



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

FACULTAT DE FARMÀCIA

Programa de Doctorado en Biomedicina y Farmacia

**“AVANCES EN SEGURIDAD DE LOS PRODUCTOS
COSMÉTICOS: ESTUDIO DE LA PERMEABILIDAD CUTÁNEA DE
INGREDIENTES DE USO RESTRINGIDO.”**

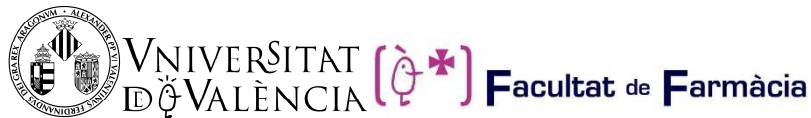
TESIS DOCTORAL

Lucía Estela López Sánchez

Directoras:

Virginia Merino Sanjuán, Matilde Merino Sanjuán

Burjasot (Valencia), Julio 2020



**Departamento de Farmacia y Tecnología
Farmacéutica y Parasitología**

Programa de Doctorado en Biomedicina y Farmacia

**“AVANCES EN SEGURIDAD DE LOS PRODUCTOS COSMÉTICOS:
ESTUDIO DE LA PERMEABILIDAD CUTÁNEA DE INGREDIENTES DE USO
RESTRINGIDO.”**

Memoria que, para optar al
Grado de Doctor en Farmacia, presenta:

Lucía Estela López Sánchez

Directoras:

Virginia Merino Sanjuán, Matilde Merino Sanjuán

Burjasot (Valencia), 14 de julio de 2020



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA (Q*) Facultat de Farmàcia

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y Parasitología

Programa de Doctorado en Biomedicina y Farmacia

Las Dras. Virginia Merino Sanjuán y Matilde Merino Sanjuán, Catedráticas del Área de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Valencia,

Certifican que:

El trabajo de Tesis Doctoral realizado por Lucía Estela López Sánchez y que lleva por título "**AVANCES EN SEGURIDAD DE LOS PRODUCTOS COSMÉTICOS: ESTUDIO DE LA PERMEABILIDAD CUTÁNEA DE INGREDIENTES DE USO RESTRINGIDO**", ha sido realizado bajo la dirección compartida de las mismas y reúne todos los requisitos necesarios para su presentación, juicio y calificación.

Lo que suscriben, en Valencia, a 14 de julio de 2020.

Virginia Merino Sanjuán

Matilde Merino Sanjuán

Este proyecto ha sido subvencionado por MINECO (CTQ2015-70301-R)

AGRADECIMIENTOS

Desde aquí me gustaría expresar un sincero y profundo agradecimiento a todas esas personas que, de una forma u otra, han hecho posible que este trabajo sea hoy una realidad.

En primer lugar quisiera mostrar mi gratitud a mis directoras de Tesis, la Dra. Matilde Merino Sanjuán y la Dra. Virginia Merino Sanjuán, por su gran ayuda, dedicación y paciencia, porque sin todos vuestros conocimientos y experiencia científica, no habría sido capaz de realizar esta Tesis después de tantos años alejada de la investigación.

Desearía agradecer también al Departamento de Química Analítica de la Universidad de Valencia, pero sobre todo a Pablo Miralles Ibarra, la ayuda y disponibilidad que me han mostrado. Gracias también a mi compañero Josep Edo Peñarrocha, con el que compartí laboratorio durante una parte de este largo camino.

Por supuesto, quiero dar las gracias a todos mis amigos, que han vivido esta etapa de mi vida desde el otro lado. Gracias por animarme y estar ahí siempre.

Quiero dar especialmente las gracias a mis padres y a mi hermano por ser para mí ejemplo diario de trabajo y sacrificio, y por supuesto a mi compañero de vida, por escucharme y animarme siempre. Gracias Jose por tu ayuda, sin ella nada sería posible.

A todos y todas, mil gracias.

PRÓLOGO

La estructura de la presente tesis doctoral cumple con los requisitos establecidos por la Escuela de Doctorado de la Universitat de València. Consta de 6 capítulos. El primer capítulo recoge una breve introducción al tema objeto de estudio y la descripción detallada de los objetivos del trabajo de investigación realizado. En el capítulo 2, bajo el título de antecedentes, se detallan los aspectos básicos relacionados con los productos cosméticos, con la estructura de la piel y con los métodos disponibles para caracterizar y cuantificar el paso de los fármacos y xenobióticos a través de la piel, que facilitan la posterior comprensión de los estudios realizados en esta tesis. Los capítulos 3 y 4 se han redactado siguiendo la estructura de un artículo científico. En el capítulo 3 se detalla el trabajo centrado en el desarrollo y en la validación de un método analítico para cuantificar la absorción transdérmica del bronidox. El capítulo 4 recoge el estudio sobre la evaluación de la absorción transdérmica *in vitro* de los conservantes estudiados en esta Memoria; el bronidox, el bronopol y el formaldehído, este último aplicado directamente o liberado desde bronopol y DMDM hidantoína. En el capítulo 5 se incluye un breve resumen y se detallan las conclusiones más importantes de los estudios realizados. Por último, en el capítulo 6 se relaciona la bibliografía consultada para el desarrollo del trabajo así como para la interpretación y justificación de los resultados obtenidos.

INDICE

1	INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	7
2	ANTECEDENTES	15
2.1	PRODUCTOS COSMÉTICOS.....	17
2.1.1	Orígenes de la cosmética	17
2.1.2	Tipos de formulaciones cosméticas	19
2.1.3	La Regulación Cosmética de la Unión Europea.....	21
2.1.4	Evaluación de la seguridad del producto cosmético.....	26
2.1.5	Conservantes cosméticos.....	29
2.2	ESTRUCTURA DE LA PIEL Y SUS ANEXOS	39
2.2.1	Capa superficial	42
2.2.2	Epidermis	43
2.2.3	Dermis	47
2.2.4	Hipodermis.....	50
2.3	VÍAS DE PENETRACIÓN CUTÁNEA	51
2.3.1	Factores implicados en la absorción transdérmica.....	55
2.4	MÉTODOS EXPERIMENTALES <i>IN VITRO</i> PARA EL ESTUDIO DE LA ABSORCIÓN TRANSDÉRMICA	65
2.4.1	Modelos animales como alternativa a la piel humana	66
2.4.2	Técnicas experimentales.....	68
3	DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE BRONIDOX	73
3.1	INTRODUCCIÓN.....	75
3.2	MATERIALES Y MÉTODOS	76
3.2.1	Condiciones cromatográficas.....	76
3.2.2	Solución amortiguadora de pH.	77
3.2.3	Soluciones patrón	78

3.3	VALIDACIÓN DEL MÉTODO	78
3.3.1	Linealidad	79
3.3.2	Precisión y exactitud	80
3.3.3	Límites de detección y cuantificación	81
3.3.4	Especificidad.....	82
3.4	RESULTADOS	83
3.4.1	Condiciones cromatográficas.....	83
3.4.2	Validación del método analítico	83
3.5	DISCUSIÓN.....	88
3.5.1	Desarrollo y optimización del método analítico de Bronidox.....	88
3.5.2	Validación de método analítico	92
4	ESTUDIOS DE ABSORCIÓN TRANSDÉRMICA <i>IN VITRO</i> DEL BRONIDOX, BRONOPOL Y FORMALDEHÍDO (directamente aplicado y desde BRONOPOL y DMDM HIDANTOÍNA).	95
4.1	INTRODUCCIÓN.....	97
4.1.1	Bronidox.....	97
4.1.2	Formaldehído	100
4.1.3	Sustancias liberadoras de formaldehído: Bronopol y DMDM hidantoína.	106
4.2	MATERIALES Y MÉTODOS	114
4.2.1	Sustancias y formulaciones ensayadas	114
4.2.2	Estabilidad de los conservantes	116
4.2.3	Estudios de absorción transdérmica.....	117
4.2.4	Métodos analíticos.....	125
4.3	ANÁLISIS DE DATOS.....	128
4.4	RESULTADOS	133
4.4.1	Estabilidad del bronidox.....	133
4.4.2	Absorción transdérmica.....	134

4.5	DISCUSIÓN.....	167
4.5.1	Estudio de estabilidad.....	167
4.5.2	Estudios de absorción transdérmica.....	168
5	RESUMEN Y CONCLUSIONES.....	185
6	BIBLIOGRAFÍA.....	191

CAPITULO 1

1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El empleo diario o muy frecuente de los productos cosméticos conlleva una exposición continua a sus ingredientes por parte de los usuarios, por lo que se requiere un riguroso control del cumplimiento de los requisitos legales establecidos, que tienen por objetivo garantizar la seguridad de los usuarios.

Normalmente, todo producto cosmético se encuentra expuesto a dos agentes altamente contaminantes durante su uso: el medio ambiente y el propio consumidor.

La mayoría de formulaciones cosméticas, debido a que contienen un alto porcentaje de agua, a que se almacenan y se utilizan a temperatura ambiente o superior y en lugares húmedos, a la repetida apertura de los envases multidosis, son productos en los que los microorganismos proliferan muy fácilmente. Además, muchas de las sustancias empleadas en su elaboración pueden ser degradadas biológicamente por microorganismos, por lo que se deterioran con facilidad en un periodo de tiempo corto. Por estas razones, en las formulaciones cosméticas se incorporan sustancias conservantes, cuya finalidad exclusiva o principal es prevenir la contaminación por microorganismos o inhibir el desarrollo de microorganismos en los productos cosméticos (*Álvarez-Rivera, et al., 2018*).

Cuando los microorganismos logran penetrar en un cosmético con una conservación insuficiente, pueden multiplicarse en gran cantidad y deteriorar sus propiedades (*Montoya, et al., 2008*), manifestándose de forma muy variable:

- Campos de moho sobre el producto.

- Separación de fases en las emulsiones.
- Pérdida de viscosidad.
- Cambios visuales.
- Cambios en el aroma del producto.
- Enranciamiento de las grasas.
- Aparición de tinciones, etc.

Cuando la presencia de microorganismos en los productos cosméticos da lugar a cambios de color, textura u olor, generan rechazo en el consumidor. Sin embargo, cuando la contaminación no modifica el aspecto físico del cosmético, representa un gran riesgo para el consumidor y su salud, ya que el uso de estos cosméticos contaminados puede producir irritaciones o infecciones, especialmente si se aplican sobre piel dañada. En este contexto, los conservantes se incorporan a los productos cosméticos para evitar su degradación y poder prolongar su vida comercial, así como para proteger al consumidor de la posibilidad de infección frente a microorganismos patógenos (*ICCR Working Group on Cosmetic Product Preservation, 2014*).

Existe una amplia gama de conservantes con diferentes capacidades para inhibir o controlar el crecimiento de los distintos tipos de microorganismos. Por ello, para su selección se debe tener en cuenta este aspecto, pero también cómo se comportará el conservante seleccionado en las diferentes formulaciones cosméticas a las que se incorpore.

El Reglamento Europeo sobre Productos Cosméticos (Reglamento UE), en vigor desde julio de 2013, impone normas más claras y detalladas de las que aportaban versiones anteriores, en relación a la seguridad del uso de los conservantes, detallando las sustancias autorizadas y las de uso restringido.

El organismo que evalúa la información existente sobre la seguridad de los ingredientes cosméticos es el “*Scientific Committee on Consumer Safety*” (SCCS) de la CEE. El SCCS publicó en octubre de 2018 (SCCS, 2018) la última revisión de las guías generales para la realización de ensayos de evaluación de seguridad de los cosméticos y dentro del apartado de “*Estudios de toxicidad relevantes sobre cosméticos*” incluye una parte específicamente dedicada a la absorción percutánea/dermal. Los datos de estimación de la absorción percutánea/dermal obtenidos a partir de publicaciones científicas sirven de ayuda para la conclusión final sobre la seguridad del ingrediente. Puede observarse allí que el SCCS solicita continuamente opiniones (“*request for a scientific opinion*”) sobre ingredientes de cuya seguridad se han planteado dudas. Así pues, se puede considerar que es necesario estimar la absorción percutánea/dermal de los conservantes mediante la utilización de métodos *in vitro* e *in vivo* adecuados.

En la parte de la página web de la Comisión europea dedicada a los productos cosméticos se puede encontrar información general sobre los criterios básicos para el empleo de métodos *in vitro* e *in vivo* en el estudio de la absorción percutánea de los ingredientes cosméticos; no obstante, no hay normas específicas (SCCS, Index).

Los ingredientes prohibidos lo están precisamente por haber sido ya suficientemente estudiados. Por ello, en la actualidad, los ingredientes de mayor interés son los que están permitidos o restringidos sin que todavía existan estudios rigurosos sobre los procesos de absorción/excreción en el organismo humano. Además, la información científica disponible hasta el momento no permite conocer si las cantidades de los conservantes cosméticos de uso restringido que penetran a través de la piel tras la aplicación en ella de un producto cosmético son seguras. Por ello, tal como indican las declaraciones del "*Scientific Committee on Consumer Safety*" de la Comisión Europea, los estudios de absorción percutánea de los conservantes cosméticos, sobre todo de los autorizados como uso restringido, son en la actualidad de especial relevancia.

Por lo anteriormente expuesto y con el fin de aportar datos que aumenten el conocimiento y puedan mejorar las medidas de seguridad indicadas en el Reglamento Europeo, para el desarrollo de esta Tesis Doctoral se han seleccionado una serie de sustancias, autorizadas como conservantes de uso restringido en preparaciones cosméticas, para las que no se dispone de datos concluyentes sobre el grado de penetración a través de la piel. Se ha seleccionado el bronidox, el formaldehído y alguno de sus donantes (la DMDM hidantoína y el bronopol). Se trata de conservantes cuya utilización en los productos cosméticos recientemente se ha incrementado, ya que se han planteado como sustitutos de otras sustancias habitualmente utilizadas hasta el momento. Cabe destacar que recientemente en la UE se ha prohibido el uso de alguno parabenos y se ha

incrementado el nivel de restricción de otros, debido a los riesgos que puede ocasionar su uso.

Dado que no existen estudios relacionados con la evaluación de la permeabilidad cutánea de las sustancias seleccionadas (el bronidox, el formaldehído y sus donantes, la DMDM hidantoína y el bronopol), compuestos utilizados como conservantes en los productos cosméticos, en este trabajo de Tesis Doctoral se plantean los siguientes objetivos.

OBJETIVO PRINCIPAL

Evaluar la magnitud de la absorción transdérmica de bronidox, bronopol y formaldehído (directamente o desde sus donantes DMDM hidantoína y bronopol), sustancias utilizadas como conservantes en formas de administración tópica, recogidas en la normativa vigente como sustancias de uso restringido y caracterizar la influencia de la forma de administración cosmética utilizada sobre la absorción de los compuestos indicados.

Para ello, se han desarrollado estudios experimentales encaminados a conocer los objetivos específicos que se detallan a continuación.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desarrollar y validar un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución para la determinación cuantitativa de bronidox.

2. Cuantificar *in vitro* el grado de absorción percutánea de los conservantes bronidox, formaldehído y bronopol cuando se aplican sobre la piel diferentes formas tópicas que los contienen.

3. Cuantificar *in vitro* el grado de penetración cutánea de formaldehído generado a partir de los conservantes bronopol y DMDM hidantoína cuando se aplican sobre la piel diferentes formulaciones de uso tópico que contienen estos últimos conservantes.

CAPITULO 2

2 ANTECEDENTES

2.1 PRODUCTOS COSMÉTICOS

2.1.1 Orígenes de la cosmética

La apariencia es un factor muy importante en las relaciones sociales. Por ello no es de extrañar que el uso de maquillaje y de sustancias para el cuidado de la piel se remonte a las civilizaciones más antiguas. En la prehistoria, las mujeres ya aplicaban sobre su rostro colores rojos, y aunque lo hacían como símbolo de fertilidad, esto puede ser considerado como los orígenes de la cosmética (*Allevato, 2006; Sánchez et al., 2007*).

En el Antiguo Egipto, empiezan a aparecer productos usados para la higiene y la belleza. Entre ellos se puede destacar al aceite de oliva, que ha sido utilizado, tanto por mujeres como por hombres, con el objetivo de hidratar, embellecer o para evitar la aparición de arrugas en la piel. También era utilizado para abrillantar y perfumar el cabello (*Barusi et al., 1998; Carrillo, 2009; González, 1996*).

En la edad media disminuyen estas prácticas de embellecimiento y de higiene, ya que la iglesia consideraba que era pecaminoso incentivar la belleza femenina. Pese a ello, las mujeres de la nobleza utilizaban cosméticos urticantes y depilatorios astringentes, tales como cal viva y arsénico.

Con el Renacimiento se regresa a la belleza. Aparecen cosméticos a base de azufre que provocan envenenamientos mortales. Surge el primer intento de eliminar arrugas con un “esmaltado de la cara” a base de plomo

y arsénico. Se utilizan diferentes perfumes y tintes de pelo con azafrán y sulfuros. También aparece el dentífrico (*López et al., 2007*).

Es en el siglo XIX cuando la producción de cosméticos comienza a adquirir rasgos de una industria moderna. Estos hechos acontecieron en primer lugar en grandes ciudades europeas como París o Londres, pero es a finales del siglo cuando empiezan a surgir en España (*Espinosa et al., 2013*).

En 1988 la legislación española en cosméticos incorpora distintas directrices europeas y trata de desarrollar aspectos que garanticen la seguridad y la salud de los consumidores, la composición de los cosméticos y la información que debe estar a disposición pública (Real Decreto 1599/1997 de BOE, 1997).

A pesar de ello, no es hasta el Real Decreto 1599/1997 (BOE num. 261, 31 de octubre) sobre productos cosméticos cuando se acepta la definición de producto cosmético: “Toda sustancia o preparado destinado a ser puesto en contacto con las diversas partes superficiales del cuerpo humano (epidermis, sistema piloso y capilar, uñas, labios y órganos genitales externos) o con los dientes y las mucosas bucales, con el fin exclusivo o principal de limpiarlos, perfumarlos, modificar su aspecto, y/o corregir los olores corporales, y/o protegerlos o mantenerlos en buen estado” (BOE, 1997). Dentro de este amplio conjunto de productos, los destinados a su aplicación sobre la piel se denominan dermocosméticos.

Son varios los factores que han generado un cambio en las características y en la funcionalidad de los productos cosméticos. Entre

ellos, el aumento de la esperanza de vida a lo largo del último siglo (*García, 2015*) relacionado, a su vez, con una gran mejora en aspectos como la higiene, la cura y prevención de enfermedades y con muchos avances en el campo de la medicina y la farmacia (*González, 2014*). Gracias a estos últimos, se han podido formular nuevos productos con efectos humectantes, suavizantes o hidratantes de la piel (*Pareja, 2003*). Todo esto ha llevado a un aumento de la demanda de productos cosméticos por parte de la sociedad (en 2014 se consumieron solo en España 6435 millones de euros en este tipo de productos) y como consecuencia, las garantías sobre el producto terminado han aumentado sus niveles de exigencia (*González et al., 2017*).

La Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) es la encargada de aplicar las garantías sanitarias para los productos cosméticos recogidas por el Real Decreto 85/2018 (BOE, num. 51, 27 de febrero). La comunicación al Portal Europeo de Notificación de Productos Cosméticos, las buenas prácticas de fabricación, la calidad de los ingredientes utilizados y composición, la evaluación de la seguridad, el etiquetado y publicidad, la gestión de efectos no deseados y la obligación de informar sobre los riesgos para la salud humana (AEMPS 2016, BOE 2018), son parte de estas garantías.

2.1.2 Tipos de formulaciones cosméticas

Los cosméticos son artículos que al ser aplicados sobre el cuerpo humano presentan la función de limpiar, embellecer o alterar la apariencia, pero sin afectar a la estructura o a la función del organismo. Dentro de esta

definición se encuentran todos los productos de uso diario desde champús, dentífricos, jabones, perfumes, esmalte de uñas, desodorantes, cremas de afeitar, cremas depilatorias, maquillaje, etc. Ninguno de estos productos ejerce actividad terapéutica y deben de ser utilizados solamente sobre pieles sanas.

Los cosméticos pueden clasificarse según su funcionalidad en higiénicos, decorativos, protectores o correctivos (Tabla 2.1).

	Función	Ejemplo
Higiénicos	Eliminar de la superficie de la piel impurezas por arrastre y/o disolución.	<i>Jabones, detergentes, desodorantes, dentífricos, etc.</i>
Decorativos	Disimular imperfecciones o exaltar la belleza mediante color y opacidad.	<i>Esmalte de uñas, tintes para el pelo, maquillaje, etc.</i>
Protectores	Mantener los caracteres cutáneos.	<i>Solares, lubricantes, etc.</i>
Correctivos	Cosméticos capaces de realizar correcciones cosméticas.	<i>Depigmentantes, depilatorios, estimulantes capilares, etc.</i>

Tabla 2.1. Clasificación de los productos cosméticos según su funcionalidad.

Es importante tener en cuenta que dependiendo del vehículo empleado para la administración de un activo se pueden obtener comportamientos diferentes en nuestro organismo, además de poder

mejorar la solubilidad de algún activo, reducir interacciones, proporcionar productos con aspectos más atractivos, etc.

Las distintas formas en las que se pueden encontrar los productos cosméticos se clasifican en tres grupos:

- 1 Formas sólidas: en las que la combinación del activo y excipientes se presenta en forma sólida, como es el caso de polvos y barras.
- 2 Formas semi-sólidas: se trata de preparados que habitualmente tienen un uso tópico y que se reconocen en función de su hidrosolubilidad. En este grupo destacan cremas y pomadas.
- 3 Formas líquidas: entre las que se encuentran las soluciones acuosas, oleosas, gaseosas y las espumas.

2.1.3 La Regulación Cosmética de la Unión Europea

Durante 37 años, y hasta julio de 2013, la fabricación y comercialización de cosméticos en la UE estuvo regulada por la Directiva de la UE (Directiva 76/768 / CEE del Consejo de la UE sobre la aproximación de las leyes de los Estados miembros relativas a los productos cosméticos, adoptados el 27 de julio de 1976 y publicados en el Diario Oficial de la Comunidad Europea L 262 el 27 de septiembre de 1976).

El 11 de julio de 2013 entró en vigor el nuevo Reglamento de la UE y representa la evolución lógica hacia una armonización integral en todos los Estados miembros de la UE. Los principios fundamentales de la legislación cosmética de la UE permanecen prácticamente sin cambios. Los principales cambios introducidos por el Reglamento de la UE están

relacionados con el establecimiento de la seguridad de los productos cosméticos: nuevas normas sobre nanomateriales y sustancias carcinogénicas, mutagénicas o tóxicas para la reproducción, notificación de productos en toda la UE antes de su comercialización (Portal de notificación de productos cosméticos, CPNP), mejora del control del cumplimiento del Reglamento por parte de las autoridades, obligaciones de la persona responsable y del distribuidor, el papel de las normas y criterios para las reclamaciones.

La legislación sobre productos cosméticos en los principales mercados del mundo exige la garantía de tres características muy importantes, seguridad, eficacia y calidad de dichos productos. Los fabricantes deben tener suficientes datos disponibles para garantizar la seguridad de los productos cosméticos en las condiciones normales de uso. Los datos pueden obtenerse específicamente sobre los productos terminados o deducirse de las propiedades de sus ingredientes. Además, se pueden obtener datos a través de diferentes estudios (toxicología, sensibilidad, reacciones alérgicas, etc.). A veces, se puede solicitar la vigilancia de los cosméticos en uso para detectar posibles efectos secundarios. Asimismo, los fabricantes deben disponer de suficientes datos para demostrar la eficacia cosmética (cumpliendo con lo que se indica en la etiqueta). Estos se pueden obtener a través de diferentes estudios (mediciones en sujetos después de usar el producto: hidratación, aspereza, firmeza, elasticidad de la piel, otras mediciones como la determinación del factor de protección solar de un producto, etc.) como se

puede ver en las guías publicadas por Cosmetic Europe (Cosmetics Europe, 2008).

