



Liberación Sostenida de Cafeína de dos Sistemas Líquido-Cristalinos

Ricardo C. PASQUALI *, Diego CHIAPPETTA, María F. GARCÍA GAMBOA & Carlos BREGNI

*Departamento de Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia y Bioquímica,
Universidad de Buenos Aires, Junín 956, 6° piso (1113) Buenos Aires, Argentina.*

RESUMEN. En este trabajo se evaluaron dos sistemas líquido-cristalinos liotrópicos para la liberación sostenida de cafeína en ensayos *in vitro*: uno formado por una mezcla de Poloxamer 407 y agua, que presenta la fase cúbica micelar normal, y otro constituido por alcohol oleílico con 10 moles de óxido de etileno y agua, que posee una estructura hexagonal normal. En el ensayo de permeación se emplearon membranas de poli(difluoruro de vinileno) impregnadas con una mezcla de lípidos que simulan la composición de la matriz lipídica del estrato córneo. Los ensayos realizados con estas membranas muestran que ambos sistemas líquido-cristalinos serían adecuados para la liberación sostenida de principios activos.

SUMMARY. "Release of Caffeine from two Liquid-crystalline Systems". Two lyotropic liquid-crystalline systems for *in vitro* caffeine liberation were evaluated: one formed by a mixture of 407 Poloxamer and water, that displays micellar normal cubical phase, and other constituted by oleyl alcohol with 10 mol of oxide of ethylene and water, that has a normal hexagonal structure. In the penetration test membranes of poly(vinylidene difluoride) impregnated with a lipid mixture that simulates the composition of the lipidic matrix of the stratum corneum were used. The tests made with these membranes show that both liquid-crystalline systems would be suitable for the liberation of active principles.

INTRODUCCIÓN

Debido a sus altas viscosidades y capacidad para disolver tanto drogas hidrosolubles como liposolubles, los cristales líquidos liotrópicos resultan adecuados como sistemas de liberación sostenida de principios activos. Las drogas liposolubles se alojan entre las cadenas hidrocarbonadas y las hidrosolubles en la zona polar ¹.

Los copolímeros en bloques de poli(óxido de etileno) y poli(óxido de propileno) son utilizados como sistemas de liberación controlada ². Uno de los copolímeros usados con este fin es el Poloxamer 407, que tiene una fórmula media OE100OP70OE100, donde OE es una unidad de óxido de etileno y OP de óxido de propileno. A temperatura ambiente, los sistemas formados por Poloxamer 407 y agua presentan dos fases líquida -cristalinas liotrópicas: la cúbica micelar normal (18 a 64 % de copolímero) y la hexago-

nal normal (66 a 75 % de copolímero) ³. Otro tensioactivo no iónico usado en sistemas de liberación controlada es el alcohol oleílico con 10 moles de óxido de etileno (Oleth-10) ⁴. Los sistemas formados por este tensioactivo y agua presentan las fases liotrópicas hexagonal normal (33 a 63 % de tensioactivo) y laminar (67 a 83 % de tensioactivo) ⁵; la fase hexagonal normal fue incorrectamente atribuida como laminar por Makai *et al.* ⁴.

En los ensayos *in vitro* que simulan la absorción percutánea de principios activos se emplean diferentes tipos de membranas, tales como piel humana, de animales, y materiales sintéticos hidrofílicos y lipofílicos, ya sea solos o impregnados con sustancias liposolubles.

Iwai *et al.* ⁶ formularon una emulsión cosmética que contenía una mezcla artificial de lípi-

PALABRAS CLAVE: Brij 97, Cafeína, Cristales líquidos liotrópicos, Liberación sostenida de fármacos, Lutrol F127.

KEY WORDS: Brij 97, Caffeine, Drug delivery, Lutrol F127, Lyotropic liquid crystals.

