached after 24 hours of experiment.

BIBLIOGRAPHY

Awatramani J, Nucci JE. Quantifying sunscreens and preservatives in cosmetic products. *Cosmetic and Toiletries*. 2005; 120(1): 69-74.

Brinon L, Geiger S, Alard V, Doucet J, Tranchant J, Courraze G. Percutaneous absorption of sunscreens from liquid crystalline phase. *Journal of Controlled Released*. 1999; 60: 67-76.

Bronaugh R, Collier S. In vitro methods for measuring skin permeation. *Skin permeation. Fundamentals and application*. Allured Publishing Corp. 1991; Pàg: 93-111.

Calderilla-Fajardo SB, Cázares-Delgadillo J, Villalobos-García R, Quintanar-Guerrero D, Ganem-Quintanar A. Influence of sucrose esters on the in vivo percutaneous penetration of octyl methoxycinnamate formulated in nanocapsules, nanoemulsion, and emulsion. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2006; 32: 107-113.

Calpena AC, Escribano E, San Martin E, Lauroba J, Obach R, Domenech J. Influence of the formulation on the in vitro transdermal penetration of sodium diclofenac. Evaluation of the topical and systemic anti-inflammatory activity in the rat. *Arzneim.-Forsch./Drug Res*. 1999; 49 (II): 1012-1017.

Carpenter T, Howe A, O'Connor A, Orfanelli J, Siefried R. Protection from sun protectors. *DCI*. 1996. Pàg: 56-69, 100-103.

Chien YW. Novel drug delivery systems. *Fundamentals, Development Concepts and Biomedical Application*. Marcel Dekker, NY (1982).

Ferràndiz C. Enciclopèdia de Medicina i Salut: pell i aparell locomotor. *Enciclopèdia Catalana, S.A.* 1989. Vol. 1; Cap. 1: 15-38.

Franz TJ. Percutaneous absorption. On the relevance of in vitro data. *J. Invest. Dermatol*. 1975. 64(3): 190-195.

Marginean G, Baillet A, Fructus AE, Arnaud-Battandier J, Ferrier D, Marty JP. Evaluation of in vitro percutaneous absorption of UV filters used in sunscreen formulation. *DCI*. 1996. Pàg: 50-62.

Michaels AS, Chandrasekaran SK, Shaw JE. *AIChE Journal*. 1975; 21: 985-996.

Monti D, Saettone MF, Centini M, Anselmi C. Substantivity of sunscreens- in vitro evaluation of the transdermal permeation characteristics of some benzophenone derivatives. *International Journal of Cosmetics Science*. 1993; 15: 45-52.

Nohynek G, Shaefer H. Benefit and risk of organic ultraviolet filters. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2001; 33: 285-299.

Orden de 4 de junio de 1998 por la que se adaptan por primera vez al progreso técnico los anexos de Real Decreto 1599/1997 del 17 de octubre, sobre productos cosméticos. (B.O.E. 12 de junio de 1998).

Ramón E. Absorción percutánea de un filtro solar mediante métodos “*in vitro*” e “*in vivo*”. Máster experimental en Química biológica, ambiental y tecnologías relacionadas. Consejo Superior de Investigación Científica (CSIC). 2003.

Real Decreto 1599/1997 de 17 de octubre sobre productos cosméticos. (B.O.E. 31 de octubre de 1997).

Santoro M, Oliveira D, Kedor-Hackmann E, Singh A. Quantifying benzophenone-3 and octyl methoxycinnamate in sunscreen emulsions. *Cosmetic and Toiletries*. 2004; 119(9): 77-82.

Surber C. The mystical effects of dermatological vehicles. *Skin and Formulation*, 2nd Symposium. APGI (Association de Pharmacie Galénique Industrielle). 2006. Oct 9-10; Versailles (Francia). Conferencia plenaria. Pág: 20.

Torres E, Barbé C, Aróztegui M, Halbaut L, Suñer J, Calpena AC. In vitro permeation of UVB Ethylhexyl methoxycinnamate through human skin from two formulations. *Skin and Formulation*, 2nd Symposium. APGI (Association de Pharmacie Galénique Industrielle). Versailles (France), October 9-10, 2006.

Treffel P, Gabard B. Skin penetration and sun protection factor of ultraviolet filters from two vehicles. *Pharmaceutical Research*. 1996; 13 (5): 770-774.

Walters KA, Watkinson AC, Brain KR. In vitro skin permeation evaluation: the only realistic option. *International Journal of Cosmetic Science*. 1998; 20: 307-316.

Watkinson AC, Joubin H, Green DM, Brain KR, Hadgraft J. The influence of vehicle on permeation from saturated solutions. *International Journal of Pharmaceutics*. 1995; 121: 27-36.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank the companies Química Massó, Merck Farma y Química and Isisa for providing some components. The authors thank Dr. Humet from the Hospital of Barcelona, SCIAS (Barcelona, Spain) for providing skin samples.