Tanto la seguridad como la eficacia deben considerarse en las siguientes condiciones:

- el producto final debe estar de acuerdo con la composición diseñada por el fabricante y estar en perfecto estado;
- el cosmético debe ser aplicado por el usuario en las condiciones normales dadas.

Una característica muy importante de los productos cosméticos es su calidad y esto requiere un control exhaustivo.

A veces no es fácil diferenciar entre problemas de calidad y seguridad. Ambos podrían causar efectos adversos en los usuarios; sin embargo, el origen es diferente. La experiencia muestra que los problemas de calidad afectan a lotes específicos, que deben retirarse del mercado, mientras que si el problema es de seguridad, afecta a todos los lotes. Esto se debe a que en el último caso, el uso del producto ha demostrado tener efectos toxicológicos en los usuarios, por lo tanto, es un fallo de diseño del producto en cuestión, que debe retirarse por completo del mercado.

El control de calidad adecuado del proceso de fabricación o del producto final evitaría los problemas de calidad antes mencionados. Algunos países han establecido prácticas específicas para la fabricación de productos cosméticos, generalmente llamadas 'buenas prácticas de fabricación', como las propuestas por la Organización Internacional de

Normalización (ISO 22716: 2007) para evitar posibles problemas o errores en cada paso del proceso de fabricación. Siguiendo estas reglas, se obtendrá un producto final con la calidad esperada. El producto final debe tener una composición cualitativa y cuantitativa constante y específica. Uno de los principales aspectos a considerar en el control de calidad de los productos cosméticos se refiere a las sustancias que contienen, es decir, ingredientes cosméticos.

Como el uso de productos cosméticos está en aumento en todo el mundo, el número de productos cosméticos disponibles en el mercado con propiedades nuevas o mejoradas es cada vez mayor, lo que implica en muchas ocasiones el uso de nuevas sustancias químicas. Para evitar las barreras idiomáticas, que pueden originar problemas de libre comercio y pueden confundir a los consumidores, es necesario armonizar la nomenclatura de todas las sustancias empleadas en cosméticos. La antigua Asociación de Cosméticos, Artículos de Baño y Fragancias (CTFA), actualmente el Consejo de Productos de Cuidado Personal, fue pionero en tratar de armonizar la nomenclatura cosmética siguiendo las pautas de la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA). En 1973, el CTFA publicó la primera edición del Diccionario de ingredientes cosméticos CTFA (*Estrin, 1973*) y, en 1993 se cambió a Nomenclatura internacional de ingredientes cosméticos (INCI), que es como se conoce actualmente (*Gottschalck y McEwen, 2006*).

Sin embargo, se debe destacar, que la inclusión de cualquier producto químico en este diccionario significa solo que este producto

químico se vende o se vendió para su uso en productos cosméticos y no implica que la sustancia sea segura para su uso como ingrediente cosmético, ni indica que su uso sea cosmético. Por otro lado, la ausencia de una sustancia química de esta lista no implica que esta sustancia no se pueda usar en productos cosméticos.

El Reglamento (CE) 1223/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 30 de noviembre de 2009, sobre productos cosméticos, estableció que la Comisión Europea debe adaptar los anexos del Reglamento (listas de sustancias prohibidas, sustancias restringidas, colorantes, sustancias conservantes y filtros UV) para el progreso técnico y científico. Así en este Reglamento se distribuye el contenido de los anexos como se indica a continuación.

- El Anexo II contiene una lista negativa de sustancias (o familias de sustancias) que están prohibidas para su uso en la composición de productos cosméticos.
- El Anexo III proporciona ingredientes que los productos cosméticos solo pueden contener sujetos a las restricciones y condiciones establecidas en el mismo.
- Los anexos IV, V y VI son listas positivas de agentes colorantes, conservantes y filtros UV, respectivamente, permitidos para su uso en productos cosméticos dentro de los límites y bajo las condiciones de los mismos.

Estas listas no están cerradas y se actualizan permanentemente de acuerdo con los datos proporcionados por el Comité Científico de Seguridad del Consumidor (SCCS) (anteriormente conocido como el Comité Científico de Productos Cosméticos y No Alimenticios destinados a los Consumidores).

2.1.4 Evaluación de la seguridad del producto cosmético

Toda formulación cosmética o dermofarmacéutica tiene como objetivo lograr que la cantidad de principio activo depositado sobre la piel sea eficaz, pero ha de garantizar que no exista riesgo para la salud una vez aplicado siguiendo sus recomendaciones de uso (Directiva 76/768/CEE sobre productos cosméticos) (DIRECTIVE COUNCIL, 1999).

El Artículo 7 bis de la Directiva 93/35/CEE del Consejo de 14 de junio de 1993 expone que: “el fabricante tendrá en cuenta el perfil toxicológico general de los ingredientes, su estructura química y su nivel de exposición”.

A partir de la Regulación Europea 1223/2009 sobre productos cosméticos (Reglamento Europeo, 2009), ha crecido el interés de disponer de nuevos métodos para asegurar la seguridad de los productos cosméticos evitando la experimentación con animales. Tanto es así, que cuando uno de estos métodos alternativos es oficialmente aceptado y validado por la UE, pasa a ser de uso obligatorio quedando prohibido el uso de animales (*Salvador et al., 2011*).

El ser humano se expone a los activos cosméticos a través de la piel principalmente. Los **niveles de exposición seguros (NES)** para los activos cosméticos se determinan utilizando la siguiente ecuación (SCCS 2018):

$$NES = \frac{NOAEL}{FS} \quad \text{Ec. 2.1}$$

En la que **NOAEL** (“Non observed adverse effect level”) es la dosis más alta de activo que, tras una prolongada exposición en animales de experimentación, no produce un aumento significativo en la aparición de ningún efecto adverso y **FS** es el factor de seguridad que se usa para extrapolar resultados obtenidos en un grupo de animales de laboratorio a un usuario medio. El factor de seguridad usado con mayor frecuencia suele ser de 100 (un factor 10 por una extrapolación interespecies y un segundo factor 10 por la variabilidad intraespecie) (Figura 2.1).

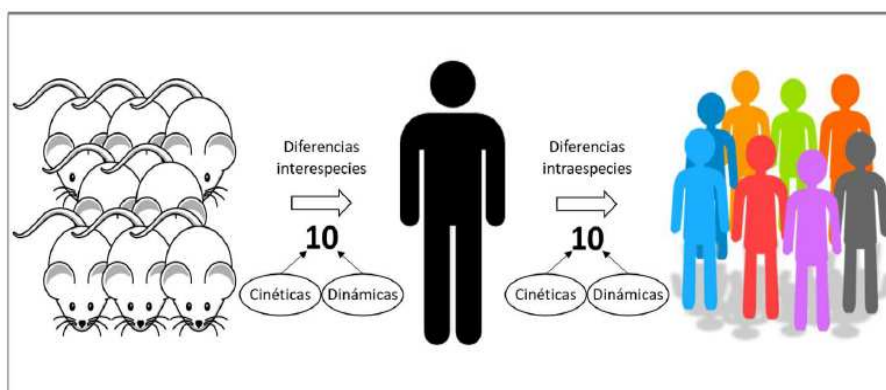


Figura 2.1. Representación esquematizada de la extrapolación de animales a humanos. Adaptada de la referencia (Renwick, 1998).

Una vez que se ha podido determinar el NES, es posible evaluar la absorción dérmica de la sustancia ensayada, y así poder determinar si es una fórmula segura, en el caso de obtener niveles iguales o inferiores a los niveles de exposición seguros o si por el contrario se trata de una formulación no segura, en el caso de superar estos niveles. Para ello se puede usar cualquiera de las ecuaciones siguientes:

$$SED = \frac{PA_a \cdot 10^{-3} \cdot SSA \cdot F}{P} = A \cdot C \cdot 10^{-2} \cdot PA_p 10^{-2} \quad \text{Ec.2.2}$$

En la que **SED** es la dosis de sustancia que alcanza la circulación sistémica (mg/Kg peso/día), **PA** corresponde a la absorción percutánea (PA_p se expresa como % mientras que PA_a se expresa en unidades µg/cm²), **SSA** hace referencia a la superficie del organismo que se encuentra en contacto con el activo cosmético (cm²), **F** es la frecuencia con la que se aplica el cosmético (día⁻¹), **P** es el peso corporal del consumidor (Kg), **A** hace referencia a la exposición diaria estimada de un producto cosmético (mg/Kg peso/día) y **C** es la concentración de activo presente en el producto final (%). El factor 10⁻³ tiene como finalidad ajustar las unidades del SED (mg/Kg peso/día) con las del PA_a (µg/cm²). Los valores de SSA, F y A para los diferentes tipos de formas cosméticas están recogidos en la sección 4-2 del documento redactado por el Comité Científico Europeo de Seguridad de los Consumidores (SCCS) (SCCS 2018).

El único parámetro que no se encuentra recogido en la sección mencionada es la absorción percutánea (PA) ya que este parámetro depende de un gran número de factores, que pueden ser divididos en tres grandes grupos: biológicos, relacionados con el vehículo y relacionados con el componente activo.

2.1.5 Conservantes cosméticos

La gran mayoría de las formulaciones cosméticas, debido a su composición orgánica y a su alto contenido en agua, son productos fácilmente degradados por los microorganismos. La presencia de contaminación microbiana en cosméticos representa un riesgo considerable para la salud del consumidor, ya que estos productos contaminados pueden provocar irritaciones o infecciones, especialmente cuando se aplican sobre la piel dañada, los ojos o en la piel de los bebés (*Lundov et al., 2009*). Para prevenir el crecimiento microbiano, se agregan a la formulación distintas sustancias conservantes con el objetivo de inhibir el desarrollo de microorganismos (función antimicrobiana). Sin embargo, también se pueden agregar para prevenir los daños y degradaciones provocados por la exposición al oxígeno (función antioxidante) o a la luz ultravioleta (función fotoprotectora).

Los conservantes, al tratarse de productos biológicamente activos, pueden actuar como agentes tóxicos, irritantes o sensibilizantes y por lo tanto, la seguridad de estos productos químicos aparece continuamente cuestionada. Las evidencias científicas sobre los posibles efectos nocivos que podrían tener algunos conservantes sobre la salud de los

consumidores ha llevado a restricciones cada vez mayores. Por ejemplo, la familia más extendida de sustancias conservantes, los parabenos, ha sido revisada por el Reglamento de la UE, y el uso de algunos de ellos (por ejemplo, isopropilo, fenilo, bencilo, isobutilo y pentilparabeno) ha sido prohibido para su utilización en productos cosméticos (Reglamento Europeo, 2009).

Hoy en día, existe una percepción pública bastante negativa sobre los conservantes tradicionales, incluso sobre los incluidos en las listas de sustancias admitidas. Cada vez más fabricantes deciden no incluir conservantes tradicionales, que se encuentran en el centro de atención, alegando que sus productos están "libres" de estos químicos potencialmente tóxicos. De hecho, ya se ha observado la inclusión del término "sin parabenos" o "sin conservantes" en la etiqueta de varios productos cosméticos, ya que los consumidores lo consideran una característica positiva. Por lo tanto, el uso de conservantes no tradicionales, así como fragancias y aceites naturales, que a menudo actúan como los llamados conservantes "naturales", está creciendo como alternativa de preservación en productos cosméticos. Del mismo modo, otros ingredientes cosméticos comunes utilizados tradicionalmente con otras funciones y que por lo tanto, no figuran en las listas de conservantes, han mostrado una importante actividad antimicrobiana y se están utilizando con fines de conservación en cosméticos "sin productos conservantes".

2.1.5.1 Tipos de sistemas conservantes

Aunque existen extensas listas de posibles sustancias conservantes, solo un número limitado de ellos ofrece eficacia suficiente (*Geis, 2006*). A continuación, se describen los ingredientes que se utilizan como conservantes en productos cosméticos con mayor frecuencia.

Conservantes antimicrobianos

La amplia variedad de ingredientes de tipo antimicrobiano se puede organizar en diferentes categorías químicas, de acuerdo con la estructura molecular y los grupos funcionales más característicos.

- **Conservantes de ácidos orgánicos y sus sales**

La actividad de estas sustancias es dependiente del pH, ya que muestran actividad solo cuando se encuentran en forma de ácido. Aunque generalmente se agregan a las formulaciones en forma de sales, estas no muestran actividad antimicrobiana hasta que baja el pH y se libera la forma de ácido (*Steinberg, 2012*).

Algunos ácidos orgánicos utilizados como conservantes son el ácido benzoico y su sal benzoato de sodio, el ácido deshidroacético y deshidroacetato de sodio, el ácido fórmico, el ácido propiónico y sus sales, el ácido sórbico y sorbato de potasio, el ácido salicílico y el ácido undecilénico.

- **Alcoholes y derivados**

Conservantes con grupos hidroxilo (OH). Este grupo de conservantes incluye compuestos como el alcohol bencílico, el isopropilmetilfenol, el fenoxietanol, el fenoxiisopropanol y el o-fenilfenol y su sal sódica. Particularmente relevantes son los ésteres alquílicos del ácido 4-hidroxibenzoico (4-HB, también conocidos como parabenos). Los más comunes en este grupo son los ésteres de metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo y bencilo, aunque las formas iso y bencilo están actualmente prohibidas por el Reglamento de cosméticos de la UE. Estos compuestos exhiben propiedades antifúngicas y actividad contra bacterias gram negativas. La actividad antimicrobiana de estos productos químicos aumenta a medida que aumenta el número de carbonos de la cadena alquílica, mientras que, por el contrario, su solubilidad en agua disminuye en paralelo (*Polati et al., 2007*). Por lo tanto, la forma en que se incorporan a la formulación es particularmente crítica, ya que son activos solo en la fase acuosa y dependen del pH del medio (los valores altos de pH conducen a la disociación del parabeno). Por esta razón, los parabenos a veces se incorporan en forma de sal de sodio o potasio.

- **Formaldehído, metilenglicol y liberadores de formaldehído**

El formaldehído es un gas anhidro que puede reaccionar fácilmente con el agua produciendo metilenglicol. La solución comercial de formaldehído en agua (es decir, metilenglicol) se conoce comúnmente como formalina (*Steinberg, 2012*). Por lo tanto, el formaldehído o su forma de metilenglicol se agrega con frecuencia a productos cosméticos a base de

agua como champú, acondicionador, gel de ducha, lavado de manos líquido y baño de burbujas. Muestran actividad contra las bacterias y también son activos contra los hongos. Este grupo también incluye muchos conservantes que contienen grupos n-metilo en su estructura química, que en los solventes polares pueden actuar como donantes o liberadores de formaldehído, entre ellos se encuentran imidazolidinil urea, diazolidinil urea, hidroximetilglicinato de sodio, bencilhemiformal, 1,3-Bis(hidroximetil)-5,5-dimetilimidazolidina-2,4-diona (DMDM hidantoína) y quaternium-15. De acuerdo con el Reglamento de la UE, todos los productos terminados que contienen formaldehído o sustancias que liberan formaldehído deben estar etiquetados con la advertencia "contiene formaldehído" cuando la concentración de formaldehído en el producto acabado excede el 0.05%

- **Isotiazolinonas**

Los biocidas de tipo isotiazolinona son un grupo de conservantes efectivos utilizados en una amplia variedad de productos y aplicaciones industriales o domésticas de base acuosa (*Nakashima et al., 2000; Rafoth et al., 2007; Reinhard et al., 2001*). Estos compuestos son derivados heterocíclicos de 2H-isotiazolin-3-ona con un resto de azufre activo capaz de oxidar los residuos que contienen tiol, ofreciendo así una potente actividad de conservación contra un amplio espectro de hongos y bacterias (*Collier et al., 1990*).

- **Conservantes halogenados**

Los conservantes halogenados exhiben una actividad más fuerte, particularmente contra hongos. Este grupo incluye compuestos tales como 5-bromo-5-nitro-1,3 dioxano (bronidox) y 2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol (bronopol). Estos pueden descomponerse, liberando agentes nitrosantes que pueden reaccionar con aminas alifáticas como dietanolamina (DEA), trietanolamina (TEA) y monoetanolamina (MEA), que comúnmente se agregan a los champús y otros productos de higiene personal (*Polati et al., 2007*). En esta categoría también se encuentran otros conservantes halogenados como 2-cloro-acetamida, clorobutanol, cloroxilenol, etc. A pesar de su potente actividad antimicrobiana, muchos de estos compuestos son poco solubles en agua, lo que dificulta su incorporación en la matriz cosmética.

- **Sales de amonio cuaternario**

Los compuestos de amonio cuaternario, como el cloruro de benzalconio, el cloruro de bencetonio, etc., son utilizados frecuentemente a altas concentraciones en productos para el lavado y acondicionamiento del cabello debido a sus propiedades antiestáticas y suavizantes. Estas sustancias contienen nitrógeno cargado positivamente, exhibiendo una fuerte actividad antimicrobiana a pH alto.

- **Otros conservantes**

Otros compuestos también utilizados como conservantes cosméticos son hexamidina, dibromohexamidina, dibromopropamidina, clorohexidina y cloruro de cetilpiridinio, entre otros. Estos ingredientes se usan particularmente en productos de enjuague bucal.

Antioxidantes y otros sistemas de conservación

Los componentes cosméticos, como las fragancias, las grasas o los aceites naturales, están sujetos a la auto-oxidación por exposición al aire, esto produce olores indeseables y otras inestabilidades. La presencia de grupos aldehído o insaturados intensifica esta reacción, que comienza con un ataque de radicales libres de oxígeno y se propaga con una reacción en cadena (*Steinberg, 2012*). Para evitar la degradación de los ingredientes cosméticos por oxidación, se agregan a la materia prima o la formulación antioxidantes como el ácido cítrico, el ácido gálico o sus ésteres. También vitaminas como el tocoferol (vitamina E) o el ácido ascórbico (vitamina C). Sin embargo, los conservantes antioxidantes más utilizados son el butilhidroxitolueno (BHT) y el butilhidroxianisol (BHA). El uso de mezclas de estas sustancias es muy común, ya que esta sinergia aumenta el poder antioxidante (*Polati et al., 2007*). Algunas compañías están buscando formulaciones alternativas de autoconservación que reduzcan la necesidad de utilizar conservantes. Esta tecnología llamada "obstáculo" se ha utilizado en la industria alimentaria desde la década de 1970 (*Leistner,*

2000), y describe una formulación inteligente que utiliza diferentes factores de conservación, incluidas las buenas prácticas de fabricación, un envasado apropiado, la elección cuidadosa de la forma de emulsión, baja concentración de agua y diferentes valores de pH (Kabara, 1997). Algunas de estas estrategias alternativas implican el uso de aditivos multifuncionales que puede lograr la función antimicrobiana de las formulaciones cosméticas en lugar de utilizar conservantes tradicionales.

2.1.5.2 Seguridad de los conservantes

A pesar de los beneficios que los conservantes aportan a los productos cosméticos, se ha observado que el uso de cosméticos con algunos de estos compuestos causa diferentes efectos indeseables en la salud de los consumidores, estos efectos pueden surgir inmediatamente después de aplicar el producto o incluso años después, a través del uso continuo. Aproximadamente el 6% de la población es alérgica a algún conservante o fragancia. Además, estas sustancias también pueden provocar otros efectos negativos, desde irritación de la piel hasta una fuerte actividad estrogénica. Algunos conservantes pueden incluso exhibir efectos neurotóxicos o genotóxicos (Harvey, 2003; He et al., 2006). Se sospecha que los parabenos son compuestos disruptores endocrinos con propiedades de tipo estrogénico y anti-androgénico (Prusakiewicz et al., 2007; Terasaka et al., 2006). Además, los estudios sugieren una posible relación entre la aplicación de productos que contienen parabenos y algunos tipos de alergias (Savage et al., 2012), o incluso el cáncer de mama (Darbre, 2006).

El BHA y el BHT también pueden causar efectos secundarios graves a largo plazo. Particularmente, el BHA puede actuar como un modulador y disruptor del sistema endocrino (*Hung et al., 2005*), con la capacidad de causar daño en los tejidos pulmonares e incluso deficiencias en el desarrollo del sistema reproductivo (*Jeong et al., 2005*). Con respecto a BHT, aunque el informe de evaluación de seguridad indica que este conservante no puede considerarse genotóxico, puede modificar la genotoxicidad de otros agentes (*Lanigan y Yamarik, 2002*). Se sabe que los conservantes bronidox y bronopol son agentes nitrosantes efectivos. Cada vez que estos conservantes se formulan conjuntamente con componentes que tienen estructuras de aminas secundarias se produce la formación de nitrosaminas cancerígenas (*Matyska et al., 2000*).

Algunas de las pruebas realizadas en animales han demostrado que el triclosán puede alterar la función tiroidea, disminuyendo los niveles de tiroxina en plasma. El triclosán también puede actuar como un disruptor hormonal sexual, presentando propiedades antiestrogénicas y antiandrogénicas (*Crofton et al., 2007; Witorsch y Thomas, 2010*). También se ha demostrado que reacciona con el cloro del agua del grifo, produciendo gas cloroformo (*Rule et al., 2005*). La mayor toxicidad de este compuesto se encuentra en sus procesos de descomposición o transformación, que lleva a subproductos como clorofenoles, dioxinas o compuestos policlorados (*Álvarez-Rivera et al., 2015; Lindström et al., 2002; Sánchez-Prado et al., 2006a, b*).

Los conservantes incluidos en el grupo de liberadores de formaldehído pueden causar irritación en los ojos, náuseas, dificultad para respirar o alergias, y en altas concentraciones pueden provocar dolores de cabeza y ataques de asma (*Hauksson et al., 2016*). Algunos estudios advierten de la sospecha de que el formaldehído puede provocar cáncer (*Cole et al., 2010*). Los productos que contienen formaldehído en concentraciones superiores al 0.2% se consideran inseguros (*Bergfeld et al., 2005*).

2.1.5.3 Aspectos reguladores de los conservantes cosméticos

El uso de conservantes está sujeto a una estricta supervisión reguladora en diferentes regiones (*Scott et al., 2006*). En el marco de la Comunidad Europea, una serie de conservantes enumerados en el Anexo V del Reglamento de la UE de Productos Cosméticos (Reglamento Europeo, 2009) constituyen el grupo de sustancias permitidas para la conservación cosmética del deterioro microbiano. La Tabla 2.2 recoge la información de los 4 conservantes que constituyen el estudio de esta tesis, incluidos en esta lista autorizada.

Nº Referencia	Identificación de las sustancias	Condiciones		
	Nombre químico / DCI	Tipo de producto, partes del cuerpo	Concentración máxima en el producto preparado para el uso	Otras condiciones
5	Formaldehído y <i>p</i> -formaldehído	Productos bucales:	0,1 % (de formaldehído libre)	No utilizar en aerosoles
		Otros productos:	0,2 % (de formaldehído libre)	
20	5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxano	Productos que se aclaran	0,1 %	Se debe evitar la formación de nitrosaminas
21	2-Bromo-2-nitro-1,3 propanodiol / bronopol		0,1 %	Se debe evitar la formación de nitrosaminas
33	1,3-Bis(hidroxi metil)-5,5-dimetilimidazolidina-2,4-diona		0,6 %	

Tabla 2.2. Conservantes estudiados en esta Tesis Doctoral enumerados en el Anexo V del Reglamento de la UE de Productos Cosmético (CE 1223/2009).