* Autor a quien dirigir la correspondencia. *E-mail:* repasquali@yahoo.com

dos, formada por una pseudoceramida, colesterol y ácido esteárico, que imitaba a los del estrato córneo. Glombitza ⁷ realizó estudios de permeación *in vitro* de diclofenac sódico impregnando con distintas mezclas de ceramidas, ácidos grasos y colesterol a membranas hidrofóbicas de poli(tetraflúoretileno) (PTFE), poli(difluoruro de vinilideno) (PVDF) y de siliconas. Jager ⁸ utilizó una mezcla de lípidos muy similar a la de la matriz lipídica del estrato córneo que aplicó sobre membranas hidrofílicas de policarbonato para estudiar la permeación de ácido *para*-aminobenzoico, para-aminobenzoato de etilo y *para*-aminobenzoato de butilo. Las curvas de absorción que obtuvo Jager con esa mezcla de lípidos eran similares a las que observó con la extraída del estrato córneo humano.

En este trabajo se evaluaron dos sistemas líquido-cristalinos liotrópicos para la liberación sostenida de cafeína en ensayos *in vitro*: uno formado por una mezcla de Poloxamer 407 y agua, que presenta la fase cúbica micelar normal, y otro constituido por alcohol oleílico con 10 moles de óxido de etileno y agua, que posee una estructura hexagonal normal. Se seleccionó a la cafeína como la droga modelo debido a sus aplicaciones terapéuticas ⁹⁻¹² y cosméticas ¹³. La cafeína es usada tópicamente en cosméticos por su actividad en el metabolismo de las grasas ¹⁴. Además, la cafeína es una de las doce sustancias que utilizó Franz en sus ensayos *in vitro* de absorción percutánea ¹⁵. En el ensayo de permeación se emplearon membranas de poli(difluoruro de vinilideno) impregnadas con una mezcla de lípidos que simulan la composición de la matriz lipídica del estrato córneo. Con el fin de aumentar la solubilidad de la cafeína en agua se agregó a las formulaciones una cantidad equimolecular de benzoato de sodio ^{9,10}.

MATERIALES Y MÉTODOS

El Poloxamer 407 (Lutrol F127) fue provisto por BASF, La cafeína, el benzoato de sodio, el hidróxido de sodio y el colesterol por Merck, el metil parabeno y el propil parabeno por Ueno Fine Chemicals Industry Ltd, el Oleth-10 (Brij 97) por Uniquema, el octildodecanol (Eutanol G) y el miristato de isopropilo por Cognis, el Carbopol 940 por Noveon, el bórax por Mallinckrodt Chemical Works, el propilenglicol por Dow y la vaselina líquida y la cera de abejas respondían a las especificaciones de la Farmacopea Nacional Argentina VI. El ácido palmítico, con una pureza del 99,5%, fue provisto por Anedra y la ceramida 3 por Degussa.

Preparación de los sistemas dadores

Fase liotrópica cúbica micelar normal

La matriz de este sistema, que contiene 30 % de Lutrol F127 y 70 % de agua, es un cristal líquido liotrópico con una estructura cúbica micelar normal ³. El agregado de la cafeína, el benzoato de sodio y los parabenos no alteraron las características líquida-cristalinas. El sistema, cuya composición se da en la Tabla 1, se preparó a 70-75 °C, mezclando hasta obtener un producto homogéneo.

Componente	% m/m
Lutrol F127	29,40
Cafeína	1,00
Benzoato de sodio	0,74
Metil parabeno	0,20
Propil parabeno	0,05
Agua	68,61

Tabla 1. Composición del sistema dador formado por una fase liotrópica cúbica micelar normal.

Fase liotrópica hexagonal normal

La matriz está formada por 52 % de Brij 97 y 48% de agua. Este sistema (Tabla 2), que se presenta como un cristal líquido liotrópico con una estructura hexagonal normal ⁵, se preparó de la misma forma que el anterior. El examen al microscopio polarizante muestra que la estructura hexagonal se mantuvo por agregado de la cafeína, el benzoato de sodio y los parabenos.

Componente	% m/m
Brij 97	49,93
Cafeína	1,00
Benzoato de sodio	0,74
Metil parabeno	0,20
Propil parabeno	0,05
Agua	48,08

Tabla 2. Composición del sistema dador formado por una fase liotrópica hexagonal normal.

Emulsión de agua en aceite

La composición de esta emulsión, que se da en la Tabla 3, se basó en un trabajo de Salisbury et al. ¹⁸. Se agregó, agitando, la fase acuosa (agua, cafeína, benzoato de sodio, metil parabeno y bórax) sobre la oleosa (miristato de isopropilo, vaselina líquida, cera de abejas y propil parabeno) a 70-75 °C.

Hidrogel

La composición se da en la Tabla 4. El Carbopol 940 se dispersó en un mortero de porce-

Componente	% m/m
Miristato de isopropilo	5,00
Vaselina líquida	45,00
Cera de abejas	16,6
Propil parabeno	0,05
Cafeína	1,00
Benzoato de sodio	0,74
Metil parabeno	0,10
Bórax	0,96
Agua	30,55

Tabla 3. Composición del sistema dador formado por una emulsión de agua en aceite.

Componente	% m/m
Carbopol 940	1,00
Propilenglicol	20,00
Trietanolamina	1,80
Cafeína	1,00
Benzoato de sodio	0,74
Metil parabeno	0,20
Agua	75,26

Tabla 4. Composición del sistema dador formado por un hidrogel.

lana en la mitad del agua, mezclando continuamente hasta obtener una consistencia uniforme. En un vaso de precipitados se disolvió el metil parabeno en el propilenglicol y se agregó la cafeína, el benzoato de sodio y el resto de agua agitando con un agitador magnético hasta disolución total de la cafeína y el benzoato de sodio. La solución obtenida se agregó al mortero y se mezcló hasta obtener un producto homogéneo. Luego se agregó la trietanolamina, agitando.

Caracterización de los sistemas dadores

En todos los sistemas dadores se midió el pH de una dispersión al 10 %. Este ensayo se realizó por triplicado y se informó el promedio.

Fase cúbica micelar normal

La calorimetría diferencial de barrido se realizó con el fin de determinar la temperatura máxima a la cual se mantiene esta fase líquida cristalina. Este ensayo se efectuó en el Instituto de Química Física de los Materiales, Medio Ambiente y Energía (INQUIMAE) dependiente de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Se realizaron barridos en dos condiciones de trabajo, en las que se utilizó una atmósfera de nitrógeno con un caudal de 30 ml/min: a) se utilizaron 32 mg de

muestra a una velocidad de calentamiento de 2 °C/min y b) la cantidad de muestra fue de 23,95 mg y la velocidad de calentamiento de 5 °C/min.

Fase hexagonal normal

La calorimetría diferencial de barrido se realizó sobre la matriz formada por 52% de Brij 97 y 48% de agua y sobre la matriz con cafeína y benzoato de sodio. En ambos casos se utilizó una atmósfera de nitrógeno con un caudal de 30 ml/min. En el primer caso el barrido se realizó sobre 19,01 mg a una velocidad de calentamiento de 5 °C/min y en el caso de la matriz con cafeína y ácido benzoico se realizó sobre 16,90 mg a una velocidad de barrido de 5 °C/min.

Los datos de Difracción de rayos X, que se realizó sobre la matriz formada por 48% de Brij 97 y 52% de agua, fueron suministrados por el Dr. Zhongni Wang, de la Shandong University, República Popular China. Se empleó un sistema de difracción de rayos X de pequeño ángulo HMBG-SAX (Austria) con una radiación $K\alpha$ del cobre con un filtro de níquel (0,154 nm) que operó con una tensión de 50 kV y una intensidad de corriente de 40 mA. La distancia de la muestra al detector fue de 277 cm. La temperatura se mantuvo en $25,0 \pm 0,1$ °C.

Para determinar la textura al microscopio polarizante se utilizó un microscopio polarizante Nikon modelo HFX-DX provisto de cámara fotográfica.

Emulsión de agua en aceite

Con el fin de confirmar que la emulsión era del tipo agua en aceite se utilizaron los siguientes métodos: a) papel indicador con cloruro de cobalto (II), b) conductividad eléctrica específica con un conductímetro Parsec modelo Antares VI a $25 \pm 0,5$ °C. y c) ensayo de dilución: sobre sendas muestras de la emulsión se agregan, respectivamente, unas gotas de vaselina líquida y de agua; si la emulsión se disuelve en la vaselina es del tipo agua en aceite.

El tamaño de los glóbulos dispersos se determinó a partir de una microfotografía de la emulsión, diluida cinco veces con vaselina líquida, obtenida con un microscopio óptico Arcano modelo XSZ-107 E provisto de ocular graduado y cámara fotográfica.