2.2 ESTRUCTURA DE LA PIEL Y SUS ANEXOS

La piel es el órgano más grande de nuestro organismo y forma la superficie externa del mismo. Ocupa aproximadamente 1,6 m² (Ruxton et al., 2011) y su espesor varía entre los 0,5 mm (en los párpados) a los 4 mm (en el talón). Su peso aproximado es de 5 kg, constituyendo cerca del 10% del peso total (Hartmann, 1983). Actúa como barrera protectora, aislando al organismo del medio que lo rodea, protegiéndolo de la deshidratación (manteniendo la homeostasis de los fluidos) y de las agresiones externas, actuando además como sistema de comunicación con el exterior (Hendriks, 2005).

Las principales funciones de la piel son las que se enumeran a continuación (*Lippert, 2012*):

Favorece la inmunidad

Algunas células de la piel como son las Langerhans, fagocíticas y dendríticas, trabajan directamente con el sistema inmunitario, evitando así, que bacterias, virus y otros cuerpos extraños entren en el organismo afectando de manera negativa.

Función protectora

Esta función consiste en proteger el interior del organismo, protegiendo los tejidos internos, los órganos y los huesos, evitando así la exposición al medio exterior, ya sea a bacterias u otros microorganismos, a sustancias químicas, insectos, rayos UVA y también frente a traumas físicos.

Sensibilidad

La piel es altamente sensible, y esto permite sentir al instante los distintos cambios que se producen en el exterior tanto de presión como de temperatura. Esto es posible gracias a las terminaciones nerviosas presentes en el cuerpo, que reaccionan a las sensaciones recogidas por la piel alertando al cerebro, lo que permite una reacción rápida frente al calor, el frío, el dolor, el tacto...

Termorregulación corporal

Los mamíferos mantienen una temperatura corporal para garantizar su capacidad funcional y es la piel la que mantiene un contacto directo con el medio externo que presenta temperaturas diferentes a la del cuerpo. Por lo tanto, la piel es fundamental para la función de termorregulación. Los vasos sanguíneos de la dermis se dilatan para desprenderse de calor y se contraen para ahorrar energía térmica, la secreción de sudor también contribuye a la termorregulación. Por su parte, el tejido adiposo subcutáneo presenta también una acción termoaislante.

Función endocrina

La piel es capaz de sintetizar vitamina D, que con ayuda de los rayos del sol, se transforma de tal manera que el organismo puede utilizarla de forma efectiva.

Función excretora

El organismo acumula determinadas sustancias de desecho y toxinas que obviamente no necesita. Estos residuos pueden ser excretados a través de la piel, lo que ayuda a su eliminación. Es el caso del ácido úrico, amoníaco y la urea.

La piel propiamente dicha, consta de cuatro capas que se encuentran superpuestas y que poseen propiedades y funciones muy distintas (*Fore, 2006*). De exterior a interior se diferencian las siguientes capas (*Williams, 2003*):

- Capa superficial.
- Epidermis.
- Dermis o corión.
- Hipodermis o tejido subcutáneo.

Además, en la piel también se encuentran dos tipos de estructuras denominadas anexos: el sistema pilosebáceo y las glándulas sudoríparas. La capa superficial está en contacto con el medio externo y la hipodermis separa la piel de los tejidos subyacentes (*Pró E, 2014*).

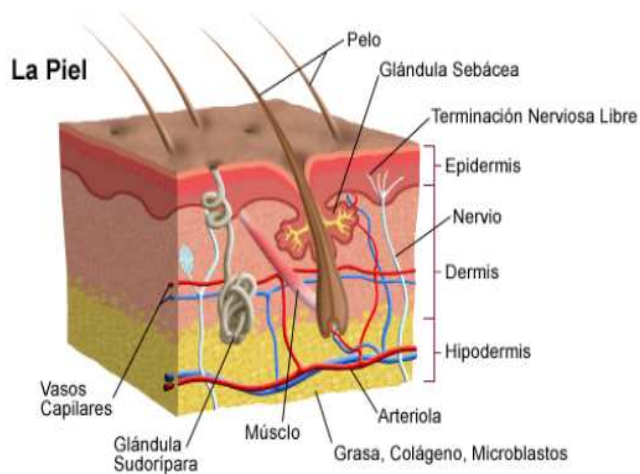


Figura 2.2. Esquema de la estructura de la piel.

Imagen reproducida de www.stanfordchildrens.org

2.2.1 Capa superficial

Es una cutícula irregular sin estructura aparente y con un espesor comprendido entre 0,4 y 10 μm . Es la capa más externa, recubre la superficie de la piel y está constituida por una mezcla de secreciones lipídicas (sebo) y acuosas (sudor) procedentes de las glándulas sebáceas y

sudoríparas. Engloba también bacterias, células descamadas, y algo de suciedad líquida y sólida procedente del exterior y es miscible con el agua. Posee un pH ácido de 5,2 aproximadamente (aunque con variaciones zonales), lo que le permite actuar como defensa eficaz frente a infecciones cutáneas, produciéndose un incremento del mismo cuando aparecen alteraciones o infecciones (*Pereira Arcidiácono, 2012*).

2.2.2 Epidermis

Es una capa epitelial estratificada y no vascularizada. Su grosor no suele superar los 0,2 mm. Está formada principalmente por queratinocitos (*Eckhart, et al., 2000*), melanocitos (o pigmentocitos) que dan el color a la piel (*Hendriks, 2001*), células de Merkel (*Maricich et al., 2009*) y las células de Langerhans (*Shklovskaya et al., 2011*), que proporcionan protección inmunológica. De la superficie se van desprendiendo continuamente células córneas debido al roce, que han de ir siendo sustituidas por células de la profundidad. Los queratinocitos sufren modificaciones químicas enriqueciéndose de queratina a medida que progresan hacia la superficie. Estas células nacen en la capa basal o germinativa, que es la capa que constituye la separación entre la dermis y la epidermis y se va prolongando hacia el exterior dando origen a la capa espinosa primero y posteriormente a la capa granulosa, que a su vez se enlaza con el estrato córneo a través de una zona de transición. Conforme las células van creciendo, cambian de células metabólicamente activas a células muertas, formando finalmente el estrato córneo (*Pró, 2014*).

Por todo ello, en función del grado de diferenciación celular se pueden distinguir cinco capas dentro de la epidermis, estas capas se representan en la Figura 2.3.

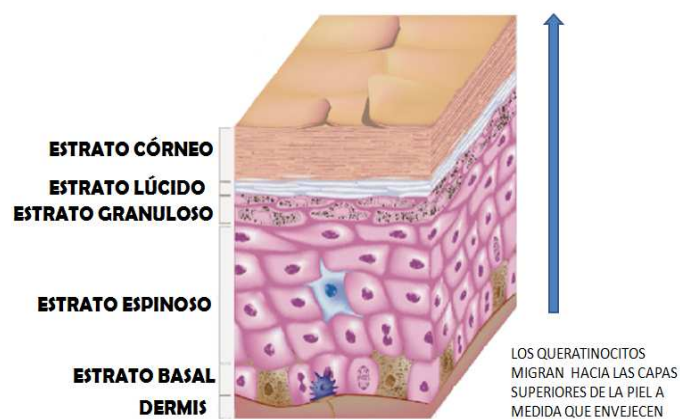


Figura 2.3. Esquema de la epidermis.

Imagen modificada de deconceptos.com

- **CAPA BASAL O GERMINATIVA (*Stratum basale*)** que se compone de una capa de células cúbicas en constante mitosis. Se encuentra en contacto directo con la lámina basal que es la frontera entre la dermis y la epidermis. Estas células basales, se encuentran enlazadas entre sí mediante desmosomas y con la lámina basal por hemidesmosomas. Las células que forman esta capa son indiferenciadas, es decir, carecen de marcadores bioquímicos característicos de las células más diferenciadas de las capas superiores y su proliferación está regulada por varios factores intrínsecos o endógenos como el factor de crecimiento epidérmico (FCE), enzimas como las proteinkininas (PKC) (Kondo, et al., 1990;

Stoica, et al., 2003) y por factores extrínsecos o exógenos como cambios de temperatura, radiaciones UV (*Bowman, et al., 1997; Berton, et al., 2001*), vitaminas como vitamina A y vitamina D (*Mommers, et al., 1999*) o medicamentos como la dexametasona (*Kondo, et al., 1990*).

Tras su proliferación las células del estrato basal ascienden para situarse en posición suprabasal, pierden también su capacidad de proliferación e inicia el complejo proceso de diferenciación que dará lugar finalmente a la queratina.

- CAPA DE LAS CÉLULAS ESPICULADAS (*Stratum spinosum*) que recibe este nombre por el aspecto espinoso de sus células, llamadas espinas. Este aspecto se lo confiere el gran número de estructuras proteicas intra y extracelulares denominadas desmosomas que sirven de unión con las células adyacentes (*Jones y Watt, 1993; Burge, 1994*). Se encuentra situada directamente sobre la capa basal.

- CAPA GRANULOSA (*Stratum granulosum*) formada por las células del estrato espinoso después de sufrir un proceso de diferenciación (*Wertz y Downing, 1989*). En las células granulosa existe una gran cantidad de estructuras ovoides bien delimitadas y de pequeño tamaño con un elevado contenido lipídico denominadas cuerpos lamelares. Estos cuerpos lamelares contienen además enzimas, proteínas estructurales y unas vesículas lipídicas aplanadas.

Las células epidérmicas a este nivel de su proceso de diferenciación se llenan también de unos agregados densos de contorno irregular llamados gránulos de queratohialina y que permiten identificar a las células que las contienen como células del estrato granuloso (*Marekov y Steinert, 1998*).

La célula granulosa se convierte en corneocito mediante un complejo proceso que supone una transformación tanto cuantitativa como cualitativa de los componentes lipídicos y proteicos (*Steinert y Marekov, 1997*).

- CAPA LÚCIDA O CLARA (*Stratum lucidum*) formada por células planas sin núcleo y forman la primera barrera que impide la penetración de sustancias provenientes del exterior que no sean bioquímicamente compatibles con la piel. Este estrato lúcido solo está presente en las palmas de las manos y en las plantas de los pies, donde el roce y la presión son muy grandes. Sus células contienen eleidina, que es una sustancia lúcida (transparente) formada por queratohialina que dará lugar a la formación de queratina. Esta queratina forma un entramado laxo de gran movilidad pero que a su vez impide la entrada de bacterias, la pérdida de agua corporal y la absorción de agua del exterior.

- CAPA CÓRNEA (*Stratum corneum*) constituye la barrera cutánea principal al paso de sustancias procedentes del exterior. Está formado por 10-15 capas de células queratinizadas llamadas

corneocitos y que a su vez forman un delgado y resistente estrato (10-20 μm , según la zona del cuerpo (Jacobi et al., 2005; Kalia, et al., 2001) que es el encargado de la protección frente a agentes externos (Elias, 2007).

La capa córnea, presenta una organización muy peculiar, una estructura biológica muy distinta a la de otras barreras biológicas. Esta organización (Figura 2.4) puede simplificarse con el modelo denominado “brick and mortar” (ladrillo y cemento) (Prausnitz, et al., 2012), donde se pueden distinguir dos zonas: la primera que es la representada por los ladrillos y que corresponde a los corneocitos y la segunda, que es la representada por el cemento y que corresponde a los lípidos intercelulares.

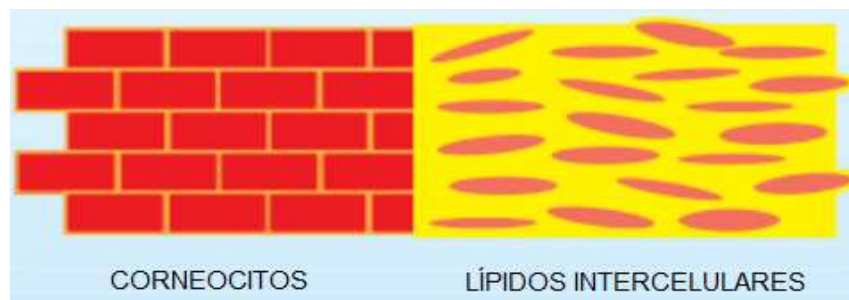


Figura 2.4 . Modelo “brick and mortar”. Imagen modificada de www.skin-care-foru.basf.com

2.2.3 Dermis

La dermis se encuentra inmediatamente por debajo de la epidermis. Su espesor oscila entre 3 y 5 mm y está compuesta de una matriz muy

densa de tejido conectivo formada por fibras de colágeno y elastina (*Iozzo, 2000; Koziel, et al., 2013*), macrófagos y mastocitos (*Girolomoni, et al., 2006*).

Es un tejido muy sensible e irrigado, es a nivel de los capilares de la dermis donde los fármacos pasan a la circulación sistémica. Para que esto ocurra, han tenido que atravesar primero el estrato córneo y la epidermis viva.

La dermis está formada por un parénquima de células conjuntivas entre las que se encuentran terminaciones nerviosas sensibles al frío, al calor y a la presión, terminaciones nerviosas que proporcionan el tacto, y vasos. Las fibras nerviosas pueden ser libres, como fibras sensitivas desnudas o estar cubiertas de tejido conjuntivo. Estas terminan en unos abultamientos denominados corpúsculos. Se diferencian los siguientes corpúsculos:

-Corpúsculos de Paccini:

Aparecen encapsulados. Están formados por una serie de capas en espiral de tejido conectivo aplanado que recuerdan por su forma a las cebollas. Son las encargadas de recoger las vibraciones y la presión, por lo que son muy abundantes en las manos y en los pies.

- Corpúsculo de Ruffini:

Tienen forma alargada y aparecen en la parte más profunda de la dermis. Su función consiste en captar las deformaciones de la piel y de los

tejidos subcutáneos. Captan también el calor. Son más abundantes en la mano por la cara superior.

-Corpúsculo de Meisner:

Tiene forma de huevo, se encuentran principalmente en la punta de los dedos. Responden a suaves tactos sobre la piel. Son capaces de detectar rápidamente la forma que tienen los objetos así como sus texturas.

-Corpúsculo de Krause:

Aparecen encapsulados en el nivel más profundo de la piel. Tienen una forma similar a los corpúsculos de Paccini, aunque son más pequeños y de forma algo más redondeada. Se cree que son capaces de detectar el frío. Pueden encontrarse en la boca, la nariz, los ojos, la lengua, los genitales, etc.

Los tipos de células más importantes que se pueden encontrar en la dermis son los macrófagos, los fibroblastos y los mastocitos, aunque en respuesta a lesiones y otros estímulos es posible encontrar células como linfocitos, células plasmáticas, etc.

Se diferencian dos capas principales: la capa papilar, que es la capa más externa y la capa reticular que se encuentra en contacto directo con la hipodermis. Las células de esta capa reticular sintetizan haces de colágeno que van aumentando progresivamente de tamaño hacia la hipodermis.

2.2.4 Hipodermis

La hipodermis o tejido subcutáneo, es la zona de separación entre los tejidos subyacentes y la dermis. Su constitución varía dependiendo de la zona del cuerpo pero es muy rica en células adiposas. Estas células constituyen una fuente de energía y a su vez, proporcionan protección frente al frío, además de aportar a la piel elasticidad y capacidad de movimiento (*Whittle, et al., 2004*).

Aunque en algunas zonas, las glándulas sebáceas aparecen como estructuras independientes, lo más habitual es que aparezcan asociadas al folículo piloso. Al conjunto formado por los folículos pilosos y las glándulas sebáceas, se le conoce como sistema pilosebáceo (Figura 2.5). Los folículos nacen en la dermis o en la hipodermis y atraviesan la epidermis desembocando en la superficie de la piel. La base de estos folículos (bulbo piloso o matriz), está formada por células conjuntivas muy bien irrigadas y de gran vitalidad, que se dividen rápidamente y que conforme crecen van desplazando a las ya existentes. Una parte de estas células desplazadas dará lugar a la cutícula que envuelve el pelo y otra parte dará lugar al pelo propiamente dicho. La queratinización no es tan rápida a este nivel como en el estrato córneo, el núcleo de la célula se va haciendo picnótico y denso de forma gradual hasta que aparece englobado por la queratina.

Las glándulas sebáceas conectan con el folículo piloso aproximadamente en su primer tercio de longitud. El alveolo sebáceo está formado por una masa de células epiteliales especiales y que están rodeadas de una membrana basal muy similar a la del pelo. Estas células van proliferando y desplazando a las ya existentes hacia arriba por el

interior del folículo, a su vez van acumulando lípidos en su interior, de forma que finalmente se rompen vertiendo la secreción por la abertura del folículo.

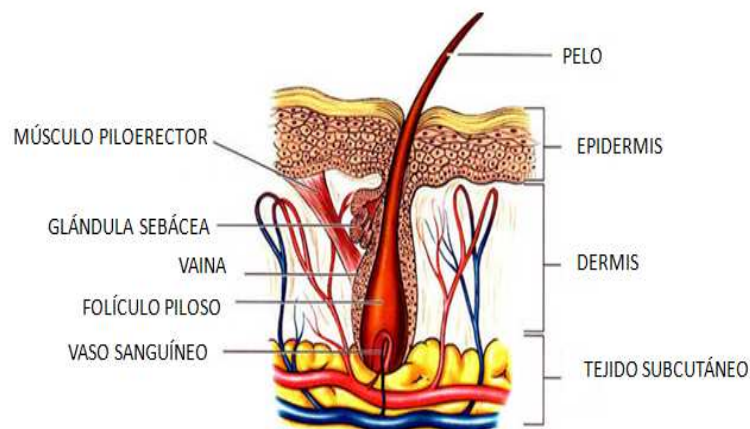


Figura 2.5. Esquema de folículo piloso, glándula sebácea y músculo piloerector. Imagen reproducida de <https://foro.recuperaelpelo.es>

En la hipodermis también se encuentran las glándulas sudoríparas, que vierten el sudor (secreción de naturaleza principalmente acuosa), cuya evaporación proporciona un papel termorregulador muy importante. Estas estructuras son independientes y llegan en forma de conducto espiral o rectilíneo hasta la superficie de la piel.

2.3 VÍAS DE PENETRACIÓN CUTÁNEA

La función barrera, está relacionada con los lípidos intercelulares del estrato córneo (Hadgraft et al., 1992; Kennedy et al., 1996). Un incremento en la pérdida transepidérmica de agua (T.E.W.L.) producida por una

alteración tanto química como física del estrato córneo, da lugar de forma prácticamente inmediata a una serie de fenómenos destinados a reparar estos daños, como una mayor producción de lípidos y su posterior extrusión al espacio intercelular y una respuesta inflamatoria (Nickoloff y Naidu, 1994; Proksch et al., 1993).

Cuando se aplica un fármaco sobre la piel, lo primero que debe suceder es que se disuelva sobre su superficie y en el caso de que se absorba, pasará a la red de capilares que irrigan la dermis. Existen dos vías para que un fármaco atraviese la piel (Figura 2.6): **vía transapendicular**, a través de los apéndices cutáneos y **vía transepidérmica**, a través de la epidermis.

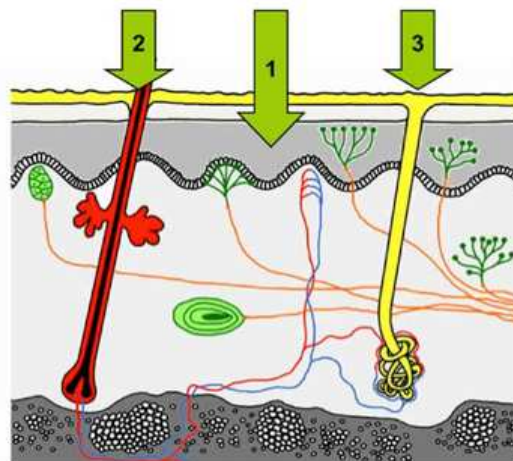


Figura 2.6. Principales vías de penetración a través de la piel: transepidérmica (1) y transapendicular, a través de los folículos pilosebáceos (2) y glándulas sudoríparas (3). Imagen reproducida de: <http://www.skin-care-forum.basf.com/>

La **vía transepidérmica** es sin duda la más importante ya que la gran mayoría de sustancias que atraviesan la piel lo hacen por esta vía. El paso de estas sustancias a través de la epidermis, a su vez, puede seguir dos vías (Elias, 1983; Wertz et al., 1989):

- La vía intercelular, que es la más habitual para la mayoría de sustancias. Se produce por difusión a través de los espacios intercelulares del estrato córneo, siguiendo un camino tortuoso a través de los lípidos de la matriz intercelular.
- La vía transcelular, donde las sustancias atraviesan los lípidos intercelulares, los corneocitos y las membranas lipídicas y se producen repartos repetidos entre las regiones lipófilas y las regiones hidrófilas. Es un proceso de gran dificultad, lo que provoca que sea una ruta considerada poco relevante en la mayoría de los casos.

La **vía transapendicula** no es el camino general de entrada de los fármacos debido a la escasez de estructuras si se compara con la gran cantidad de superficie útil que presenta el estrato córneo. El paso en esta vía se produce a través de los folículos pilosebáceos y las glándulas sudoríparas.

Las glándulas sudoríparas desembocan en la superficie de la piel a través de un poro que a su vez continúa por un canal estrecho lleno de una secreción acuosa y con una cubierta queratinizada que el fármaco no puede traspasar. Pero la glándula terminal, no posee esta cubierta epidérmica, y además está en contacto con capilares sanguíneos de la

hipodermis, por lo tanto, si un fármaco fuera capaz de difundir a través del líquido acuoso intraluminal y llegar a la base de la glándula, podría absorberse y acceder así a la circulación sistémica salvando la barrera del estrato córneo. Se trata por lo tanto de una vía de penetración idónea para sustancias hidrófilas de bajo peso molecular y algunos electrolitos.

Por otra parte, si un fármaco fuera capaz de difundir a través de la sustancia altamente lipófila del canal folicular, y llegara a la base de la glándula o del folículo piloso, se absorbería fácilmente. Esto se produciría porque la base del pelo no está queratinizada y además se encuentra próxima a los capilares sanguíneos. Por su parte, las cubiertas epidérmicas de las glándulas sebáceas son discontinuas y muy poco consistentes por lo que resulta bastante sencilla la difusión hasta los vasos sanguíneos. El paso de sustancias a través de esta vía es bastante efectiva pero la escasez de folículos hace que la contribución de esta ruta se considere prácticamente despreciable (*Scheuplein, 1967*), aunque según ciertos autores, esta vía es usada prioritariamente por moléculas de gran tamaño y de carácter lipofílico (*Franz, 1975; Illel et al. 1991; Lademann et al., 2005; Schaefer y Lademann, 2001*).

Aunque el efecto metabólico de los enzimas de la piel no es tan importante como el que se pueda producir en el hígado, sí que puede reducir algo la biodisponibilidad de los fármacos aplicados por esta vía y por lo tanto también sería interesante tener en cuenta este efecto metabólico de los enzimas, que se encuentran mayoritariamente en la epidermis, en los folículos pilosos y en las glándulas sebáceas.

2.3.1 Factores implicados en la absorción transdérmica

Son muchos los factores que influyen en la absorción transdérmica y que por lo tanto se deben tener en cuenta para caracterizar el proceso de absorción transdérmica de cualquier sustancia. A continuación, se describen someramente.