Preparación de las membranas

Se utilizaron membranas de poli(difluoruro de vinilideno) (PVDF) de 4,7 cm de diámetro y

Componente	% m/m
Ácido palmítico	20,90
Colesterol	31,51
Ceramida 3	47,59

Tabla 5. Composición de la mezcla de lípidos usada para impregnar las membranas.

poros de 0,22 μm (Sartorius) impregnadas con una mezcla de lípidos que simula a los de la matriz lipídica del estrato córneo. La simulación se realizó con una mezcla equimolecular (Tabla 5) de ácido palmítico ($M_r = 256,43$), colesterol ($M_r = 386,65$) y ceramida 3 ($M_r = 583,97$)

Se colocó cada una de las membranas, previamente pesadas al 0,1 mg, en una placa de Petri de 4,5 cm de diámetro y se dobló el sobrante en el borde para ajustarla a la placa. Luego se agregó 1 cm^3 de una solución de los lípidos en una mezcla de hexano-etanol (2:1 en volumen) cuya concentración era 34,7 mg/cm^3 . Si la solución se volvía turbia, se redisolvían los lípidos elevando la temperatura algunos grados Celsius. Utilizando una espátula, se eliminó el aire y los vapores contenidos debajo de la membrana.

Una vez que se evaporó la mayor parte del solvente, se calentaron las membranas tratadas a 70 $^{\circ}\text{C}$ durante 10 min. Después se pesaron y se calculó la masa de lípidos depositada. Se seleccionaron las membranas en las que se depositaron entre 32 y 38 mg de lípidos y se recortaron para obtener discos de 3,5 cm de diámetro, que es el correspondiente a la boca del compartimiento receptor de las celdas de Franz usadas.

Finalmente, se hidrataron las membranas sumergiéndolas durante 24 h en una solución tampón (fosfato de Sørensen), mantenida a 37 $^{\circ}\text{C}$, que contiene 9,08 gramos por litro de dihidrógenofosfato de potasio y cantidad suficiente de hidrógenofosfato de sodio como para llevar el valor del pH a 5,0¹⁹.

Ensayo de permeación

Se utilizaron celdas de Franz¹⁵, que consisten en dos compartimentos: el superior para el sistema dador y el inferior para el medio receptor. El compartimiento inferior tiene un volumen de 15,0 cm^3 . Las celdas se conectaron en paralelo a un sistema de circulación de agua a 32 $^{\circ}\text{C}$ ($\pm 0,5$ $^{\circ}\text{C}$). El medio receptor consistió de una solución tampón de pH igual a 7,4 preparada de acuerdo a la USP 24²⁰. Esta solución fue agitada continuamente usando un imán de 12 mm de largo y un agitador magnético. Antes de colocar

la membrana entre los dos compartimentos de la celda se esperó 1 h para permitir que se estabilizara la temperatura. Luego se extendió en forma uniforme 1,00 g del sistema dador en cada membrana.

Los ensayos de permeación duraron 4 h y fueron realizados por duplicado para cada sistema dador. Se tomaron muestras del medio receptor después de 1, 2, 3 y 4 h de iniciado el ensayo. En cada toma de muestra se extrajo 1 ml del medio receptor de cada celda, que se transfirió a un tubo de Eppendorf, utilizando una jeringa de 1 ml. El volumen extraído fue reemplazado por un volumen igual de medio receptor fresco.

Análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Para valorar la cafeína en las muestras del medio receptor se utilizó la técnica descrita en la USP 24 20. Se empleó un cromatógrafo Shimadzu modelo SCL-6B equipado con un detector espectrofotométrico ultravioleta Shimadzu modelo SPD-6A. La detección se llevó a cabo a una longitud de onda de 275 nm. La separación cromatográfica se realizó con una columna C₁₈ (Nucleosil; 150 x 4,6 mm; 5 μm). La fase móvil se preparó de acuerdo a la USP 24²⁰. La velocidad de flujo fue de 1 cm^3/min y el volumen inyectado 20 μl .

RESULTADOS

Fase liotrópica cúbica micelar normal

Calorimetría diferencial de barrido

No se observan picos entre la temperatura ambiente y 80 $^{\circ}\text{C}$.

pH

El valor medio obtenido en tres mediciones del pH de una dispersión al 10% es 6,83.

Fase liotrópica hexagonal normal

Calorimetría diferencial de barrido

La matriz formada por 52% de Brij 97 y 48% de agua presenta un pico endotérmico a 54,8 $^{\circ}\text{C}$, que corresponde a la transición de la fase hexagonal normal a líquido isotrópico, ya que el sistema experimenta a esa temperatura un brusco descenso de la viscosidad (Fig.1a). La incorporación de cafeína y benzoato de sodio no modifica significativamente esta temperatura de transición, ya que se obtuvo un pico endotérmico a 53,8 $^{\circ}\text{C}$ (Fig.1b). La diferencia entre ambas temperaturas está dentro de la incertidumbre del ensayo.

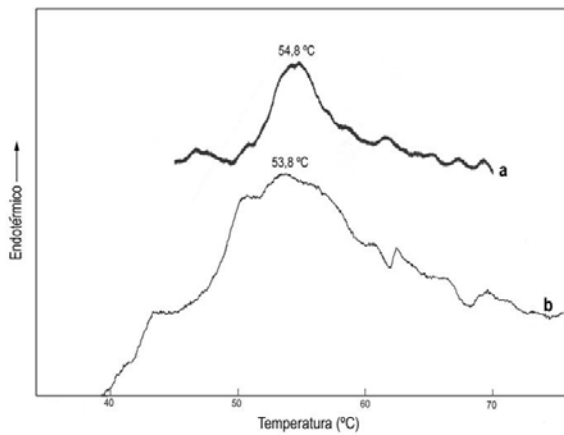


Figura 1. Calorimetría diferencial de barrido de: **(a)** a la matriz formada por 52 % de Brij 97 y 48 % de agua; **(b)** la matriz anterior con 1,00 % de cafeína y 0,74 % de benzoato de sodio.

pH

El valor medio obtenido en tres mediciones del pH de una dispersión al 10% es 5,53.

Difracción de rayos X

En la Fig. 2 está representado el difractograma correspondiente al sistema formado por 52% de Brij 97 y 48 % de agua. Se observan tres picos que corresponden a espaciados de 6,70 nm, 3,87 nm y 3,35 nm, cuyos índices de Miller son, respectivamente, (100), (110) y (200), que están en la relación

$$1: \frac{1}{\sqrt{3}} : \frac{1}{\sqrt{4}}$$

lo que conforma que corresponde a la fase hexagonal. El valor del parámetro de la red (α) para este sistema, que representa la distancia entre los centros de dos cilindros adyacentes en la fase hexagonal, es igual a 7,74 nm.

Textura al microscopio polarizante

Tanto la matriz formada por Brij 97 y agua, como el sistema formado por la matriz con cafeína,

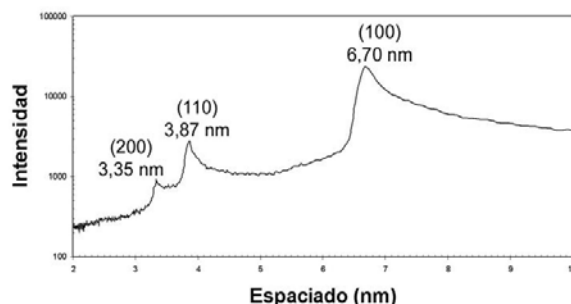


Figura 2. Difractograma correspondiente a la matriz formada por 52 % de Brij 97 y 48% de agua.