Factores biológicos

Están relacionados con la naturaleza de la piel, y por lo tanto existe una gran variabilidad interindividual. Es muy importante conocerlos para obtener tratamientos correctos a través de la vía transdérmica.

La **edad** es posiblemente el factor biológico más investigado. Se encuentran muchas alteraciones, tanto funcionales como estructurales, en la piel a medida que esta va envejeciendo (*Fore, 2006*). Es bastante complicado atribuir algunos de estos cambios relacionados con la edad, a los procesos de envejecimiento o a daños ambientales acumulativos.

Se encuentran diferencias morfológicas muy importantes entre la piel de un adulto y la piel de un recién nacido (prematuro). La más obvia de las diferencias es la presencia de la *vérnix caseosa*, que es una sustancia amarillenta, grasa y humada, y cuya función es la de mantener la piel hidratada, con un pH correcto y libre de infecciones durante los primeros días de vida (*Marchini et al., 2002; Visscher et al, 2011*). A los pocos días de vida esta capa desaparece completamente poniendo de manifiesto la típica piel moderadamente seca de los recién nacidos.

Aunque histológicamente la estructura de la piel de un recién nacido es muy parecida a la de un individuo de edad más avanzada, en la dermis del recién nacido existe una mayor transición en el grosor de los haces de las fibras de colágeno presentes. Además, aunque la distribución de las fibras es similar a la del adulto, existe una disminución en la cantidad de elastina. Por otra parte, la piel del recién nacido, tiene grasa parda, que es un tejido adiposo muy vascularizado y que no se encuentra presente en la piel adulta. Sin embargo, la piel de un lactante prematuro presenta características únicas. A diferencia de la epidermis y del estrato córneo del recién nacido a término, que están bien desarrollados, con varias capas gruesas, un estrato córneo bien formado y unas propiedades barrera excelente (*Barker et al., 1987*), la piel de los lactantes prematuros tiene una mayor permeabilidad cutánea y una función barrera que funciona bastante peor debido a la falta de madurez (*Bressler y Bressler, 1989*).

Existen también diferencias inherentes al **género**, como pueden ser el tamaño de los queratinocitos que es ligeramente superior en las mujeres, aunque es cierto que no existen evidencias de que en una misma localización del cuerpo haya variaciones de permeación entre hombres y mujeres (*Roberts, 1998*).

Estudios entre la piel de diferentes **razas**, muestran diferencias en el espesor del estrato córneo, maduración y microestructuras, cantidad de agua presente en el estrato córneo, descamación de los corneocitos desigual, contenido lipídico variable y microcirculación distinta entre razas (*Berardescaet al., 1991; Wesley y Maibach, 2003*), y todo esto se puede traducir en diferencias en la absorción transdérmica. Por otra parte, la

permeabilidad de la piel de los individuos de raza negra es menor debido a que presentan una mayor densidad de la misma (*Reed et al, 1995*).

La **zona de aplicación** también es un factor muy importante a tener en cuenta, ya que el espesor del estrato córneo es mucho mayor en las zonas expuestas al roce como las palmas de las manos o de los pies, que en las zonas no expuestas (*Treffel et al., 1994; Tsai et al., 2003*).

Tanto el flujo sanguíneo como sus variaciones, presentan una gran trascendencia (*Cross y Roberts, 1995*), ya que cuando aumenta el flujo sanguíneo se reduce el tiempo de permanencia de las sustancias en la dermis, y por lo tanto aumenta el gradiente de concentración de las mismas, lo que favorece la difusión desde la superficie hacia la dermis. Esto es muy relevante cuando se trata de sustancias lipófilas para las que el paso a través del estrato córneo no supone un factor limitativo (*Cross y Roberts, 2008; Panchagnula et al., 2004*) o en situaciones en las que el estrato córneo está alterado. Cuando el flujo sanguíneo disminuye por alguna causa, y a medida que penetra la sustancia no se drena, esto se convierte en un factor limitante de la absorción (*Barry, 1983*). Por lo tanto, el uso de sustancias vasoconstrictoras puede reducir el drenaje y en consecuencia reducir la absorción de sustancias a través de la piel (*Riviere et al., 1991*).

Un aumento de la **temperatura** de la piel provoca una mayor penetración de moléculas debido al incremento del coeficiente de difusión (*Chang y Riviere, 1991*). Si la temperatura es muy elevada se produce también una desorganización de los lípidos del estrato córneo y una descomposición y evaporación de la queratina (*Park et al., 2008*).

Las variaciones en el **grado de hidratación** del estrato córneo es otro factor que también se tiene que considerar, ya que una mayor hidratación se traduce en una mayor permeación, sobre todo para las moléculas más polares (*Chen y Li, 2001; Gupta et al., 2005*).

Por último, no se puede olvidar que existen **patologías dermatológicas** que pueden producir alteraciones en las capas más superficiales de la piel como las dermatitis, la psoriasis o los eczemas, que modifican la función barrera y por lo tanto incrementan la permeabilidad de la piel (*Aalto-Korte y Turpeinen, 1993*).

Factores fisicoquímicos

En este apartado se deben considerar las características fisicoquímicas tanto del principio activo como de los vehículos utilizados para la preparación de las formas farmacéuticas de aplicación sobre la piel.

Las características fisicoquímicas del principio activo más relevantes en el proceso de absorción son: el coeficiente de reparto y de difusión, la concentración de principio activo (*Mustapha, et al., 2011*), y el pH del medio en el caso de sustancias ionizables. De estas cuatro características, las tres primeras, derivan directamente de la primera ley de Fick:

$$J = \frac{C \cdot D \cdot P}{h} \quad \text{Ec.2.3}$$

En la que **J** es el flujo permanente por unidad de superficie y que es proporcional a **C**, que es la concentración de principio activo; **D**, es el coeficiente de difusión del principio activo a través de la piel y **P** es el coeficiente de reparto en la membrana. El flujo a su vez es inversamente proporcional a **h**, el espesor de la membrana.

De las leyes de Fick, se deduce que la cantidad de principio activo que penetra por unidad de tiempo y superficie, es proporcional a la concentración de dicho principio activo en la formulación. Pero esto solo es válido hasta cierto límite, ya que cuando la concentración de principio activo es muy elevada, la cantidad absorbida es mayor de la que cabría esperar, y eso puede ser debido a la modificación de la estructura de la piel o a las variaciones en el coeficiente de reparto (*Scheuplein y Blank, 1971*).

La difusión a través de una membrana, está determinada por la resistencia que oponga el medio a su migración, y esta resistencia depende sobre todo de la membrana, de las características de la sustancia penetrante, de las interacciones entre el principio activo y el vehículo, y de la temperatura y viscosidad del medio.

Si se asume que las moléculas que han de penetrar son parecidas entre sí en tamaño y que tienen una conformación esférica, el coeficiente de difusión **D** se puede calcular a través de la ley de Stokes-Einstein (*Flynn y Yalkowsky, 1972*):

$$D = \frac{K \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta} \quad \text{Ec. 2.4}$$

En la que **T** es la temperatura absoluta, **K** es la constante de Boltzman, η representa la viscosidad del medio y **r** es el radio de la molécula.

A partir de esta ecuación, se deduce que a medida que aumenta el peso molecular de una sustancia su difusión será más dificultosa, pero esto no puede generalizarse a todos los casos porque como regla general, un aumento del peso molecular se traduce en un incremento del carácter lipófilo de la molécula y este factor posee mayor influencia en la capacidad de difusión. En general, se considera que los fármacos con una masa molecular menor a 500 Da (daltons) difunden con facilidad (*Bos y Meinardi, 2000*).

A través del coeficiente de reparto **P**, se puede cuantificar el grado de lipofilia de un compuesto. Este es un parámetro muy importante a la hora de establecer correlaciones entre la absorción de un principio activo y su lipofilia ya que la afinidad relativa de un soluto entre el medio acuoso que lo rodea y la membrana cutánea marca de forma trascendente su absorción a través de la piel (*Díez-Sales et al., 1993*).

Para poder determinar el coeficiente de reparto, se recurre a un sistema de dos fases inmiscibles que proporcione las concentraciones de la sustancia en el agua (**C_a**) y en el disolvente orgánico (**C_d**), de modo que:

$$P = \frac{C_d}{C_a} \quad \text{Ec. 2.5}$$

Existen estudios que avalan la idea de que un aumento de la lipofilia del compuesto supone un incremento de la permeabilidad (*Lee et al., 1994; Scheuplein, 1965*), pero un coeficiente de reparto muy alto no siempre presenta una mayor facilidad de difusión, ya que las sustancias que presentan una gran lipofilia se pueden acumular en el estrato córneo y esto hace que su absorción posterior esté dificultada (*Anderson y Raykar, 1989*).

Los mejores candidatos para la absorción cutánea son los principios activos que presentan una lipofilia comprendida entre los valores del coeficiente de reparto en n-octanol/solución acuosa de log P entre -1 y 4.

Como muchas de las sustancias son ácidos o bases débiles, es muy interesante tener en cuenta el pH del medio, ya que el porcentaje de principio activo que se encuentra ionizado depende de su pKa y del pH del medio en el que esté disuelto (*Cázares-Delgado et al., 2005; Valenta et al., 2000*). La forma no ionizada tiene un coeficiente de reparto lípido-agua superior a la forma ionizada, por lo que cabría esperar una permeabilidad superior de la fracción de fármaco no ionizada en el estrato córneo, pero la penetración de las sustancias ionizadas a través de la piel también es posible por lo que no debe considerarse despreciable, (*Hadgraft y Valenta, 2000*).

Los excipientes que van a ser utilizados en una formulación han de ser escogidos con precaución ya que pueden provocar modificaciones en la absorción transdérmica del principio activo o en la absorción del resto de sustancias que la componen. Estas modificaciones pueden ser debidas a

una interacción principio activo-vehículo, a una acción directa sobre las propiedades o estructuras de la membrana, o a una acción indirecta, al modificar por ejemplo la temperatura de la piel, su nivel de hidratación u otras propiedades (*Hilton et al., 1994; Yamane et al., 1995*).

Algunos de los excipientes añadidos en las formulaciones utilizadas para la realización de este estudio, pueden actuar como promotores químicos, ya que son sustancias que tienen la propiedad de alterar las "barreras" de la piel, produciendo una mayor absorción transdérmica de los principios activos, (*Barry, 1983; Barry, 1987; Chattaraj y Waiker, 1995; Hadgraft y Walters, 1992, Moser et al., 2001; Williams, 2003*). Estos excipientes son:

El **agua**, que es, probablemente, la sustancia más estudiada ya que es el promotor químico más natural (*Roberts y Walter, 1993*). Por norma general, si incrementa la hidratación del tejido cutáneo, aumenta la absorción transdérmica de sustancias lipófilas e hidrófilas. La oclusión aumenta la permeación en un gran número de principios activos (*Feldman y Maibach, 1965; Idson, 1975*). Este efecto se ha relacionado con la hidratación de lípidos intercelulares y la queratina. Diferentes estudios realizados mediante análisis calorímetro diferencial, apuntan a que el agua aumenta la fluidez de la bicapa lipídica reduciendo su grado de empaquetamiento (las moléculas de agua se asocian a las cabezas polares de los lípidos). Por otro lado, según un estudio (*Barry, 1987*), el agua afectaría a su vez a las moléculas de α -queratina, por un mecanismo competitivo en los puntos de unión con el hidrógeno en las cadenas proteicas, lo que provoca una expansión de los corneocitos.

Algunos autores coinciden en que la relación entre el aumento del contenido en agua de estos lípidos intercelulares y el aumento de la fluidez resultante es compleja. Otros por el contrario manifiestan que, incluso con porcentajes de hidratación elevados (hasta del 150%) (*Bouwstra et al., 1995*), no se producen modificaciones apreciables en la organización y estructura de los lípidos del estrato córneo.

También se ha relacionado el efecto promotor del agua con su capacidad disolvente (*Wester y Maibach, 1995*).

Los **tensiactivos** están presentes en un gran número de formulaciones. Presentan la particularidad de contener grupos polares y grupos apolares en la misma molécula. Los tensiactivos no iónicos son los que más se utilizan en la industria farmacéutica, debido a que presentan muy pocos efectos adversos y una gran capacidad de solubilización y de emulsificación (*Murahata et al., 1988*).

Los tensiactivos aniónicos, penetran en la piel y modifican su condición de barrera (*Gibson y Teall, 1983; Karande y Mitagroti, 2002; Shokri et al., 2001*). Su eficacia está relacionada con el tamaño de su cadena, siendo las de 10 o 12 átomos de carbono, las más eficaces. Los alquilsulfatos, son los más estudiados, y su acción es debida a la interacción con los lípidos del estrato. Puede aumentar el volumen de agua en los lípidos intercelulares y desorganizarlos (*Gibson y Teall, 1983*). Sin embargo, su uso está muy limitado, ya que presentan muchos problemas irritativos (*Rhein et al., 1990*).

Los tensioactivos catiónicos, son todavía más irritantes que los aniónicos, pero son capaces, mediante la formación de pares iónicos, de facilitar la permeación de principios activos aniónicos (*Barker y Hadgraft, 1981*).

Los **alcoholes** proporcionan un efecto promotor relacionado directamente con la longitud de la cadena alquílica (*Kim et al., 1992*) produciendo un aumento de la solubilidad del principio activo sin descartar un efecto directo sobre algunos componentes de la membrana (*Tsuzuki et al., 1988*). También se ha observado, que algunos de los alcoholes con bajo peso molecular, presentan sinergia con otros promotores no polares, aumentando de esta forma el paso transdérmico del principio activo (*Berner y Lui, 1995*). Entre los alcoholes con efecto promotor más estudiados, destaca el propilenglicol, cuyo mecanismo de acción se ha relacionado con un incremento de la solubilidad del principio activo en el vehículo. Lo mismo ocurre con el etanol, aunque en ninguno de los dos casos se descarta un incremento del reparto del principio activo en el estrato debido a la presencia de estos alcoholes (*Barry, 1991; Puglia et al., 2001*).

Los ácidos grasos son promotores utilizados junto a numerosos principios activos (*Barry y Bennett, 1987; Mittal et al., 2009; Thomas y Panchagnula, 2003*), además se ha podido demostrar que algunas de las ceramidas que se encuentran presentes en la piel, contienen a su vez, algunos de los ácidos grasos que son usados como promotores químicos (*Novotný et al., 2009*). Varios estudios ponen de manifiesto la influencia

que tiene la estructura de estos ácidos grasos, influyendo de manera directa, el número y la posición de los dobles enlaces o la longitud de las cadenas alquílicas (Andega et al., 2001; Thomas y Panchagnula, 2003). De la misma forma, estudios existentes sobre la posición del doble enlace demuestran que los isómeros trans son menos eficaces que los cis (Cooper, 1984).

2.4 MÉTODOS EXPERIMENTALES *IN VITRO* PARA EL ESTUDIO DE LA ABSORCIÓN TRANSDÉRMICA

Como se ha indicado en los epígrafes anteriores, la absorción percutánea está relacionada con un gran número de factores como el tipo de piel, las condiciones experimentales, la temperatura, la naturaleza del permeante, la composición de la formulación, etc. (Romonchuk y Bunge, 2008; Vecchia y Bunge, 2005; Wilkinson y Williams, 2002; Zhai y Maibach, 2001). Realizar los estudios de absorción transdérmica *in vivo* en humanos sería la opción más fiable para conocer el grado de absorción transdérmica en la especie humana, pero debido al elevado coste y a múltiples factores éticos, estos estudios son muy poco frecuentes. Una alternativa podría ser realizar estudios *in vitro* utilizando piel de procedencia humana pero también es complicado debido a la baja disponibilidad y a la dificultad que plantea poder controlar factores como la edad, el sexo, la raza o las condiciones de obtención y conservación de la misma. A esto, hay que sumar el hecho de que el uso de piel humana está ligada a un cierto número de consideraciones éticas, tanto nacionales como internacionales (CEIIER, 2007; ECETOC, 1993). Por todo esto, la gran

mayoría de los estudios transdérmicos se realizan *in vitro*, utilizando membranas artificiales o pieles de distinta procedencia, motivo por el que el objetivo principal de los métodos *in vitro* utilizados para caracterizar y cuantificar el grado de absorción transdérmica es llegar a obtener correlaciones entre los datos obtenidos mediante la utilización de estos métodos y los obtenidos en estudios de absorción *in vivo* (Bronaugh, 2004; Franz, 1978; Mitragotri et al., 2011).

Así mismo, con la utilización de métodos de absorción *in vitro* se puede profundizar en diferentes factores que influyen en la absorción transdérmica, ya que permiten controlar las condiciones en el ensayo y de esta forma es posible diseñar un determinado ensayo experimental para obtener respuesta a una finalidad buscada. En este sentido, resultan muy adecuados para evaluar el efecto de los vehículos en la penetración transdérmica de sus componentes.

2.4.1 Modelos animales como alternativa a la piel humana

La procedencia de la piel utilizada para el ensayo, se debe seleccionar en función de la finalidad de la prueba, pero sobretodo, de la disponibilidad de tipos de piel que se tenga al alcance.

Para el estudio de la penetración de sustancias a través de la piel a partir de sistemas transdérmicos, se utilizan pieles procedentes de distintas especies animales, las utilizadas con mayor frecuencia son:

- Piel de cerdo (Marro et al., 2001).
- Piel de conejo (Van de Sandt y Rutten, 1995).

- Piel de ratón o rata (*Naoki et al., 1995; Van Ravenzwaay y Leibold, 2004*). De estos los más utilizados son los llamados “hairless” o “sin pelo” (*Simon y Maibach, 1998*).

Aunque se posee información sobre las características de permeabilidad pasiva con todos estos modelos de piel (*Vecchia y Bunge, 2005; Wagner et al., 2001*), no se sabe de qué manera pueden influir las diferentes microestructuras de cada tipo de piel en la absorción percutánea. Es por ello, por lo que en este apartado se compara brevemente la histología y la morfología de los modelos animales más usados en el desarrollo y estudio de los sistemas transdérmicos.

La piel del cerdo doméstico es considerada la más similar a la humana aunque a nivel morfológico se encuentran diferencias. La piel del cerdo tiene distribuido el pelo de una forma más irregular y escasa que el hombre, y es en el lomo del animal donde se encuentra el pelo más largo y grueso. Posee unos folículos pilosos cortos y robustos. La densidad es más similar entre el hombre y el cerdo, aproximadamente de 11 folículos/cm², mientras que la rata posee una densidad media de 290 folículos/cm², o de unos 100 folículos/cm² en la variedad sin pelo. Un dato interesante y a tener en cuenta es que la densidad folicular del cerdo neonato es mucho más alta que la del cerdo adulto (*Ferry et al., 1995*).

La epidermis, tanto la del cerdo (70-140 µm) como la del humano (50-120 µm) son relativamente gruesas las dos, en comparación con la epidermis de otros mamíferos (*Meyer et al., 1978*); sin embargo, la piel humana está mucho más vascularizada.

Tanto el cerdo como la rata poseen a nivel lipídico, componentes propios de cada especie (*Caussin et al., 2008*). La disposición de proteínas y lípidos en el estrato córneo de las tres especies (humano, cerdo y rata), ha sido estudiada por difracción de rayos X, cromatografía de capa fina y microscopía electrónica con el fin de relacionar las diferencias de permeabilidad entre las tres especies (*Bouwstra et al., 1995*).

Con todo esto, se considera que la piel con características de permeabilidad pasiva más parecida a la humana es la del cerdo. Su gran parecido histológico, su acreditación respecto a la semejanzas en cuanto a comportamiento barrera con la piel humana (*Abd et al., 2016, Femenía-Font et al., 2006*), y su disponibilidad sin necesidad de sacrificar animales expresamente para la realización de estudios de absorción, ha hecho que sea el sustrato biológico más empleado en los últimos años para realizar estudios de absorción transdérmica, especialmente de productos cosméticos, dada la prohibición de que su permeabilidad sea evaluada en animales criados exclusivamente con este fin. Además algunos autores indican que su uso es adecuado en estudios de permeabilidad de fármacos para neonatos (*Sekkat et al., 2004*).

2.4.2 Técnicas experimentales

Para la realización de la mayoría de los ensayos de absorción percutánea *in vitro*, se usan celdas de difusión formadas por dos compartimentos. Estos dos compartimentos, se encuentran separados entre sí por una membrana. La naturaleza de la membrana la marcará la finalidad del ensayo. En el compartimento dador de la celda se dispone la

formulación que se pretende estudiar. El otro compartimento es el receptor, que contiene normalmente una solución tampón o fisiológica. De esta manera se crea un sistema de desequilibrio termodinámico que favorecerá el paso de sustancias desde el compartimento dador al compartimento receptor. De la solución receptora es de donde se analizará y valorará el fármaco mediante fotometría, cromatografía, conteo de radioisótopos, etc. Es bastante habitual también la detección y cuantificación del principio activo que queda retenido en la piel.

Básicamente existen dos diseños de celdas de difusión:

- Estáticas
- De flujo continuo

En los dos diseños, el compartimento dador se encuentra situado encima del receptor y entre los dos se coloca horizontalmente la membrana. En el diseño estático, el fluido del compartimento receptor no se renueva, aunque si se repone el mismo volumen que es extraído para la toma de muestras. En el diseño de flujo continuo, se produce una renovación continua del líquido receptor para tratar de simular el drenaje vascular. Esto es de gran ayuda cuando se estudian sustancias poco solubles o al contrario, sustancias que alcanzan concentraciones muy elevadas en el líquido receptor, ya que en los dos casos la velocidad de difusión se puede encontrar limitada por la pérdida de condiciones sumidero.

En los ensayos *in vitro*, normalmente se calculan las cantidades de soluto que se acumulan en el compartimento receptor en función del

tiempo. Cuando se representan de forma gráfica las cantidades de soluto acumuladas frente a los tiempos de toma de muestra se obtienen perfiles de absorción como los que se representan en la Figura 2.7, dependiendo de que sean dosis finitas o infinitas, es decir, dosis administradas puntualmente o dosis continuas:

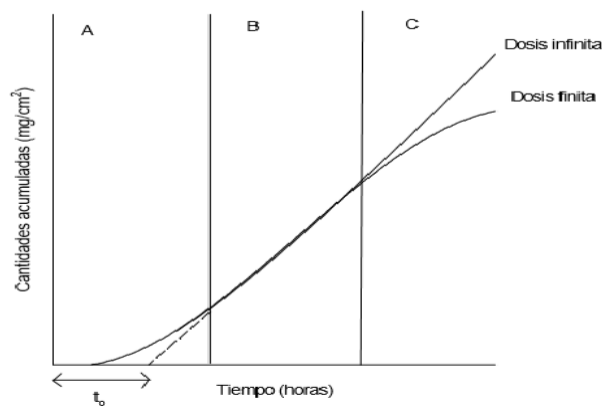


Figura 2.7. Perfil de cantidades acumuladas en el compartimento receptor frente al tiempo. Metodología de dosis infinita y dosis finita.

Gran parte de la información relativa a la absorción percutánea se obtiene en condiciones de estado estacionario (región B y C de la Figura 2.7 en el caso de la dosis infinita, y región B de la Figura 2.7 en el caso de la finita). El flujo de absorción transdérmico por ejemplo, corresponde a la pendiente del estado estacionario. De la región A, que corresponde al primer tramo del perfil de absorción, se obtiene el tiempo de latencia (t_0), que es el tiempo que se tarda en alcanzar el tiempo estacionario y que se corresponde con el corte en el eje de las abscisas al prolongar la recta que se obtiene del estado estacionario. Debido a que el perfil en el caso de la

dosis finita no siempre es lineal, se pueden encontrar dificultades a la hora de obtener medidas seguras del estado estacionario (*Williams, 2003*).