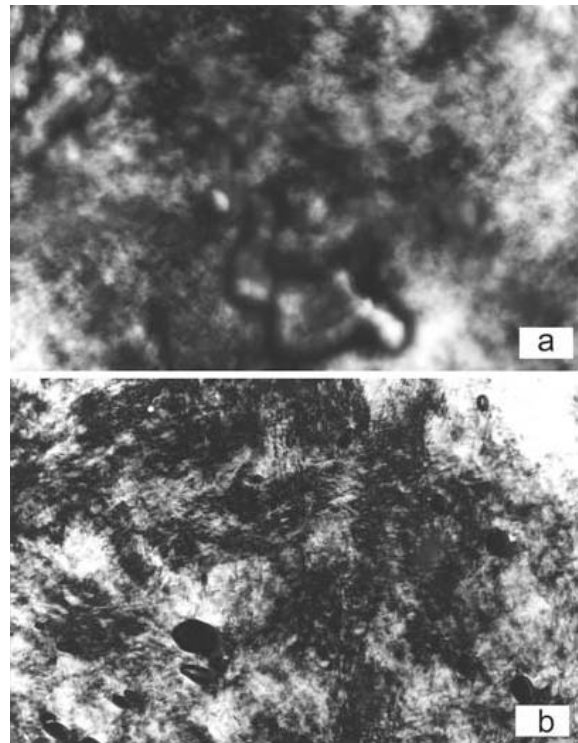


Figura 3. Texturas al microscopio polarizante con los polarizadores cruzados (x200) de **(a)** matriz formado por 52 % de Brij 97 y 48 % de agua; **(b)** matriz anterior con 1% de cafeína, 0,74% de benzoato de sodio y parabenos.

ína, benzoato de sodio y los parabenos, presentan una textura no geométrica que es característica de la fase hexagonal ²¹ (Fig. 3 a y b).

Emulsión de agua en aceite

pH

El valor medio obtenido en tres mediciones del pH de una dispersión al 10% es 8,39.

Tipo de emulsión

Se confirmó que la emulsión era del tipo agua en aceite a partir de los siguientes resultados: a) el papel indicador con cloruro de cobalto (II) no viró inmediatamente al rosado; b) la conductividad eléctrica específica fue de 1,5 $\mu\text{S}/\text{cm}$, en tanto que los valores de la conductividad eléctrica específica de las emulsiones del tipo aceite en agua ensayadas por los autores fueron superiores a 100 $\mu\text{S}/\text{cm}$; c) ensayo de dilución: la emulsión se dispersa en la vaselina líquida.

Tamaño de los glóbulos dispersos

A partir de microfotografías de la emulsión diluida cinco veces con vaselina líquida, obtenidas con 1.000 aumentos, se determinó que el

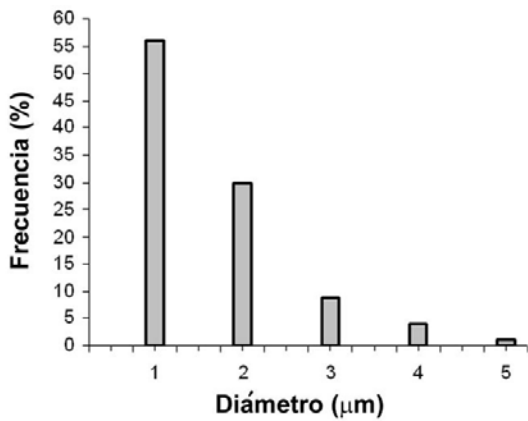


Figura 4. Distribución del tamaño de los glóbulos de la emulsión de agua en aceite.

diámetro medio de los glóbulos es igual o menor que 1 µm (Fig. 4).

Hidrogel

pH

El valor medio obtenido en tres mediciones del pH de una dispersión al 10% es 7,38.

Resultados de los ensayos de permeación

En la Fig. 5 se detallan las absorciones de cafeína por el medio receptor para los distintos medios dadores. Las cinéticas de liberación de la cafeína contenida en el hidrogel, la fase hexagonal normal y en la fase cúbica micelar corresponden a un orden igual a cero, para el cual los coeficientes de correlación (*r*) son, respectivamente, 0,9996, 0,9980 y 0,9940.

Para la emulsión de agua en aceite, la liberación de cafeína al medio receptor sigue la cinética propuesta por Takeru Higuchi^{22,23} para partículas sólidas suspendidas en pomadas, en la cual la cantidad de sustancia absorbida por el medio receptor es proporcional a la raíz cuadrada del tiempo (Ecuación 1). La recta obtenida al graficar la cantidad de cafeína liberada por unidad de área en función de la raíz cuadrada del tiempo posee un coeficiente de correlación igual a 0,9986.

$$Q = 2C_0 \left(\frac{Dt}{\pi} \right)^{1/2} \quad [1]$$

En la Ecuación 1, *Q* es la cantidad de droga liberada por unidad de área (en µg/cm²), *C*₀ es la concentración inicial de la droga en el vehículo (en este caso 104 µg/cm³), *D* el coeficiente de difusión de la droga en el vehículo (en cm²/h) y *t* el tiempo (en h).

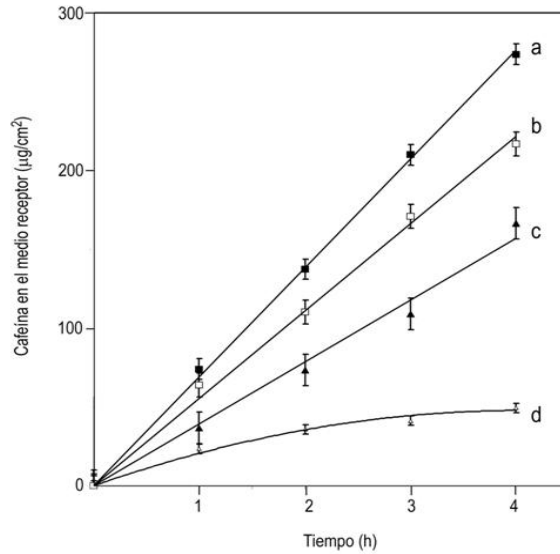


Figura 5. Liberación de cafeína al medio receptor: (a) Hidrogel, (b) fase hexagonal normal, (c) fase cúbica, (d) Emulsión w/o.

DISCUSIÓN

Makai *et al.*⁴ atribuyeron una estructura laminar al sistema formado por Brij 96, que posee la misma composición química que el Brij 97 usado en este trabajo, y agua en la relación 1:1. Sin embargo, las microfotografías obtenidas con los polarizadores cruzados por estos autores poseen una textura igual a la descrita en este trabajo, que es típica de la fase hexagonal. Además, de la observación de los difractogramas publicados por Makayi *et al.*⁴ no se observa una relación de espaciados que pueda atribuirse a la fase laminar. Los resultados obtenidos por Wang *et al.*⁵ demuestran que la estructura correcta es la hexagonal normal y no la laminar.

La velocidad de liberación de la cafeína contenida en el hidrogel, la fase hexagonal normal y en la fase cúbica micelar se mantuvo constante durante el tiempo que duró el ensayo. Esto se puede explicar admitiendo que el proceso de erosión de los sistemas dadores por la solución receptora se realiza a una velocidad fija, tal como lo demostraron Zhang *et al.*²⁴ en geles de Poloxamer 407, y que la velocidad de difusión de la cafeína en cada uno de los sistemas dadores es despreciable frente a la velocidad de erosión. Por lo tanto, la velocidad de liberación de la cafeína estaría controlada por la velocidad de erosión de cada uno de los sistemas dadores. La expresión de la velocidad de liberación de la cafeína está dada por la Ecuación 2, en la cual *m* es la masa de cafeína liberada al medio receptor en un tiempo *t*, *B* es la velocidad de ero-

sión de la superficie del medio dador 24 y A es el área de la superficie de contacto ($3,06 \text{ cm}^2$).

$$\frac{dm}{C_0 t} = BC_0 A \quad [2]$$

Integrando la Ecuación 2 se llega a que la velocidad de erosión de la superficie del medio dador está dada por (Ecuación 3):

$$B = \frac{Q}{C_0 t} \quad [3]$$

Los valores de B para el hidrogel, la fase hexagonal normal y la fase cúbica micelar son, respectivamente, $69 \text{ } \mu\text{m/h}$, $57 \text{ } \mu\text{m/h}$ y $39 \text{ } \mu\text{m/h}$.

La velocidad de liberación de la cafeína contenida en la emulsión de agua en aceite está controlada por la velocidad de difusión de la cafeína en la emulsión. Comparando la Ecuación 1 con la de la recta obtenida al graficar la cantidad de cafeína liberada por unidad de área (en $\mu\text{g/cm}^2$) en función de la raíz cuadrada del tiempo (Ecuación 4), se llega a que el coeficiente de difusión de la cafeína en la emulsión de agua en aceite es igual a $4,2 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{h}$.

$$Q = 23,27 \sqrt{t} \quad [4]$$

Los ensayos realizados con las membranas de poli(difluoruro de vinileno) impregnadas con una mezcla de lípidos que simulan a la matriz lipídica del estrato córneo muestran que ambos sistemas líquido-cristalinos serían adecuados para la liberación sostenida de principios activos.