Cuando se utiliza el **método de la dosis infinita**, la concentración de sustancia penetrante en el compartimento dador de la célula de Franz es invariable (dosis infinita), mientras que en el compartimento receptor, durante todo el ensayo se mantienen las condiciones sumidero. Puede admitirse una disminución en la concentración del sistema dador o un incremento en el sistema receptor, pero esta variación no puede ser nunca mayor de un 10%, ya que se estima que variaciones de concentración de este orden no afecta de forma importante a las condiciones de flujo de orden cero (*Barry, 1983*). De esta forma, después de un periodo de latencia, el gradiente de concentración se mantiene constante a través de la membrana y por lo tanto, es constante la velocidad de penetración de la sustancia.

El **método de la dosis finita** simula mejor las condiciones *in vivo*. Se utilizan sistemas que administran una dosis finita en el compartimento dador. En consecuencia, se produce de forma progresiva, una disminución del gradiente de concentración, y por lo tanto una disminución de la absorción transdérmica.

En este tipo de ensayos, las predicciones son bastante más complicadas que en los ensayos de dosis infinita, pero son también los que ofrecen mayor similitud con la aplicación clínica ya que son los que más se aproximan a la realidad.

CAPITULO 3

3 DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE BRONIDOX

3.1 INTRODUCCIÓN

El resultado obtenido del desarrollo de un método analítico para analizar una muestra, debe garantizar que ofrece la información precisa y exacta del parámetro o componente que se determina sin que el proceso analítico y/o la matriz de la muestra influyan en el valor obtenido. El método analítico se plantea pensando en un objetivo concreto: qué parámetro o componente se quiere determinar, qué técnica analítica se utilizará, qué método analítico se utilizará, qué muestra se procesará, qué rango de valores se espera encontrar y con qué grado de precisión se necesita el resultado.

Una vez establecidas las condiciones definitivas del método de análisis, se debe determinar que las características que aporta son las adecuadas para la determinación que se ha establecido: se debe determinar que el método analítico es apropiado para el objetivo establecido.

Con el fin de realizar los ensayos de absorción transdérmica de cualquier sustancia, es imprescindible disponer de un método analítico validado que permita la cuantificación de esta sustancia, en las muestras provenientes de dichos ensayos.

La revisión bibliográfica realizada de forma exhaustiva reveló la ausencia de un método analítico fiable, económico y rápido para la detección del bronidox, por lo que el objetivo del trabajo descrito en este capítulo, es el desarrollo de un método analítico capaz de cuantificar el

bronidox presente en las muestras procedentes de los ensayos de difusión transdérmica y la validación del mismo, de forma que se demuestre que proporciona resultados adecuados y fiables. Además, se han realizado estudios para verificar la estabilidad del conservante en las matrices manejadas.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Para desarrollar y validar el método analítico de bronidox se utilizó como materia prima bronidox procedente de Sigma Aldrich Química S.A (Tres Cantos, Madrid, España), con una pureza del $\geq 99\%$ (m/m).

3.2.1 Condiciones cromatográficas

Se utilizó un cromatógrafo líquido Agilent-1100 con un fotodiodo de detección Ultravioleta/Visible y una columna Brisa LC2 C18 (5 μm 15 x 0,46 cm). Las fases móviles utilizadas fueron combinaciones de metanol:agua y de etanol:agua, filtradas. Tanto el metanol como el etanol se obtuvieron de la empresa análisis vinicos S.L (Tomelloso, Castilla la Mancha, España). Se seleccionó la longitud de onda de detección de 212 nm y la temperatura de la columna de 25°C. Se optimizó la composición y el flujo de la fase móvil, así como el volumen de inyección. En la Tabla 3.1 se especifican las condiciones cromatográficas evaluadas para la detección y cuantificación del bronidox.

CONDICIONES CROMATOGÁFICAS EVALUADAS PARA LA DETERMINACIÓN ANALÍTICA DE BRONDOX	
Columna	BRISA LC C18 (5 µm 15 x 0,4)
Fase móvil [A:B(v/v)]*	30:70 35:65 40:60 45:55
Flujo eluyente	1,1 0,8 1,2 mL/min
Volumen de inyección	10, 20, 50 y 100 µL
Detección UV	212 nm
pH	5,5

Tabla 3.1. Condiciones cromatográficas evaluadas para realizar la determinación analítica del bronidox por HPLC-UV. *Fase móvil [A (metanol o etanol): B (agua)].

3.2.2 Solución amortiguadora de pH.

Para la preparación de las soluciones patrón se utilizó una solución amortiguadora isotónica, con un pH ajustado de 5,5 [cloruro sódico (NaCl, 133 mM); 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES, 25 mM)]. Tanto el NaCl como el HEPES de grado analítico, fueron suministrados por Sigma-Aldrich CO. (St. Louis, Missouri, EEUU).

Antes de utilizar esta solución amortiguadora de pH, se ajustó el pH a 5,5 con ayuda de una disolución de NaOH 1N o de HCl 1N. El agua utilizada fue agua desionizada (agua Millipore Quantum®).

La solución se conservó en frascos de vidrio opacos a una temperatura comprendida entre 4 y 8°C. El periodo de validez de la solución fue de una semana.

3.2.3 Soluciones patrón

En la Tabla 3.2 se especifican las concentraciones de la solución madre y de las disoluciones patrón utilizadas para la validación del método analítico.

Compuesto	Concentración (mg/L)	
	Disolución madre	Disoluciones patrón
<i>Bronidox</i>	2000	0,5; 1; 5; 20; 50; 100; 250; 500; 750; 1000; 1500

Tabla 3.2. Concentraciones (mg/L) de la solución madre y de los diferentes patrones utilizados para desarrollar y validar el método analítico del bronidox.

Mediante el programa informático Excel® 2013 (Microsoft Corporation) y el paquete estadístico IBM SPSS Statistics® v. 20.0.0. (IBM Corporation), se llevó a cabo el análisis de regresión lineal, por mínimos cuadrados, de las áreas de los picos cromatográficos frente a las concentraciones de analito y se calcularon la suma de cuadrados de los residuales, la pendiente de la recta, el error estándar de la pendiente y sus límites de confianza al 95%.

3.3 VALIDACIÓN DEL MÉTODO

El método cromatográfico se validó siguiendo las recomendaciones de la International Conference on Harmonisation (ICH, 2005) en términos de linealidad, precisión (intra e interdía), exactitud, límite de detección y cuantificación, y especificidad.

3.3.1 Linealidad

La linealidad de un procedimiento analítico se define como su capacidad (dentro de un intervalo) para obtener resultados que sean directamente proporcionales (o por medio de ecuaciones matemáticas) a la concentración (cantidad) de analito en la muestra (Bruce, 1984; Montojo, et al., 1986).

La linealidad del método analítico se evaluó mediante la construcción de tres rectas de calibrado utilizando las disoluciones patrón indicadas en el apartado anterior. Estas rectas relacionan la respuesta (área de pico cromatográfico del bronidox (y)) con la concentración de las disoluciones patrón del compuesto en el eje de abscisas (x), según muestra las Ecuaciones 3.1 y 3.2:

$$y = b \cdot x \quad \text{Ec. 3.1}$$

$$y = b \cdot x + a \quad \text{Ec. 3.2}$$

en las que **b** es la pendiente de la recta y **a** es la ordenada en el origen.

Se analizaron las disoluciones patrón por triplicado y se construyó una recta de calibrado independiente a partir del valor medio de concentración de cada disolución patrón, tomando como criterio de referencia un valor de coeficiente de correlación (r) mayor o igual a 0,98.

3.3.2 Precisión y exactitud

La precisión de un procedimiento analítico expresa la concordancia (o el grado de dispersión) entre una serie de medidas obtenidas a partir de múltiples determinaciones de la misma muestra homogénea, en unas condiciones determinadas. El objetivo de su estudio es conocer la variabilidad del método de ensayo, debida a errores aleatorios inherentes al mismo. La precisión puede considerarse en dos niveles: intra e interdía.

Con el fin de determinar la precisión intra día del método analítico empleado, se analizaron 3 disoluciones patrón del compuesto de los niveles de concentración 0,5, 100 y 2000 µg/mL por triplicado, de forma no consecutiva a lo largo de una jornada de trabajo.

Con el fin de determinar la precisión interdía del método analítico empleado, se analizaron las mismas disoluciones que en el caso anterior durante tres días.

La precisión intra e interdía se expresa como coeficiente de variación (CV) (ecuación 3.3) de la concentración de compuesto, y se adopta como criterio de aceptación que sea menor o igual a un $10 \pm 2,5\%$.

$$C.V (\%) = \frac{\sigma}{x} \cdot 100 \quad \text{Ec. 3.3}$$

Siendo “x” la concentración de compuesto determinada experimentalmente y “σ” la desviación estándar (US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, 1998).

La exactitud de un procedimiento analítico expresa la cercanía de acuerdo entre el valor que se acepta como verdadero o de referencia y el valor encontrado.

Con el fin de determinar la exactitud del método analítico empleado, se analizaron disoluciones patrón de bronidox de los niveles de concentración 0,5, 100 y 2000 µg/mL. La exactitud (ecuación 3.4) se expresa como la diferencia entre la concentración determinada y la teórica en tanto por cien, y se adopta como criterio de aceptación que sea menor o igual al 15% (US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, 1998).

$$E = \frac{CPE - C_T}{C_T} \cdot 100 \quad \text{Ec. 3.4}$$

siendo **CPE** la concentración de compuesto determinada experimentalmente y **C_T** la concentración teórica de compuesto.

3.3.3 Límites de detección y cuantificación

Se entiende por límite de detección (**LD**) la mínima concentración o cantidad de analito presente en la muestra que se puede detectar, aunque no necesariamente cuantificar, bajo las condiciones experimentales descritas; y por límite de cuantificación (**LC**) la mínima concentración o cantidad de analito en la muestra que se puede cuantificar, bajo dichas condiciones experimentales, con una adecuada precisión y exactitud.

El LD se calculó como:

$$LD = 3 \cdot \frac{\sigma}{b} \quad \text{Ec. 3.5}$$

El LC se calculó como:

$$LC = 10 \cdot \frac{\sigma}{b} \quad \text{Ec. 3.6}$$

siendo “ σ ” la desviación estándar de los residuales y “ b ” la pendiente de la recta de calibrado.

3.3.4 Especificidad

La especificidad es la capacidad de identificar inequívocamente el analito en presencia de componentes que se puede esperar que estén presentes en las muestras (impurezas, degradantes, matriz, etc.). Esto viene determinado por el valor del área obtenida al inyectar en el HPLC un blanco, es decir una muestra con una matriz igual a las que se analizaran pero que no contenga al analito.

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Condiciones cromatográficas

En la Tabla 3.3, se muestran las condiciones cromatográficas seleccionadas para la determinación cuantitativa de bronidox a partir de las muestras experimentales.

CONDICIONES CROMATOGÁFICAS SELECCIONADAS PARA LA DETERMINACIÓN DE BRONIDOX	
Columna	BRISA LC C18 (5 µm 15 x 0,4)
Fase móvil Metanol:agua (v/v)	35:65
Flujo eluyente	1,1 mL/min
Volumen de inyección	10 µL
Detección UV	212 nm
pH	5,5

Tabla 3.3. Condiciones cromatográficas seleccionadas en el proceso de optimización del método analítico del bronidox.

3.4.2 Validación del método analítico

Linealidad

El ensayo de linealidad de la técnica analítica se realizó en el intervalo de concentraciones de bronidox de 0,5 a 2000 mg/L.

Los datos experimentales disponibles se ajustaron a las Ecuaciones 3.1 y 3.2. El análisis estadístico realizado indicó que la ordenada en el origen (a) no presenta significación estadística (Tabla 3.4).

	VALOR ESTIMADO	ERROR ESTÁNDAR	LÍMITE INFERIOR DEL IC 95%	LÍMITE SUPERIOR DEL IC 95%
	22,14	29,06	-43,61	87,89
	8,01	0,04	7,92	8,09

Tabla 3.4. Resultados estimados por el programa Stagraphics Plus 5.1 para la evaluación de la significación de la ordenada en el origen (a) y de la pendiente de la recta de calibrado (b).

El método analítico desarrollado presenta buena linealidad, habiendo obtenido un valor de coeficiente de correlación (r) en las rectas de calibrado siempre mayor de 0,98. En la Figura 3.1, se representa una de las rectas de calibración obtenidas.

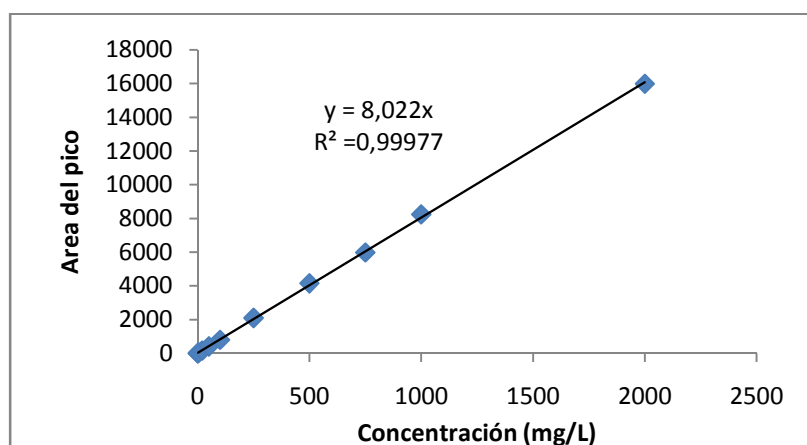


Figura 3.1. Recta de calibrado de bronidox. Se muestra la ecuación de la recta obtenida, así como el coeficiente de determinación (R^2).

En la Tabla 3.5 se muestra el valor estimado, el error estándar y los límites inferior y superior del intervalo de confianza 95% de la pendiente. Estos valores se obtuvieron con ayuda del programa informático Statgraphics Plus 5.1.

	VALOR ESTIMADO	ERROR ESTÁNDAR	LÍMITE INFERIOR DEL IC 95%	LÍMITE SUPERIOR DEL IC 95%
	8,02	0,03	7,95	8,09

Tabla 3.5. Valores de la pendiente de la recta de calibrado (b), error estándar de la estimación e intervalo de confianza del 95%.

Exactitud

El ensayo de **exactitud** de la técnica analítica se realizó en el intervalo de concentraciones de bronidox comprendido entre 0,5 y 2000 mg/l. En la Tabla 3.6 se muestran las concentraciones teóricas (CT), las concentraciones promedio estimadas (CPE), así como sus errores relativos (E) de estimación (exactitud).

BRONIDOX						
	DÍA 1		DÍA 2		DÍA 3	
CT (mg/L)	CPE (mg/L)	E (%)	CPE (mg/L)	E (%)	CPE (mg/L)	E (%)
0,5	0,45	-10,00	0,47	-6,00	0,52	4,00
100	100,36	0,36	104,37	4,37	108,53	8,53
2000	1988,12	-0,60	2027,84	1,39	2002,11	0,11

Tabla 3.6. Concentraciones de bronidox promedio estimadas (CPE) y errores relativos de estimación (E) (exactitud) para cada una de las disoluciones patrón indicadas.

Precisión

El ensayo de **precisión** de la técnica analítica se realizó en el intervalo de concentraciones de bronidox comprendido entre 0,5 y 2000 mg/L. En las Tablas 3.7-3.8 se muestran los resultados de los ensayos de estimación de la precisión intradía e interdía respectivamente, a través de las concentraciones promedio estimadas, las desviaciones estándar y los coeficientes de variación.

BRONIDOX									
	DÍA 1			DÍA 2			DÍA 3		
CT (mg/L)	CPE (mg/L)	DE (%)	CV (%)	CPE (mg/L)	DE (%)	CV (%)	CPE (mg/L)	DE (%)	CV (%)
0,5	0,45	0,04	8,89	0,47	0,03	6,38	0,52	0,02	3,84
100	100,36	0,13	0,13	104,73	0,83	0,79	108,53	0,25	0,23
2000	1988,12	3,97	0,20	2027,84	3,48	0,17	2002,11	2,25	0,11

Tabla 3.7. Estimación de la precisión intradía para las concentraciones indicadas. Se muestran, las concentraciones promedio estimadas (CPE), las desviaciones estándar (DE) y los coeficientes de variación (CV) para cada una de las disoluciones patrón utilizadas.

BRONIDOX			
CT (mg/L)	CPE (mg/L)	DE (%)	CV (%)
0,5	0,48	0,03	6,25
100	104,54	4,09	3,91
2000	2006,02	20,14	1,00

Tabla 3.8. Estimación de la precisión interdía para las concentraciones indicadas. Se muestran las concentraciones promedio estimadas (CPE), las desviaciones estándar (DE) y los coeficientes de variación (CV) para cada una de las disoluciones patrón utilizadas.

Límite de cuantificación y detección de la técnica analítica

El límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC) de la técnica analítica se calcularon de acuerdo con las Ecuaciones 3.5 y 3.6 para una recta de calibrado de concentraciones comprendidas entre 0,5 - 2000 mg/L, respectivamente. En la Tabla 3.9 se muestran los resultados obtenidos para el bronidox.

BRONIDOX	
LD (mg/L)	LC (mg/L)
28,70 mg/L	95,69 mg/L

Tabla 3.9. Límites de detección (LD) y límites de cuantificación (LC) del método analítico de valoración de bronidox.

Especificidad

Utilizando las condiciones cromatográficas descritas (Tabla 3.3), se obtuvo una buena separación del bronidox del resto de componentes de las muestras analizadas. La Figura 3.2 muestra el cromatograma que resulta al aplicar el método analítico seleccionado.

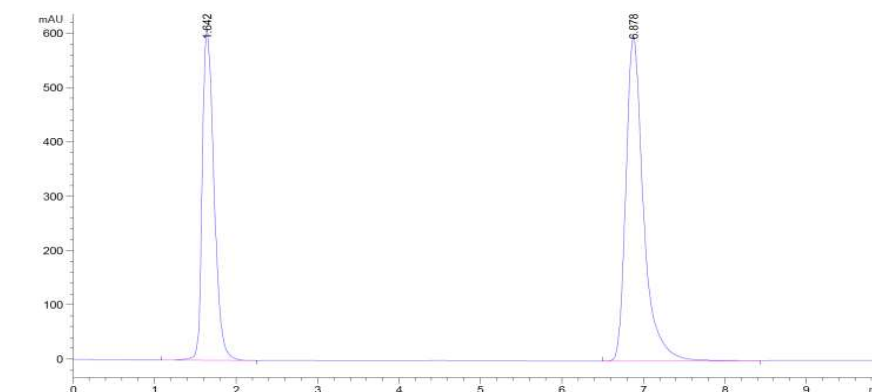


Figura 3.2. Cromatograma de una solución de bronidox 850 mg/L, utilizando un volumen de inyección de 10 μ L y una fase móvil metanol:agua (35:65 V/V). Tiempo de retención del bronidox 6,878 minutos.

3.5 DISCUSIÓN

3.5.1 Desarrollo y optimización del método analítico de Bronidox

Con la finalidad de iniciar el estudio de la absorción transdérmica *in vitro* del bronidox utilizando la piel de oreja de cerdo, fue necesario desarrollar y validar un método analítico para la determinación cuantitativa de este conservante. Este método debía estar dotado de una sensibilidad elevada, ya que en estos estudios las concentraciones de analito en las muestras experimentales suelen ser bajas. Además, en los estudios de permeabilidad, algunos compuestos endógenos de la piel son liberados a la fase receptora y pueden producir interferencias que dificultan la determinación del analito con la exactitud y la precisión requeridas. Previamente al desarrollo y validación del método analítico, se realizó una

búsqueda bibliográfica exhaustiva y entre los artículos de cuantificación de bronidox publicados se seleccionó una norma oficial AENOR (AENOR, 2003), en la que se describe un protocolo para la determinación cuantitativa del bronidox mediante HPLC. El método analítico descrito utilizaba una fase móvil compuesta por una mezcla de etanol:agua (35:65 V/V) y una columna Brisa LC2 (5µm 15x0,46cm) por lo que estas fueron las condiciones que se utilizaron como punto de partida para el desarrollo del método analítico desarrollado en este trabajo. Utilizando estas condiciones iniciales, se valoró una solución acuosa de bronidox 1000mg/L y los cromatogramas obtenidos no fueron satisfactorios, ya que la señal de ruido fue elevada y el tiempo de retención del analito excesivo (17 minutos) (Figura 3.3). Un tiempo de retención elevado supone una baja eficiencia y conlleva una dedicación del investigador considerable por lo que se buscaron alternativas analíticas encaminadas a solucionar los inconvenientes que proporcionaba el método analítico publicado en la norma oficial AENOR. En otras palabras, la optimización del método analítico de bronidox se realizó con el objetivo de acortar el tiempo de retención del analito y en eliminar el ruido de fondo de la señal del cromatograma.

Entre las mezclas evaluadas como fase móvil, se seleccionó como fase móvil una mezcla formada por metanol y agua en la proporción volumétrica (35:65;V/V). Mezclas que contenían un porcentaje mayor al 35% de metanol, acortaban el tiempo de retención del pico cromatográfico de bronidox, pero por contra, el pico cromatográfico presentaba baja resolución (mayor cola), lo que dificultaba su integración (Figura 3.4). Las

mezclas que contenían un porcentaje de metanol inferior al 35%, aumentaban el tiempo de retención del pico cromatográfico del bronidox sin mejorar su estructura respecto a la composición metanol:agua seleccionada (35:65, V/V) (Figura 3.5).

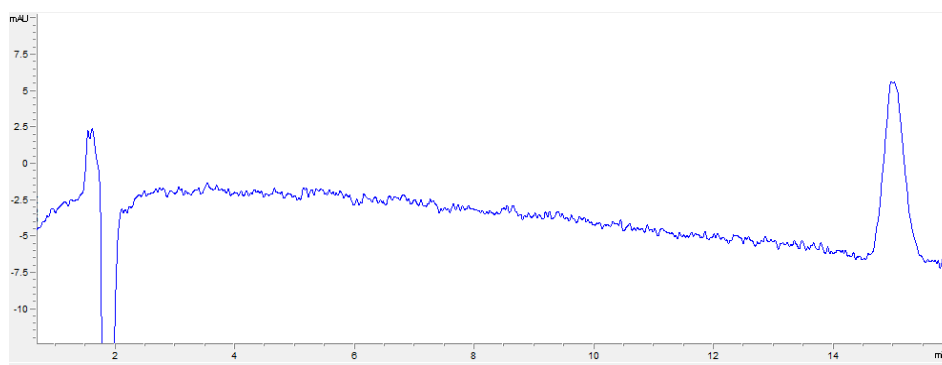


Figura 3.3. Pico cromatográfico de bronidox (tiempo de retención 15 minutos) obtenido tras la inyección en el cromatógrafo de una disolución de bronidox de 1000 mg/L utilizando como fase móvil EtOH:Agua (35:65,v/v)

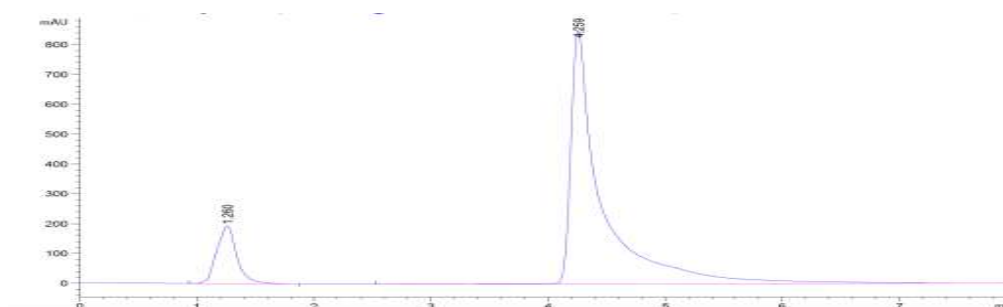


Figura 3.4. Pico cromatográfico de bronidox (tiempo de retención 4,2 minutos) obtenido tras la inyección en el cromatógrafo de una disolución de bronidox, utilizando como fase móvil MeOH:Agua (45:55,v/v)

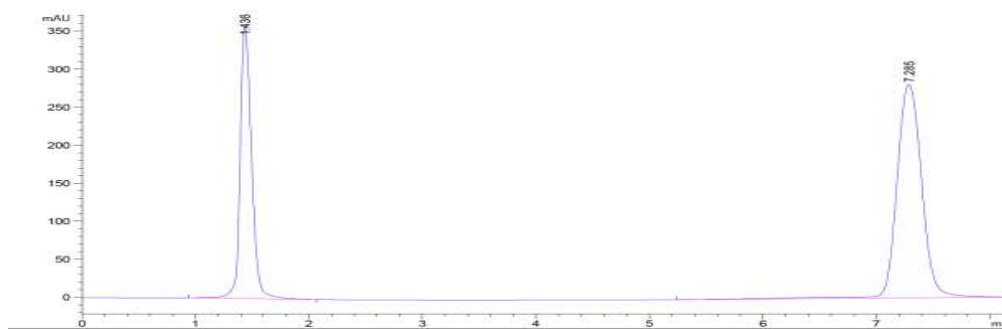


Figura 3.5. Pico cromatográfico de bronidox (tiempo de retención 7,2 minutos) obtenido tras la inyección en el cromatógrafo de una disolución de bronidox, utilizando como fase móvil MeOH:Agua (25:75, V/V)

Simultáneamente se optimizó el flujo de elución teniendo en cuenta el tiempo de retención y la estructura del pico cromatográfico, seleccionando un flujo de elución de la fase móvil de 1,1 mL/min. Con flujos de elución de la fase móvil inferiores a 1,1 mL/min se observó pérdida de simetría de los picos cromatográficos dificultando así su integración.

Con las condiciones cromatográficas seleccionadas, fase móvil constituida por la mezcla metanol:agua (35:5; V:V) y flujo de elución de 1,1 mL/min, el tiempo de retención del pico cromatográfico del bronidox fue de 7 minutos y la señal del ruido de fondo inexistente.

Asimismo, se analizaron los cromatogramas obtenidos al inyectar volúmenes de muestra comprendidos entre 10 y 100 μL (10 μL , 25 μL , 50 μL y 100 μL) y se seleccionó un volumen de inyección de 10 μL , ya que fue el que ofreció los cromatogramas con picos de simetría óptima.

Las condiciones cromatográficas seleccionadas permitieron en todos los casos una buena separación del pico cromatográfico del bronidox del resto de componentes (Figura 3.2).

3.5.2 Validación de método analítico

Para la obtención de rectas de calibración se utilizaron disoluciones del analito que comprendían el intervalo de concentraciones necesarias para cuantificar las concentraciones del mismo en los ensayos experimentales.

El estudio de linealidad demostró la proporcionalidad entre la variable área y la variable concentración. Fue lineal durante todo el rango de concentraciones analizadas. Se pudo demostrar que existía una relación significativa entre las áreas de los picos obtenidos en los cromatogramas y las concentraciones de las disoluciones estándar, con un coeficiente de determinación $r^2=0,99977$. Así mismo, la ordenada en el origen de la regresión no era significativa, dado que el intervalo de confianza del 95% del valor estimado incluía el cero.

En cuanto a los resultados sobre la exactitud (Tabla 3.7), se puede observar que cuanto menor es la concentración, los errores relativos se incrementan, lo que indica una pérdida de exactitud en el caso de concentraciones muy bajas. No obstante, los errores relativos no superaron nunca el valor del 10% por lo que se consideró que la exactitud del método analítico es aceptable.

Así mismo, el método analítico desarrollado presenta una precisión adecuada, ya que en ningún caso el coeficiente de variación de la concentración de analito estimada tras la inyección en el cromatógrafo de distintas muestras superó el valor de 10%.

También se puede afirmar que el método analítico desarrollado es específico ya que no fueron observadas interferencias en los cromatogramas en el tiempo de retención correspondiente al bronidox. En las soluciones acuosas, el cromatograma presentaba un pequeño pico a un tiempo de retención de 5 minutos, que representaba la señal del tampón HEPES utilizado en las disoluciones. Sin embargo, este pico cromatográfico no interfería en el pico cromatográfico del bronidox. Por otro lado, las muestras obtenidas en los estudios de absorción, presentaban en sus cromatogramas una pequeña señal a tiempos de 3, 4 y 5 minutos, pero en ningún momento estos picos se solapaban con el pico cromatográfico del bronidox.

Así pues, todos los ensayos realizados para validar el método analítico para la detección y cuantificación de bronidox proporcionaron resultados que permitieron demostrar que el método analítico desarrollado es PRECISO, EXACTO y SENSIBLE; por consiguiente, es útil para cuantificar la concentración de bronidox en muestras procedentes de los estudios de absorción transdérmica *in vitro*.

CAPÍTULO 4

- 4 ESTUDIOS DE ABSORCIÓN TRANSDÉRMICA *IN VITRO* DEL BRONIDOX, BRONOPOL Y FORMALDEHÍDO (directamente aplicado y desde BRONOPOL y DMDM HIDANTOÍNA).**

4.1 INTRODUCCIÓN

Prolongar la estabilidad de los productos cosméticos es un reto para la industria cosmética y para ello se requiere incorporar a las formulaciones distintos agentes conservantes. Entre los factores que condicionan la estabilidad de los preparados cosméticos resaltan el crecimiento de microorganismos y la exposición al oxígeno atmosférico. Por consiguiente, para prevenir estos efectos se pueden usar dos grupos de conservantes: las sustancias antimicrobianas, que actúan directamente sobre los microorganismos impidiendo o reduciendo su crecimiento y las sustancias antioxidantes, que son capaces de reducir los fenómenos de oxidación y la formación de radicales libres. A continuación, se detallan las características antimicrobianas y antioxidantes más importantes de los conservantes estudiados en esta Memoria.

4.1.1 Bronidox

El bronidox (5-bromo-5-nitro-1,3-dioxano), posee un amplio espectro de actuación antimicrobiana, muy similar a la del bronopol (cuya estructura es también muy similar), pero es más estable en medio básico (*Ghannoum, et al., 1986*).

Actúa como agente oxidante, produciendo la oxidación de la proteína esencial tiol de los microorganismos, dando lugar a la inhibición enzimática y a la posterior inhibición del crecimiento microbiano. La oxidación de estos grupos tioles a disulfuros se produce en enzimas esenciales y al

inhibirlos se detiene el metabolismo de los microorganismos. (*Final Report on the Safety Assessment of 5-Bromo-5-Nitro-1,3-Dioxane, 1990*).

En la Tabla 4.1 se muestran valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) del bronidox frente a diferentes tipos de microorganismos (*Ghannoum, et al., 1986*). El bronidox muestra una actividad similar frente a todas las bacterias a excepción de la *Pseudomonas Aeruginosa* que requiere del doble de la concentración de bronidox para su inhibición. En levaduras las concentraciones necesarias para la inhibición son similares a las requeridas para las bacterias; sin embargo, para inhibir el crecimiento de hongos, la concentración de bronidox necesaria es unas 8 veces superior.

Bacterias	CMI, µg/mL	Levaduras	CMI, µg/mL
Bacillus cereus	15,6	Candida albicans	62,5
Bacillus licheniformis	31,2	Saccharomyces cerevisiae	62,5
Bacillus subtilis	31,2	Hongos	CMI, µg/mL
Escherichia coli	31,2	Aspergillus niger	250
Mycobacterium phlei	31,2		
Proteus vulgaris	31,2		
Pseudomonas aeruginosa	62,5		
Salmonella abony	31,2		
Salmonella tyhimurium	31,2		
Staphylococcus aureus	31,2		
Streptococcus faecalis	31,2		
Streptococcus pyogenes	31,2		

Tabla 4.1. Concentración mínima inhibitoria del bronidox para diferentes tipos de microorganismos (*Ghannoum, et al., 1986*).

Según el Reglamento (CE) Nº 1223/2009 del parlamento Europeo y del Consejo del 30 de noviembre de 2009 sobre productos cosméticos (*Reglamento Europeo, 2009*), el bronidox pertenece a la lista del Anexo V del Reglamento de la UE de Productos Cosmético. Las sustancias que pertenecen a la lista , son los conservantes usados en productos cosméticos, que deben ser controlados. El bronidox es un conservante restringido, es decir, tiene limitado su uso. La concentración máxima que puede ser utilizada en las preparaciones es de 0,1%. Además, solo puede ser utilizado en sustancias de enjuague para la limpieza de la piel y el cabello, como son champús y geles de baño. Otra condición es que en su presencia se ha de evitar la posible formación de nitrosaminas. (*Reglamento Europeo, 2009*). El uso combinado de antioxidantes y se sales altamente nucleofílicas, es capaz de reducir la formación de dichas nitrosaminas en los productos cosméticos en más de un 90% (*Challis, et al.,1995*). La bibliografía consultada no ha aportado resultados capaces de determinar el grado de absorción de esta sustancia, que justifiquen la utilización de la concentración límite indicada.

Las propiedades físico-químicas básicas del bronidox se recogen en la Tabla 4.2:


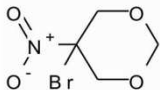
FÓRMULA EMPÍRICA Y ESTRUCTURA	$C_4H_6BrNO_4$  
NÚMERO CAS	30007-47-7
MASA MOLECULAR	212 gr/mol
APARIENCIA	Polvo blanco cristalino.
PUNTO DE FUSIÓN	58-60 °C
ESTABILIDAD	Es estable a la luz y a temperaturas no superiores a 50°C. Sin embargo, el compuesto es inestable a un pH inferior a 5, siendo estable en una franja de pH de 5-9.
COEFICIENTE DE REPARTO	LogP 0,3
SOLUBILIDAD	La solubilidad del bronidox en agua es escasa a temperatura ambiente, 0,46% a 20°C y aumenta hasta el 70% a 50°C. En cambio, a 20°C, la solubilidad en etanol es superior al 25% y superior al 50% en cloroformo.
PRODUCTOS DE DESCOMPOSICIÓN	formaldehído, 2-hidroximetil-2-nitro-1,3-propanodiol, y bromonitroetanol

Tabla 4.2. Estructura y propiedades físico-químicas del bronidox. (National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxane, CID=1807, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5-Bromo-5-nitro-1_3-dioxane (consultado Feb. 4, 2020)).

4.1.2 Formaldehído

El formaldehído (HCOH) es el aldehído más sencillo conocido y encabeza la serie de aldehídos de tipo alifático. Pertenece a la familia de compuestos volátiles orgánicos. Se conoce también como metanal y recibe nombres comerciales o sinónimos como oximetileno, oxometano, formol,

óxido de metileno, aldehído metílico, aldehído fórmico, formalina, hidrato de formil, o fanoforn. Es un compuesto químico muy inflamable y bastante volátil. El formol es el nombre que recibe el formaldehído disuelto en agua en un porcentaje aproximado al 40%.

El formaldehído fue sintetizado por primera vez por un científico ruso, Butlerov, en el año 1859, al intentar preparar otros compuestos (*Butlerov, 1859*).

El formaldehído se encuentra en estado gaseoso en condiciones normales, por lo que su manejo no es sencillo y su comercialización es en solución acuosa a nivel comercial. Debido a que el formaldehído es una sustancia química muy reactiva, puede formar polímeros de tipo insoluble de forma relativamente sencilla, dando lugar a soluciones acuosas de aspecto viscoso y translúcido. Para evitar este proceso, a la solución se le deben añadir sustancias estabilizadoras. Como el formaldehído en solución tiende a precipitar, las soluciones, con concentraciones superiores al 30% de aldehído, se deben conservar en caliente o añadir alcoholes, como el metanol, para aumentar su estabilidad. No obstante, la formación de hemicetales aumenta su inflamabilidad (*Pérez y Becerra, 2017*).

Las propiedades físico-químicas básicas del formaldehído se recogen en la Tabla 4.3:

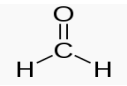
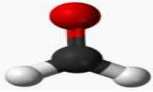
FÓRMULA EMPÍRICA Y ESTRUCTURA	CH_2O  
NÚMERO CAS	50-00-1
APARIENCIA	En condiciones normales se encuentra en estado gaseoso. Es un gas incoloro con olor acre muy molesto.
DENSIDAD	0,8153 g/cm ³ (líquido a -20 °C)
DENSIDAD RELATIVA DEL GAS	1,04
MASA MOLECULAR RELATIVA	30,03 g
PUNTO DE FUSIÓN	-92,0-118,0 °C
PUNTO DE EBULLICIÓN	-19,2 °C (sustancia pura)
PUNTO DE INFLAMACIÓN	32-61 °C (solución acuosa)
Tª DE IGNICIÓN	300- 430 °C (solución acuosa)
LÍMITES DE EXPLOSIVIDAD	7-73% V
COEFICIENTE DE REPARTO	LogP 1,2
SOLUBILIDAD	En agua se disuelve por completo, es fácilmente soluble en éter, alcohol y en otros solventes polares.

Tabla 4.3. Estructura y propiedades físico-químicas del formaldehído (National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Formaldehyde, CID=712, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Formaldehyde> (consultado Feb. 4, 2020)).

Presenta muchas y muy variadas aplicaciones. El formaldehído es considerado desde hace muchas décadas como un buen desinfectante y se ha usado para inactivar hongos, bacterias, mohos y levaduras (Trujillo y Lindell, 1973). A concentraciones muy altas es un potente agente biocida y por eso es usado para la inactivación selectiva de esporas de *Bacillus* en suspensiones líquidas y en suelos (Manchee, et al., 1994). Además, los primeros estudios de Neely, W.B (Neely, 1963) demostraron que el formaldehído tiene, a concentraciones subletales, actividad bacteriostática,

por lo que es utilizado para la desinfección y esterilización en industria (*Selvaraju, et al., 2005*).

Por su acción fungicida o bactericida forma parte de la composición de formulaciones cosméticas y productos farmacéuticos. El formaldehído se ha empleado en formulaciones cosméticas como conservante durante muchos años (*Álvarez-Rivera, et al., 2018; Polati, et al., 2007*). De acuerdo con el Reglamento 1223/2009 de la UE (Reglamento Europeo, 2009), pertenece al anexo V, su contenido máximo permitido es del 0,1% para productos orales y del 0,2% para el resto. Además, todos los productos acabados que contengan formaldehído o sustancias que figuran en esta lista y liberen formaldehído deberán consignar en la etiqueta la mención «contiene formaldehído» siempre que la concentración de formaldehído en el producto acabado supere el 0,05%.

En combinación con metanol y soluciones amortiguadoras se emplea como fijador y conservante tisular. Este uso del formaldehído está relacionado con la toxicidad que presenta para humanos y animales ya que destruye las funciones de las proteínas, membranas y ácidos nucleicos (*Heck, et al., 1990*).

Además de los usos indicados, en la actualidad es muy utilizado para la fabricación de muchos productos de la química industrial. Por todo ello, su fabricación es superior a 10 millones de toneladas al año, y de estas, 3 millones de toneladas son producidas en Europa. El formaldehído alcanza la biosfera y se considera un contaminante ubicuo (*Fernández, et al., 1995; Uotilay Koivusalo, 1989*). El formaldehído presente en el ambiente se

origina además por la combustión de combustibles fósiles, cigarrillos o madera y también a través de vías biológicas, en las degradaciones de compuestos (*Orita, et al., 2006*).

El formaldehído se utiliza en muchos productos de limpieza y en gran variedad de productos con aplicación industrial, como pinturas, adhesivos, lacas, etc. Es muy importante conocer que, además de los productos en los que el formaldehído es añadido de forma específica como conservante, pueden existir otras "fuentes ocultas" (*Flyvholm, 1997*), donde el formaldehído es considerado como un contaminante. Estas fuentes ocultas pueden ser:

1. El formaldehído utilizado para la conservación de la materia prima usada para preparar el producto.

2. El formaldehído utilizado para esterilizar recipientes donde se almacena o prepara un producto.

3. El formaldehído liberado a partir de las resinas de formaldehído que se encuentran formando parte de los tubos que contienen cosméticos o productos farmacéuticos (*Tegner y Fregert, 1973*).

4. El formaldehído formado *in situ* como consecuencia de la degradación de algunos componentes que contiene el producto (*Bergh, et al., 1998*).

En un estudio realizado en Suecia, se pudo comprobar que 6 de los 73 medicamentos de uso tópico con corticoides comercializados poseían cierto porcentaje de formaldehído (*Goon, et al., 2003*).

Es importante remarcar que el formaldehído es considerado un factor de riesgo laboral de tipo químico y causa graves síntomas en personas que se encuentran expuestas a concentraciones muy elevadas (*Alexandersson, et al., 1982; Marsh, 1982; Dossing y Olsen, 1982*).

El formaldehído entra en el organismo por inhalación, al ingerirlo o por contacto con la piel. Se absorbe muy rápidamente a través de la mucosa nasal y de la parte superior de las vías respiratorias. También se absorbe muy rápido cuando se ingiere, pero, en cambio, solamente se absorben a través de la piel cantidades muy pequeñas (*ToxFAQs, A. S. T. D. R. (1999)*). Los efectos más habituales de la exposición al formaldehído son irritación de garganta, irritación ocular, vómitos, edema pulmonar, vértigo, dolor abdominal, lesión renal, diarrea, neumonía secundaria y en casos muy graves acidosis metabólica o colapso cardiovascular. La Agencia Internacional para la Investigación del cáncer (IARC) lo clasificó en 2004 como carcinógeno humano (Grupo 1)(IARC, 2006). La Comisión Europea lo clasificó en junio de 2014 como un carcinógeno grupo 1B y mutágeno grupo 2 en la ordenanza UE605 / 2014. La categoría 1B establece que el efecto cancerígeno se ha demostrado en ensayos con animales y que es probable en humanos.

4.1.3 Sustancias liberadoras de formaldehído: Bronopol y DMDM hidantoína.

Ya se ha comentado que el formaldehído es un buen conservante, que se encuentra presente en gran cantidad de productos. Sin embargo, su uso en productos de higiene y en cosméticos es limitado debido a su toxicidad (*Scherman, et al., 2008*) y se utilizan en su lugar agentes con capacidad para liberar formaldehído de forma lenta y progresiva en las condiciones de uso normales. Estas sustancias habitualmente se utilizan asociadas a otros conservantes, como propilparabeno y metilparabeno, con el objetivo de incrementar la actividad antifúngica.

Los agentes liberadores de formaldehído se han definido como sustancias capaces de liberar formaldehído durante su descomposición, o bien como sustancias sintetizadas a partir de formaldehído y que pueden contener residuos de formaldehído libre. Aproximadamente se han descrito unas 40 sustancias como agentes liberadores de formaldehído. Los liberadores de formaldehído se dividen en 2 subgrupos: los que liberan formaldehído por descomposición y los sintetizados a partir de formaldehído. Entre los agentes liberadores de formaldehído por descomposición se encuentra el **bronopol**, **DMDM hidantoína**, quaternium-15, imidazolidinil urea, y diazolidinil urea, que son las sustancias utilizadas como conservantes principalmente en productos cosméticos. Todas estas sustancias tienen la capacidad de liberar cantidades pequeñas de formaldehído de forma lenta, de manera que, cuando se agota el formaldehído en el producto, el liberador aporta más

cantidad y así, la cantidad de formaldehído existente en el producto se mantiene baja, pero en una proporción suficiente como para prevenir el crecimiento de microorganismos. A pesar de que la capacidad biocida de estos liberadores se debe en gran medida a la liberación de formaldehído, muchos de ellos tienen también capacidad antimicrobiana por sí mismos, independiente de la liberación de formaldehído (*Sasseville, 2004*).

La mayoría de los liberadores de formaldehído que se encuentran presentes en cosméticos a las concentraciones permitidas en Europa, son capaces de liberar cantidades de formaldehído superiores a 200 p.p.m. (*Engelhardt y Klinkner, 1985; Rosen y McFarland, 1984*). Sin embargo, no todos los agentes liberadores liberan la misma cantidad de formaldehído. Según un estudio realizado con algunos agentes liberadores (*Rosen y McFarland, 1984*), el orden de liberación, de menor a mayor cantidad de formaldehído liberado fue imidazolidinil urea < DMDM hidantoína < diazolidinil urea < quaternium-15.

Para conocer la magnitud en la que se libera el formaldehído a partir de estas sustancias es muy importante conocer las condiciones de pH y de temperatura a la que se realizan los ensayos, ya que ambos factores también influyen notablemente en la liberación de esta sustancia. DMDM hidantoína, imidazolidinil urea y diazolidinil urea, liberan mayor cantidad de formaldehído cuando se encuentran a pH alcalino (*Emeis, et al., 2007*). Además, a mayor temperatura, mayor es la cantidad de formaldehído liberado, y cuanto mayor es el tiempo de almacenamiento, mayor es la cantidad de formaldehído presente. De la misma forma, la presencia en la

formulación de otros ingredientes también puede modificar la cantidad de formaldehído que se libera.

A continuación, se describen las características de dos de las sustancias liberadoras de formaldehído más utilizadas en la industria cosmética y que han sido objeto de estudio en esta tesis: el bronopol y la DMDM hidantoína.

Bronopol

El 2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol es un compuesto químico antimicrobiano muy potente, especialmente contra especies gram negativas, sintetizado por The Boots Company PLC, Nottingham, Inglaterra a inicios de los años 1960 y una de sus primeras aplicaciones fue como conservante de medicamentos y productos cosméticos, debido a su baja toxicidad en mamíferos. Pasó a utilizarse con frecuencia en ambientes industriales y se disparó su producción a nivel mundial, llegando a producirse decenas de toneladas a finales de los años 70, que es una cantidad muy elevada si se tiene en cuenta que la concentración eficaz del bronopol es del 0,0025%.

Las propiedades físico-químicas básicas del bronopol se recogen en la Tabla 4.4:

FÓRMULA EMPÍRICA Y ESTRUCTURA	CH_2O
NÚMERO CAS	52-51-7
APARIENCIA	Es un polvo cristalino de color blanco o amarillo pálido, dependiendo de su pureza, ya que esta coloración es debida a la quelación del hierro durante su fabricación. Es inodoro y ligeramente higroscópico.
DENSIDAD	1,1 g/cm ³ (líquido a -20 °C)
MASA MOLECULAR RELATIVA	199,99 g/mol
PUNTO DE FUSIÓN	131,5 °C
PUNTO DE EBULLICIÓN	151 °C (sustancia pura)
PUNTO DE INFLAMACIÓN	32-61 °C (solución acuosa)
Tª DE DESCOMPOSICIÓN	140 °C (produciendo humos tóxicos y corrosivos, incluyendo bromuro de hidrógeno y óxidos de nitrógeno).
ESTABILIDAD	Estable bajo condiciones normales de almacenamiento, pero inestable en recipientes de aluminio. Es estable a temperatura ambiente, alta temperatura y bajo la luz solar.
COEFICIENTE DE REPARTO	LogP -0,6
SOLUBILIDAD	0,28 g/L a Tª ambiente en agua, 0,89 g/L en metanol, 0,56 g/L en etanol

Tabla 4.4. Estructura y propiedades físico-químicas del bronopol (National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Bronopol, CID=2450, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Bronopol> (consultado Feb. 4, 2020)).