Agradecimientos. Al aporte financiero provisto por UBACyT (Proyecto BO 43). Los autores agradecen la provisión de muestras a Leopoldo Abdon (Degussa), Lorena V. Dujmovic (Quetzal Química), Natalia Sacco (Cognis) y Horacio Tassano (Uniquema). A Guillermo Cozzi, del Servicio Geológico Minero de la Argentina (SEGEMAR), por permitirnos utilizar el microscopio polarizante. Al Dr. Zhongni Wang, de la Shandong University, República Popular China, por la corrida de difracción de rayos X en pequeño ángulo sobre un sistema líquido cristalino formado por Brij 97 y agua.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Gabboun, N.H., N.M. Najib, H.G. Ibrahim & S. Assaf (2001) *Int. J. Pharm.* **212**: 73-80.
- Pasquali, R.C., D. Chiappetta & C. Bregni (2005) *Acta Farm. Bonaerense* **24**: 610 -8.
- Ivanova, R., B. Lindman & P. Alexandridis (2000) *Langmuir* **16**: 9058-69.
- Makai, M., E. Csányi, Zs. Németh, J. Pálkás & I. Er_s (2003) *Int. J. Pharm.* **256**: 95-107.
- Wang, Z., F. Liu, Y. Gao, W. Zhuang, L. Xu, B. Han, G. Li & G. Zhang (2005) *Langmuir* **21**: 4931-7.
- Iwai, H., J. Fukasawa & T. Suzuki (1998) *Int. J. Cosmetic Sci.* **20**: 87-102.
- Glombitza, B. (2001) "Lipidsysteme als Stratum corneum Modelle Charakterisierung und Eig-nung für Permeationsuntersuchungen". Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Dissertation., Druckjahr.
- Jager, M.W. de (2006) "Development of a stratum corneum substitute for in vitro percutaneous penetration studies. A skin barrier model comprising synthetic stratum corneum lipids". Doctoral thesis, Universiteit Leiden.
- Amato M., M. Isenschmid & P. Huppi (1991) *Eur. J. Pediatr.* **150**: 592-4.
- Conney A.H., Y.P. Lu, Y.R. Lou & M.T. Huang (2002) *Eur. J. Cancer Prev.* **11** (suppl. 2): S28-S36.
- Lu, Y-P., Y-R. Lou, J-G. Xie, Q-Y. Peng, S. Zhou, Y. Lin, W.J. Shih. & A.H. Conney (2007) *Carcinogenesis* **28**: 199-206.
- Lu, Y-P., Y-R. Lou, J-G. Xie, Q.-Y. Peng, J. Liao, C.S. Yang, M.-T. Huang & A.H. Conney (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99** : 12455-60.
- Bertin C., H. Zunino, J. C. Pittet, P. Beau, P. Pineau, M. Massonneau, C. Robert & J. Hopkins (2001) *J. Cosmet. Sci.* **52**: 199-210.
- Nicoli, S., P. Colombo & P.Santi (2005) *Am. Assoc. Pharm. Sci. J.* **7**: E218-E223.
- Franz, T.J. (1975) *J. Invest. Dermatol.* **64**: 190-5.
- Higuchi, T. & D.A. Zuck (1952) *J. Am. Pharm. Assoc.* **41** 10-3.
- Higuchi, T. & D.A. Zuck (1953) *J. Am. Pharm. Assoc.* **42**: 132-7.
- Salisbury, R., E.E. Leuallen & L.T. Chavkin (1954) *J. Am. Pharm. Assoc.* **43**: 117-9.
- Diem, K. (1973) "Tablas Científicas". Sexta Edición, Ciba-Geigy, Basilea, 783 pp.
- US Pharmacopeia, National Formulary USP 24 (2000) United States Pharmacopoeia Convention, Inc. Washington DC.
- Rosevear, F.B. (1954) *J. Am. Oil Chem. Soc.* **31**: 628-39.
- Higuchi, T. (1960) *J. Soc. Cosmet. Chem.* **11**: 85-97.
- Higuchi, T. (1961) *J. Pharm. Sci.* **50**: 874-5.
- Zhang, L., D.L. Parsons, C. Navarre & U. B. Kompella (2002) *J. Control. Release* **85**: 73-81.