Hoy en día, el bronopol es utilizado como agente conservante en productos de consumo y en aplicaciones industriales para tratar los sistemas de agua industrial. Pero desde finales de los años 80 el uso de bronopol en productos cosméticos ha descendido debido al gran potencial que presenta este compuesto para formar nitrosaminas. Gran cantidad de nitrosaminas son carcinógenas y por tanto deben ser evitadas.

Las nitrosaminas se forman de una manera relativamente fácil a partir de amidas y aminas secundarias en presencia de iones nitrito, y aunque el bronopol no es un potente agente nitrosante, a altas temperaturas o en solución alcalina, puede liberar nitritos y formaldehído y estos reaccionar con alguna amida o amina secundaria existente en el producto cosmético y producir niveles significativos de nitrosaminas.

Existen datos del metabolismo del bronopol obtenidos a partir de cuatro estudios independientes realizados con ratas Sprague-Dawley macho y hembra. En estos estudios, se llegó a la conclusión de que el bronopol administrado por vía oral se absorbe rápidamente y se excreta también de forma muy rápida en las ratas de ambos sexos, siendo la orina la principal vía de excreción. Además, el 40% de la dosis de bronopol marcado radioactivamente administrado por vía tópica, se absorbió a través de piel de la rata en un periodo aproximado de 24 horas. De la radioactividad aplicada, aproximadamente el 19% se recuperó excretada en orina, heces y aire espirado, lo que sugiere que la piel de rata es bastante permeable al bronopol (*Buttar y Downie, 1980*).

El bronopol posee un amplio espectro antimicrobiano (*Saito y Onoda, 1974*) y ha sido muy utilizado en concentraciones de hasta un 0,1% como conservante en productos farmacéuticos y cosméticos (*Croshaw, et al., 1964; Storrs y Bell, 1983*). Todos los estudios sobre el mecanismo de acción de bronopol concluyen que la actividad antibacteriana de este se debe a la interacción con tioles esenciales intracelulares (*Bryce, et al., 1978; Stretton y Manson, 1973*) y se cree que esta interacción conduce a la oxidación de

estos tioles, a través de un anión radical intermedio (*Russell y Danen, 1968*).

En condiciones aeróbicas, el bronopol oxida catalíticamente los materiales que contienen tiol, como la cisteína, utilizando el oxígeno atmosférico como oxidante final. De esta reacción se originan subproductos como el superóxido y el peróxido, que son directamente responsables de la actividad bactericida del compuesto y de la reducida tasa de crecimiento después del período bacteriostático. La oxidación de los tioles conduce a la creación de un estado anóxico y es bajo estas condiciones anaeróbicas donde se produce la reacción más lenta con los tioles y que favorece el consumo directo del bronopol, lo que conduce a su eliminación y a la reanudación del crecimiento (*Russell y Danen, 1968*).

DMDM hidantoína

La 1,3-dimetol-5,5-dimetil hidantoína (DMDM hidantoína) es miembro de un grupo de productos químicos llamados hidroximetil dimetil hidantoínas, que son liberadores de formaldehído, usados como agentes antimicrobianos y conservantes en cosméticos, limpiadores, adhesivos, tintas, ambientadores, suavizantes, fluidos hidráulicos, detergentes líquidos, fluidos de corte para trabajos en metal, pinturas, detergentes en polvo, selladores, jabones, etc. Se describe como un agente antimicrobiano de amplio espectro, eficaz contra hongos, levaduras y bacterias gram positivas y gram negativas (*Uhr, et al., 2017*). La DMDM hidantoína en agua se descompone para formar 5,5-dimetil hidantoína y formaldehído. El contacto directo con esta sustancia puede causar daño ocular, irritación de

la piel y reacciones alérgicas (Liebert, 1988). No se han producido abortos ni se han encontrado malformaciones en la descendencia de animales de laboratorio gestantes después de que recibieran dosis de DMDM hidantoína por vía oral. El programa IRIS de la EPA de EEUU, La Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer o el décimo tercer Informe del Programa Nacional de Toxicología de los EEUU (2014), no ha evaluado la posibilidad de que la DMDM hidantoína produzca cáncer en humanos (<http://www.epa.gov/iri>).

Las propiedades físico-químicas básicas de la DMDM hidantoína se recogen en la Tabla 4.5:

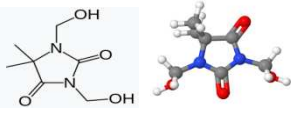
FÓRMULA EMPÍRICA Y ESTRUCTURA	$C_7H_{12}N_2O_4$ 
NÚMERO CAS	6440-58-0
APARIENCIA	Líquido
DENSIDAD	0,4 g/cm ³ (a 21 °C)
MASA MOLECULAR RELATIVA	188,18 g/mol
PUNTO DE FUSIÓN	86-88 °C
PUNTO DE EBULLICIÓN	303,7 °C
T ^º DE DESCOMPOSICIÓN	198-200 °C
ESTABILIDAD	Estable bajo condiciones normales de almacenamiento. Es estable a temperatura ambiente, alta temperatura y bajo la luz solar.
COEFICIENTE DE REPARTO	LogP -0,2
SOLUBILIDAD	773 g/L en agua, 564 g/L en etanol

Tabla 4.5. Estructura y propiedades físico-químicas de la DMDM hidantoína (National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. CID=22947, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/DMDM-Hydantoin> (consultado Feb. 4, 2020)).

Dado que el bronidox, el formaldehído, el bronopol y la DMDM hidantoína son sustancias conservantes de uso restringido en preparaciones cosméticas de las cuales se desconoce la cantidad que puede alcanzar la circulación sistémica cuando se utilizan en las condiciones que determina la normativa vigente, el objetivo de este trabajo de Tesis Doctoral es determinar si las tres primeras de estas sustancias son capaces de atravesar la barrera cutánea y conocer la posibilidad de que accedan al torrente sanguíneo cuando se aplican sobre la piel como consecuencia de su empleo en diversos tipos de formulaciones. Para ello, se han realizado estudios de absorción transdérmica *in vitro* de bronidox, formaldehído y bronopol a partir de tres formulaciones tipo de uso en cosmética, gel hidrófilo, solución acuosa (como ejemplos de formulaciones que se emplean en higiene corporal) y emulsión O/A (como ejemplo de formulación de carácter ligeramente oclusivo).

Además, dado que el poder antimicrobiano del bronopol radica tanto en el poder del compuesto en sí mismo, como en el poder del formaldehído que libera y que el poder antimicrobiano de la DMDM hidantoína radica a su vez en el poder del formaldehído liberado, se han realizado ensayos en los que se ha valorado el formaldehído liberado a partir del empleo de estos compuestos.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Sustancias y formulaciones ensayadas

A continuación, se indican las características de las sustancias utilizadas. La procedencia de todas ellas es Sigma Aldrich Química S.A (Tres Cantos, Madrid, España).

- **BRONIDOX**. De pureza superior al 99% (m/m).
- **FORMALDEHÍDO**. Solución al 33,5% (p/V) en agua, estabilizada con metanol (10-15%).
- **BRONOPOL**. De pureza superior al 98%.
- **DMDM hidantoína**. De pureza superior al 97%.

Se ensayaron tres formulaciones (solución acuosa, emulsión O/A e hidrogel) para cada uno de los conservantes (Bronidox 0,2%, formaldehído 9%, Bronopol 4%, DMDM hidantoína 2%). La composición de las formulaciones ensayadas se resume en la Tabla 4.6:

SOLUCIÓN ACUOSA	EMULSIÓN	HIDROGEL
Bronidox0,05g Solución Hepes.....25mL	Bronidox0,03g NeoPcl®.....3g Glicerina.....0,7g Agua.....c.s.p. 15g	Bronidox0,02g Carmelosa.....0,2g Glicerina.....1g Agua.....c.s.p. 10g
Solución al 33,5% de Formaldehído2,7mL Tampón fosfato.....c.s.p. 10mL	Solución al 33,5% de Formaldehído4,05mL NeoPcl®.....3g Glicerina.....0,7g Agua.....c.s.p. 15g	Solución al 33,5% de Formaldehído2,7mL Carmelosa.....0,2g Glicerina.....1g Agua.....c.s.p. 10g
Bronopol0,4g Solución Hepes.....10mL	Bronopol0,6 g NeoPcl®.....3g Glicerina.....0,7g Agua.....c.s.p. 15g	Bronopol0,4g Carmelosa.....0,2g Glicerina.....1g Agua.....c.s.p. 10g
DMDMhidantoína ..0,3mL Solución Hepes.....10mL	DMDMhidantoína ..0,3mL NeoPcl®.....2g Glicerina.....0,46g Agua.....c.s.p. 15g	DMDMhidantoína ..0,3mL Carmelosa.....0,2g Glicerina.....1g Agua.....c.s.p. 10g

Tabla 4.6. Formulaciones ensayadas para cada uno de los conservantes de estudio.

El **agua** utilizada fue agua desionizada (agua Millipore Quantum®). Tanto el **HEPES** (pureza $\geq 99,5\%$) como el **NaCl** (pureza $\geq 99\%$) utilizados para preparar la solución Hepes, fueron suministrados por Sigma-Aldrich S.A (Tres Cantos, Madrid, España). El **fosfato monopotásico** y **fosfato**

disódico utilizados para preparar la solución de tampón fosfato fueron suministrados por Panreac Química S.A (Barcelona, España).

El **Neo Pcl**[®] y la **glicerina** se obtuvieron de Guinama (La Pobla de Vallbona, Valencia). La **carmelosa** fue suministrada por Acofarma distribución S.A. (Terrassa, Barcelona).

En la Tabla 4.7 se detalla la composición cualitativa del Neo Pcl[®]

NEO Pcl [®]	Cera alba	Steareth-10
	Stearyl Heptanoate	Stearyl caprylate
	Cetearyl Octanoate	Isopropyl Myristate
	Cetyl Pamitate	Myristyl Alcohol
	Stearyl alcohol	Dimethicone
	Steareth-7	Paraffinum Liquidum

Tabla 4.7. Composición cualitativa del Neo Pcl[®].

4.2.2 Estabilidad de los conservantes

Como paso previo a la realización de los estudios de permeabilidad de los conservantes, se realizó el estudio de estabilidad del bronidox en solución acuosa de pH 5,5. Para el resto de compuestos ensayados la bibliografía consultada aportó los datos necesarios para conocer sus características de estabilidad (*Moore, et al.,1981; Kapupara, et al., 2016; Schan no, et al., 1980; Lv, et al., 2015*).

Para ello, se prepararon 25 ml de solución de bronidox a una concentración de 2000 mg/L. Esta disolución se fraccionó en cuatro alícuotas que fueron conservadas en diferentes condiciones atmosféricas, durante el tiempo establecido. A continuación, se detallan las condiciones de temperatura y tiempo de conservación de las cuatro alícuotas preparadas:

- Solución 1: temperatura comprendida entre 4 y 8°C durante 25 días.
- Solución 2: temperatura ambiente (25°C) durante 25 días.
- Solución 3: temperatura de 37°C durante 24 horas.
- Solución 4: temperatura de 70°C durante 24 horas.

Las soluciones 1 y 2 se analizaron los días 1, 2, 3, 22 y 25. Las soluciones 3 y 4 fueron analizadas a las 1, 2, 3, 4, 22 y 24 horas. La concentración de bronidox en cada una de las muestras se determinó por HPLC-UV utilizando el método analítico descrito en el capítulo III.

4.2.3 Estudios de absorción transdérmica

Los estudios de absorción transdérmica de los conservantes desde las formulaciones estudiadas se realizaron siguiendo las directrices de la guía OECD (*OECD, Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, 2004*).

Preparación de la piel

Por tener unas características muy parecidas a las de la piel humana, en los experimentos de absorción transdérmica se utilizó como membrana la piel de oreja de cerdo (Marro, et al., 2001, Meyer, et al., 1978, Schmook, et al., 2001; Sekkat, et al., 2004). Las orejas de cerdo utilizadas, fueron suministradas por el animalario de la Facultad de Medicina de la Universitat de València (Valencia, España). Para mantener homogeneidad en las condiciones del ensayo, se usaron solo orejas de cerdos blancos sin manchas y se usó la cara exterior de la oreja, ya que esta es una zona con poco vello. Estas orejas procedían de animales utilizados en otros proyectos de investigación autorizados, motivo por el que no fue necesario solicitar una nueva autorización al comité de experimentación animal y además no se tuvo que sacrificar animales para poder realizarlo, cumpliendo así con la normativa para ensayos cosméticos (*Commission Directive 90/207/EEC*), donde se propone reducir el número de animales necesarios.

Después del sacrificio del animal, se cortaron las orejas por la base y se sumergieron en un baño de agua destilada a temperatura ambiente. Cuando las orejas estuvieron limpias se procedió a la separación de la piel de la cara exterior del cartílago de la oreja (Figura 4.1) utilizando un bisturí y poniendo especial cuidado para conservar la integridad de la piel.

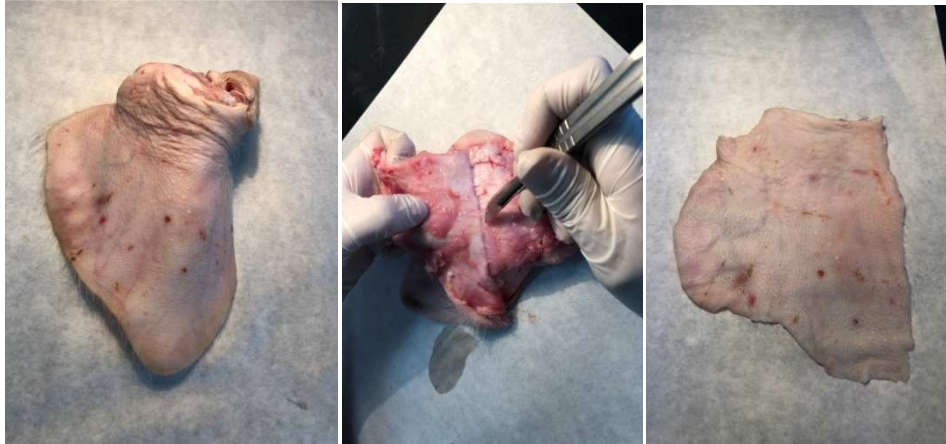


Figura 4.1. Fotografías ilustrativas del procesado de la oreja de cerdo para la obtención de las muestras de piel: oreja completa tras el sacrificio del animal (izquierda), separación con bisturí quirúrgico de la piel y el cartilago (centro) y piel separada completamente de la oreja (derecha).

A continuación, utilizando un dermatomo eléctrico (Braun AESCULAP GB231R) (Figura 4.2), se procedió a cortar la piel obtenida con un grosor preestablecido de 600 μm (Figura 4.2). Para ello la piel fue fijada sobre una placa de poliestireno, se seleccionó el espesor de corte en el dispositivo y se realizó el corte de la piel haciendo un deslizamiento horizontal paralelo a la superficie de la piel. De esta forma, se obtuvieron láminas de piel del grosor deseado, formadas por epidermis completa (estrato córneo y epidermis viva) y parte de la dermis.



Figura 4.2. Fotografía del dermatomo eléctrico (izquierda) y fotografía de las láminas de piel obtenidas tras el corte (derecha).

Estas láminas de piel fueron congeladas a una temperatura de -20°C en sobres de aluminio hasta su uso. El día del ensayo, se tomaron las porciones de piel necesarias y se esperó 10 minutos hasta su descongelación. Posteriormente fueron colocadas en una placa petri que contenía solución salina isotónica NaCl 0,9% y se esperó unos 30-60 minutos hasta alcanzar la correcta rehidratación de la piel (Franz, 1978).

Celdas de difusión

Los ensayos de permeabilidad fueron realizados con celdas de difusión estándar vertical (Figura 4.3), es decir, celdas tipo Franz (Franz, 1978). Se trata de un sistema cerrado y estático. Estas celdas han sido elaboradas con vidrio neutro, lo que garantiza la no cesión de partículas y evita la adsorción de solutos que podrían falsear los resultados. Están formadas por dos compartimentos cilíndricos:

- Compartimento dador: donde se coloca la formulación a estudiar. La formulación se dosifica por toda la superficie del compartimento y este es sellado con una película autosellante, flexible y moldeable (Parafilm M® Fisher Scientific, Madrid, España) para evitar evaporaciones.
- Compartimento receptor: contiene la solución receptora que acumulará los compuestos que atraviesen la piel. La solución receptora utilizada fue una “Solución amortiguadora de pH”. El líquido de este compartimento se encuentra siempre en constante agitación. El compartimento receptor dispone de un brazo lateral que permite realizarla toma de muestras y la reposición del volumen muestreado con la solución receptora. Tras el muestreo y posterior reposición, el compartimento receptor fue tapado para evitar evaporaciones.

La superficie de difusión de las celdas utilizadas es de 0,789 cm², y el compartimento receptor posee un volumen total de 6 mL.

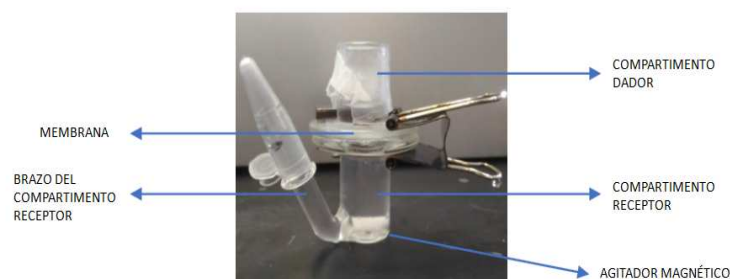


Figura 4.3. Celda de Franz utilizada para los ensayos de absorción transdérmica.

Las celdas fueron colocadas en un baño a 37°C y sobre una placa de agitación magnética (Figura 4.4) para simular las condiciones fisiológicas.



Figura 4.4. Baño de celdas con agitador magnético.

Soluciones amortiguadoras de pH

En los ensayos con bronidox, bronopol y DMDM hidantoína se utilizó como solución amortiguadora una solución Hepes (apartado 3.2.2. del Capítulo 3).

La solución amortiguadora utilizada en el ensayo de absorción transdérmica del formaldehído fue una solución de tampón fosfato. Para su preparación, se mezclaron 1,92 mL de solución de fosfato monopotásico (0,8 g/100 ml) con 8,08 mL de solución de fosfato disódico (0,94 g/100 mL), se adicionaron 9,20 g de cloruro sódico y se completó hasta 1000ml con agua bidestilada.

El fosfato monopotásico y el fosfato disódico fueron suministrados por Panreac Química S.A (Barcelona, España), el cloruro sódico por

Scharlab S.L (Barcelona, España) y el agua desionizada se obtuvo en el laboratorio mediante el sistema de purificación Mili-Q (Molsheim, Francia).

Diseño de los ensayos

Tras hidratarlas láminas de piel, 30 minutos en solución salina isotónica, se colocaron sobre el compartimento receptor de las celdas de Franz, con el estrato córneo orientado hacia arriba. Previamente, en el compartimento receptor, se situó un imán agitador. Posteriormente, se colocó el compartimento dador acoplándolo al receptor y se fijó con unas pinzas.

Previamente al inicio del ensayo se comprobó la integridad de todas las membranas de piel. Para ello, después de montar las celdas, se añadió una solución salina isotónica NaCl 0,9% en el compartimento dador, se esperó 5 minutos y a continuación se comprobó visualmente que no hubiera habido paso de líquido a través de la membrana, desde el compartimento dador al receptor. Posteriormente, se comprobó también la integridad de las membranas midiendo la resistencia eléctrica. El criterio de aceptación fue un valor de resistencia superior a 3 k Ω (Davies, et al., 2004).

Una vez montadas todas las celdas y comprobada la integridad de la piel, se colocaron en el baño, a una temperatura constante de 37°C y con una agitación continua a 400 rpm. Se rellenó cada compartimento receptor con solución tampón y se dosificó 1 mL de cada una de las formulaciones

en el compartimento dador (tiempo 0), se cubrieron los dos compartimentos y se puso en marcha el cronómetro. Posteriormente, a tiempos predeterminados, se fueron tomando las muestras del compartimento receptor con ayuda de una jeringa a través del brazo lateral del receptor. Se repuso el volumen muestreado con solución amortiguadora de pH. Este hecho, además de mantener el volumen de la solución receptora constante, permite, junto con la agitación continua de la misma, el mantenimiento de la condición “sink” o de sumidero en la fase receptora. Las muestras extraídas se colocaron en un *ependorf* adecuadamente rotulado. Una vez tomada la última muestra, se recogió del compartimento dador todo el volumen posible de las distintas formulaciones para realizar la posterior extracción y cuantificación del conservante. Por último, se desmontaron las celdas.

Para extraer los conservantes de la membrana utilizada se siguió el siguiente procedimiento. Cada porción de piel fue lavada con 3mL de metanol (MeOH) y posteriormente se dispuso en un tubo que contenía 3 mL de MeOH con el objetivo de realizar la extracción del conservante que hubiera quedado retenido en la piel, ya que el MeOH es un solvente que rompe las uniones intercelulares y por lo tanto, permite la extracción del conservante acumulado en el interior de las capas epiteliales (*Touitou, et al., 1998*). Los tubos que contenían la piel y el MeOH se colocaron en un agitador mecánico a 100 rpm durante 22 horas. Una vez transcurrido este tiempo, se tomó 1 mL de cada vial, se filtró a través de un filtro de jeringa PVDF 13 mm 0,45 μ m y se inyectó en el HPLC-UV para su cuantificación. El

agitador utilizado fue suministrado por OVAN (Suministros Grupo Esper, S.L), modelo I10-ACOP.E.

4.2.4 Métodos analíticos

El conservante que contenían las muestras obtenidas del compartimento dador, del compartimento receptor, del líquido de lavado y de la piel, fue cuantificado inmediatamente tras la obtención de las mismas utilizando los métodos analíticos correspondientes para cada analito.

Preparación de las muestras procedentes de la emulsión O/A

Para determinar la cantidad de conservante remanente en cada una de las emulsiones estudiadas y así disponer de los datos necesarios para realizar el correspondiente balance de masas al final de cada estudio de absorción se realizaron las microextracciones correspondientes de cada conservante como se indica a continuación (*Miralles, et al., 2016*). Se pesó aproximadamente 0,1 g de la emulsión correspondiente en un tubo de polipropileno con fondo cónico y se añadió 1 mL de n-hexano y 0,5 mL de etanol. Todo ello fue mezclado usando un agitador vortex (40 Hz) durante 10 segundos. Posteriormente se añadieron 0,5 mL de agua desionizada y se mezcló nuevamente con ayuda del agitador durante 10 segundos. La mezcla resultante, se centrifugó a 6000 rpm durante 5 min. Finalmente, una alícuota del extracto acuoso obtenido, (fase hidro-etanólica), se inyectó en el HPLC para su cuantificación.

El n-hexano fue suministrado por Leboriz, S.L.U. Pol. Industrial del Rebullón 36416 Mos - Pontevedra, España. El etanol se obtuvo de Sigma-Aldrich CO. (St. Louis, Missouri, EEUU). El agitador vortex usado fue el modelo Heidolph REAX top.

Valoración de los conservantes

Para la valoración cuantitativa del **bronidox** se utilizó el método analítico descrito en el apartado 3.2 del Capítulo 3.

La cuantificación del **formaldehído** procedente de todas las muestras analizadas, esto es, del compartimento dador, del compartimento receptor, del líquido de lavado y de la piel, se realizó utilizando se realizó utilizando el método general de colorimetría (*Commission Directive 90/207/EEC*) con una ligera adaptación que nos permitió ahorrar tiempo, obtenida del método validado de derivatización post-columna (*Miralles, et al., 2018*). Para este ensayo se utilizó un sistema de cromatografía líquida de alta resolución Agilent 1220 InfinityLC compuesto por desgasificador, bomba cuaternaria, inyector automático, horno de columna y detector UV/Vis. La columna utilizada fue una LiChrospher® 100 RP-18 (25 cm de longitud, 4 mm I.D., tamaño de partícula de 5 µm) de Merck (Darmstadt, Alemania). El reactor post-columna para derivatizar el formaldehído fue preparado en el laboratorio y consistió en un bobinado con tubo de PTFE (5 m x 0,3 mm) sumergido en un baño termostático de agua a 85°C. El reactivo de derivatización fue impulsado por una bomba de alta presión L-7100 Hitachi® (Tokio, Japón).

Se inyectaron 20 μL de los extractos acuosos estándar o de muestra en el sistema. La fase móvil consistió en una solución acuosa de dihidrógeno de sodio, fosfato dihidratado 6 mmol/L a pH 2, con un flujo de 1 ml/min. El eluyente era fusionado con una corriente de flujo del reactivo de derivatización propulsado por la bomba auxiliar a 1 ml/min. El reactivo de derivación contenía 6,25 % p/V de solución acuosa de acetato amonio, 0,5% V/V de pentano-2,4-diona y ácido acético al 0,75% V/V. La derivatización del formaldehído se producía en un reactor post-columna a 85°C y el producto formado, 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina, se detectó utilizando una longitud de onda de 407 nm.

El etanol, el acetonitrilo, la acetona ultrapura y el tolueno, fueron de riqueza superior al 99,5%. Para la fase móvil se utilizó dihidrogenofosfato de sodio de grado reactivo. Para la reacción de derivatización se utilizó acetilacetona de grado sintético(pentano-2,4-diona), ácido acético glacial extra puro y acetato amónico de grado reactivo. Todos estos reactivos fueron suministrados por Scharlab Chemie (Barcelona, España).

En el ensayo de absorción transdérmica del **bronopol** se cuantificó tanto el bronopol como el formaldehído que era liberado a partir del bronopol, ya que ambos presentan actividad antimicrobiana. Por último, en el ensayo de penetración transdérmica de las muestras que contenían **DMDM hidantoína** se cuantificó sólo el formaldehído liberado a partir de este conservante.

La determinación cuantitativa del **bronopol** se realizó utilizando el método analítico desarrollado y validado por *Miralles, et al., 2016*. En este

trabajo el volumen de los extractos acuosos inyectados en el HPLC (Perkin Elmer Flexar) fue de 20 μ l. La columna cromatográfica utilizada fue una Teknokroma Brisa "LC²" C18 5 μ m 15 x 0,46 y la fase móvil una solución de etanol y agua acidificada con ácido acético al 1% en proporciones volumétricas (13:87).

La cuantificación analítica del **formaldehído liberado a partir del bronopol y de la DMDM hidantoína**, se realizó utilizando el método general de colorimetría (*Commission Directive 90/207/EEC*). Para ello en un tubo de centrifuga, se mezclaron 1 mL de la muestra y 0,1 mL del reactivo derivatizante. El reactivo de derivación contenía 0,15 g/mL de solución acuosa de acetato amonio, 0,2% V/V de pentano-2,4-diona y ácido acético al 0,3% V/V. Las reacciones se llevaron a cabo introduciendo los tubos cerrados en un baño de agua a 60°C durante 30 minutos. Pasado este tiempo los tubos eran enfriados primero bajo el grifo y posteriormente sumergidos en un baño con agua fría para detener la reacción. Finalmente, se inyectaron 5 μ L de las muestras en el HPLC (Perkin Elmer Flexar). Se utilizó una columna cromatográfica Purospher RP-18e (125 x 4 mm, 5 μ m) y una fase móvil constituida por una mezcla de etanol y agua en proporciones volumétricas (40:60), el flujo de elución de la fase móvil fue de 0,5 mL/min y la longitud de onda seleccionada fue de 405 nm.

4.3 ANÁLISIS DE DATOS

Cálculo de la cantidad de conservante acumulada en el compartimento receptor

A partir de las valoraciones cromatográficas de las muestras experimentales obtenidas en los ensayos de difusión transdérmica, se obtuvieron los valores correspondientes a las áreas de los picos cromatográficos de cada conservante. Estas áreas, fueron interpoladas en la recta de calibrado correspondiente y se obtuvo la concentración de conservante en cada una de ellas. A continuación, se calcularon las cantidades de conservante acumuladas en el compartimento receptor para cada tiempo de toma de muestra (Ecuación 4.1) (OECD, 2004).

$$Q_{a_{tn}} = C_{tn} \cdot V_r + \sum_{t=1}^{t=n-1} C_t \cdot V_m \quad \text{Ec. 4.1}$$

En la que:

- **Q_{a_{tn}}** es la cantidad de conservante acumulada en el compartimento receptor al tiempo considerado.
- **C_{tn}** es la concentración de conservante analizada en la muestra correspondiente a ese tiempo.
- **V_r** es el volumen del compartimento receptor.
- $\sum_{t=1}^{t=n-1} C_t \cdot V_m$ es el sumatorio de las cantidades extraídas de las muestras anteriores a cada tiempo, donde **V_m** es el volumen de la muestra.

Cálculo de los parámetros de penetración transdérmica

Las cantidades acumuladas en el receptor “Q_{a_{tn}}” se normalizan dividiendo por la superficie de difusión “S”. Si la dependencia de “Q_{a_{tn}}/S”

frente al tiempo sigue una tendencia lineal, significa que se ha alcanzado el estado estacionario y que por tanto se puede calcular el flujo transdérmico del conservante (J), que corresponde a la pendiente de la recta (*Manabe, et al., 1996*).

Si se asume que la concentración en el compartimento dador (C_i) se mantiene constante durante todo el ensayo, a partir del valor del flujo (J), se puede determinar el valor de la constante de permeabilidad (K_p), como se muestra en la Ecuación 4.2 :

$$K_p = \frac{J}{c_i} \quad \text{Ec. 4.2}$$

El tiempo de latencia (t_0), es el tiempo que transcurre desde que se deposita la muestra sobre la piel hasta que se inicia la difusión del conservante a través de la misma. Este valor se corresponde con el punto de corte con el eje de abscisas de la recta de regresión de las cantidades acumuladas por unidad de superficie frente al tiempo (*OECD, 2004*).

Al finalizar del ensayo, se realizó un balance de masas para comprobar la correcta realización de los estudios de difusión. De acuerdo con la guía OECD (*OECD, 2004*) debe estar comprendido entre el 85-115% para cumplir los criterios de calidad establecidos.

Métodos estadísticos

El análisis estadístico se realizó con el programa Excel® 2013 (Microsoft Corporation) y el paquete estadístico IBM SPSS Statistics® v. 20.0.0. (IBM Corporation).

Con el objetivo de determinar el tipo de prueba estadística a utilizar (paramétrica o no paramétrica) se comprobó el cumplimiento de las condiciones de parametricidad de las variables evaluadas. Este supuesto implica el cumplimiento de que las variables sean cuantitativas continuas, cumplan la distribución normal y que exista homogeneidad de varianzas.

Para verificar la normalidad de las variables se utilizó la prueba de **Kolmogorow-Smirnov**, que se basa en comparar la distribución acumulada de los valores de la muestra con la distribución acumulada que se obtendría en el supuesto que siguiera exactamente una ley Normal de media μ y varianza σ^2 . Se asumió que la variable cuantitativa seguía una distribución normal cuando el resultado de la prueba Kolmogorow-Smirnov fue $p > 0,05$.

La homogeneidad de varianzas se verificó con la **prueba de Levene**. Se asumió que las varianzas fueron homogéneas cuando el resultado de la prueba de Levene fue $p > 0,05$.

Para la comparación de dos medias de variables independientes con distribución normal, se aplicó la prueba t de Student bilateral, con un nivel de confianza del 95%. Las diferencias entre medias se consideraron estadísticamente significativas cuando el resultado de la prueba fue $p \leq 0,05$.

El análisis ANOVA se empleó para comparar más de dos medias que proceden de muestras independientes que cumplen el supuesto de homocedasticidad. En todos los casos, se empleó el estadístico fijando un nivel de confianza del 95%.

En caso de que las variables vulneraran el supuesto de homocedasticidad, se debieron aplicar la prueba de U de Mann-Whitney, para la comparación de dos muestras independientes, o la prueba de Kruskal-Wallis, para la comparación de más de dos muestras independientes.

La evaluación de la calidad de los ajustados llevados a cabo (cinéticas de degradación y de difusión) se ha realizado a través del análisis de los siguientes parámetros:

El análisis ANOVA se ha empleado para evaluar la dependencia entre variables.

Coefficiente de correlación (r). Proporciona la concordancia entre los valores predichos y los observados. Cuanto más próximo sea el valor absoluto de r a la unidad, mayor será la fiabilidad del ajustado.

Error de estimación de parámetros de los ajustados (E.E.). Es un índice de fiabilidad del ajuste obtenido, ya que expresa la exactitud con la que se ha estimado el parámetro.

Para todas las pruebas estadísticas realizadas el nivel de significación empleado es de 0,05.

4.4 RESULTADOS

4.4.1 Estabilidad del bronidox

En la Tabla 4.8 se muestran las concentraciones de bronidox obtenidas para cada tiempo de muestreo tras mantener la solución acuosa de bronidox en las condiciones de temperatura de almacenamiento que se indican (4-8°C, Tª ambiente, 37°C y 70°C):

Temperatura °C	Concentración de bronidox (mg/L)				
	4-8	25-30		37	70
TIEMPO (DÍAS)			TIEMPO (Horas)		
1	2056,24	2020,56	1	1998,56	2009,56
2	1995,31	2005,54	2	1996,65	1996,65
3	2009,56	2015,24	3	1997,12	1997,12
22	2032,12	2010,56	4	1997,87	1922,98
23	2020,74	2014,56	22	1997,25	1661,25
25	1999,96	2000,33	23	1998,08	1591,08
			24	2001,01	1512,33

Tabla 4.8. Concentraciones de bronidox obtenidos a cada tiempo de toma de muestra tras la conservación de las soluciones a la temperatura indicada.

El análisis estadístico realizado (ANOVA) indica que en las soluciones conservadas entre 4 y 8°C, a Tª ambiente y a 37°C el bronidox es estable durante el tiempo de ensayo ($p > 0,05$). Sin embargo, el bronidox que contiene la solución expuesta una temperatura de 70°C se degrada.

4.4.2 Absorción transdérmica

En las siguientes secciones se muestran los resultados de absorción transdérmica de los conservantes desde las formulaciones estudiadas (apartado 4.2.1).

Bronidox

Las cantidades de bronidox acumuladas en compartimento receptor, expresadas por unidad de superficie (Q_a/S , mg/cm^2), obtenidas para cada tiempo de toma de muestra en los ensayos de absorción cutánea de bronidox realizados a partir de la solución acuosa y del hidrogel se muestran en las Figuras 4.5 y 4.6, respectivamente. Los ensayos de penetración cutánea de bronidox a partir de la emulsión O/A indican que no existe permeación del analito a través de ella, ya que con el método analítico utilizado no se detectaron cantidades del conservante en el compartimento receptor.

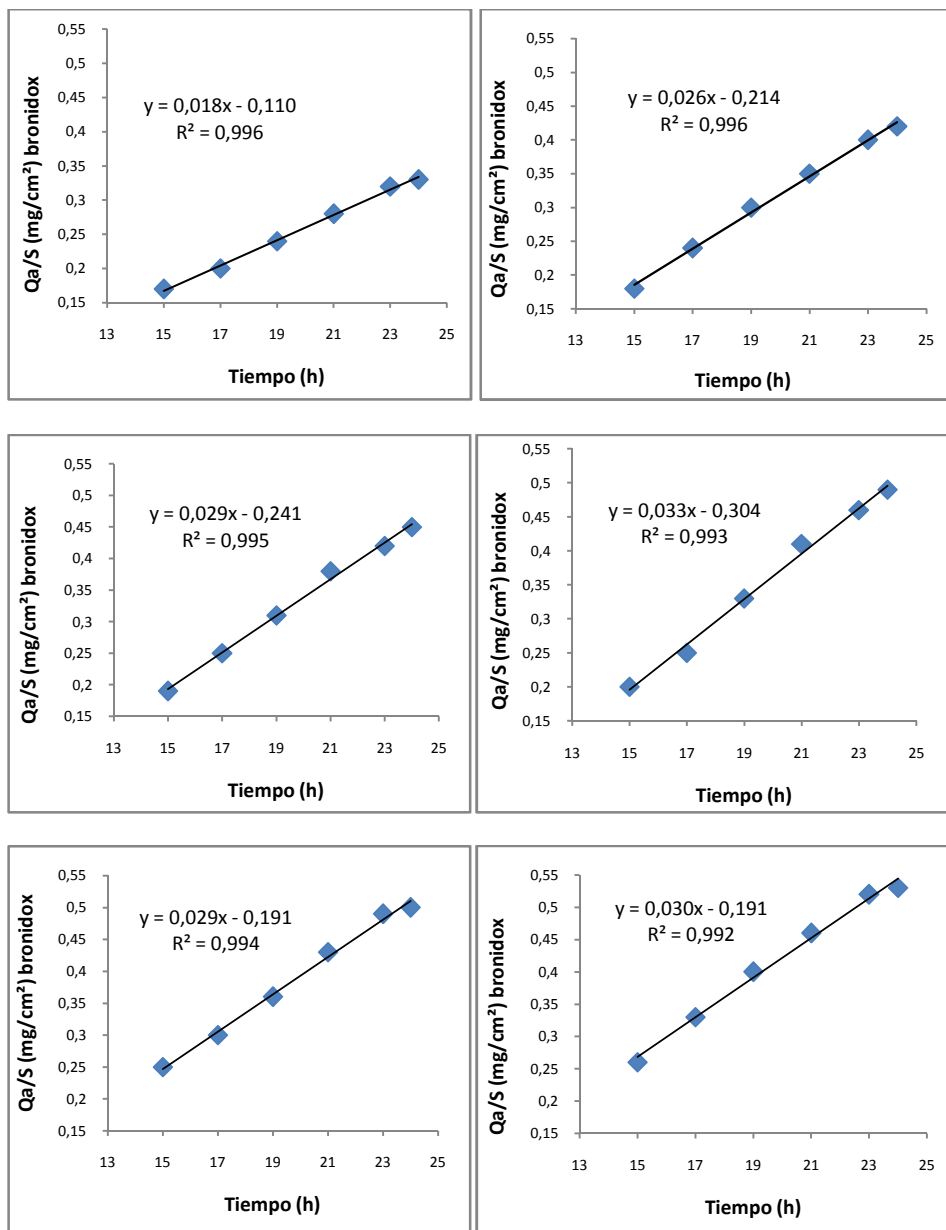


Figura 4.5. Cinética de difusión a través de la piel de **bronidox** a partir de la **solución acuosa**. Se representan en el eje de ordenadas las cantidades de bronidox acumuladas en el compartimento receptor por unidad de superficie, Q_a/S (mg/cm²) y en el eje de abscisas los tiempos de toma de muestra (h) (n=6).

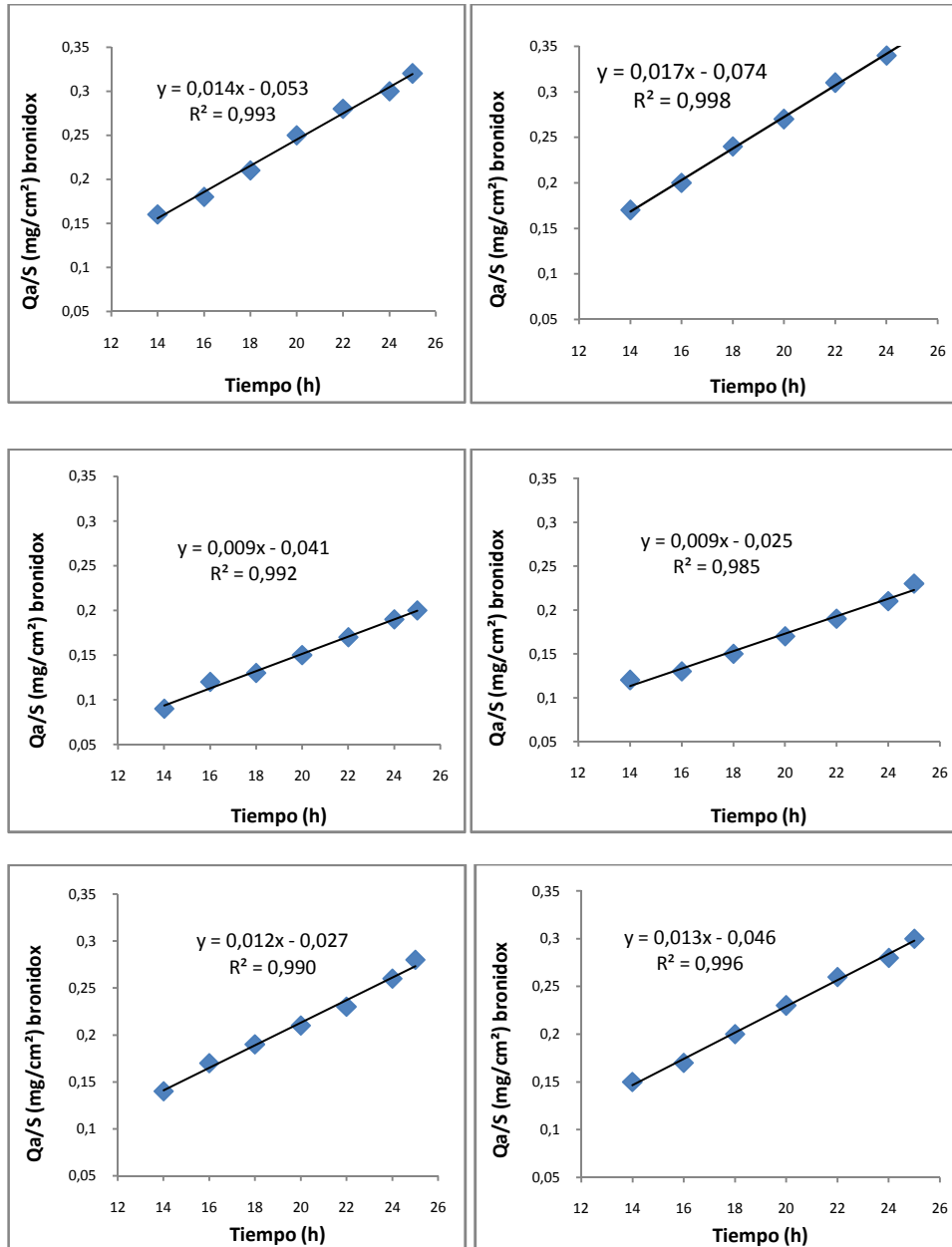


Figura 4.6. Cinética de difusión a través de la piel de **bronidox** a partir del **hidrogel**. Se representan en el eje de ordenadas las cantidades de bronidox acumuladas en el compartimento receptor por unidad de superficie, Qa/S (mg/cm^2) y en el eje de abscisas los tiempos de toma de muestra (h) ($n=6$).

En las Tablas 4.9 y 4.10 se muestran los valores medios y desviación estándar de las cantidades de bronidox acumuladas por unidad de superficie (Q_a , $\text{mg}/\text{cm}^2 \pm \sigma$) para cada tiempo de toma de muestra obtenidas en el estudio de penetración transdérmica de bronidox a partir de las formulaciones solución acuosa e hidrogel, respectivamente. En las tablas también se muestran los valores medios del tiempo de latencia para la difusión (t_0 , h) y del flujo transdérmico (J , $\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$). No se detectaron cantidades de bronidox en el compartimento receptor cuando se ensayó la emulsión O/A que contenía el conservante.

SOLUCIÓN ACUOSA BRONIDOX 0,2% (n=6)						
Cantidades acumuladas de bronidox en el compartimento receptor.						
Tiempo (h)	15	17	19	21	23	24
Qa ± σ (mg/cm²)	0,21±0,03	0,26±0,04	0,32±0,05	0,38±0,06	0,43±0,06	0,45±0,06
Parámetros de permeación						
J (Estado estacionario) ($\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$)	Kp (cm/h)		t_0 (h)			
27,50 ± 0,52	$1,38 \cdot 10^{-2} \pm 0,26 \cdot 10^{-2}$		7,47 ± 1,28			

*Tabla 4.9. Valores medios y desviación estándar (σ) de las cantidades de **bronidox** acumuladas en el compartimento receptor por unidad de superficie (Q_a/S) para cada tiempo, del flujo transdérmico (J), de la constante de permeabilidad (K_p) y del tiempo de latencia (t_0) obtenidos en el ensayo de absorción cutánea de bronidox a partir de la **solución acuosa**. n: número de ensayos realizados.*

HIDROGEL BRONIDOX 0,2% (n=6)							
Cantidades acumuladas de bronidox en el compartimento receptor.							
Tiempo (h)	14	16	18	20	22	24	25
Qa ± σ (mg/cm ²)	0,14±0,03	0,16±0,03	0,19±0,04	0,21±0,04	0,24±0,05	0,26±0,05	0,28±0,05
Parámetros de permeación							
J (Estado estacionario) (μg/(cm ² ·h))	Kp (cm/h)			t ₀ (h)			
12,33 ± 3,07	6,17·10 ⁻³ ± 1,54·10 ⁻³			3,55 ± 0,89			

*Tabla 4.10. Valores medios y desviación estándar (σ) de las cantidades de **bronidox** acumuladas en el compartimento receptor por unidad de superficie (Qa/S) para cada tiempo, del flujo transdérmico (J), de la constante de permeabilidad (Kp) y del tiempo de latencia (t₀) obtenidos en el ensayo de absorción cutánea de bronidox a partir del **hidrogel**. n: número de ensayos realizados.*

El análisis estadístico realizado indica que el flujo transdérmico de bronidox desde el hidrogel es estadísticamente diferente al obtenido desde la solución acuosa (p < 0,05 para la prueba t-Student).

En las Tablas 4.11- 4.13 se indica la cantidad de bronidox (mg) en el líquido de lavado (Q_l), en el compartimento dador (Q_d), en la piel (Q_p), en el compartimento receptor (Q_r), la cantidad inicial (Q₀) y el balance de masas final (BM) obtenida en el ensayo de penetración cutánea de bronidox a partir de la solución acuosa, emulsión O/A e hidrogel, respectivamente.

SOLUCIÓN ACUOSA BRONIDOX 0,2%						
CELDA	Q _i (mg)	Q _d (mg)	Q _p (mg)	Q _r (mg)	Q ₀ (mg)	BM (%)
1	0,028	1,626	-----	0,338	2	99,61
2	0,026	1,383	-----	0,581	2	99,49
3	0,036	1,542	-----	0,397	2	98,28
4	0,029	1,552	-----	0,404	2	99,28
5	0,028	1,414	-----	0,717	2	107,92
6	0,030	1,583	-----	0,284	2	94,85

Tabla 4.11. Cantidad de bronidox obtenida al finalizar el ensayo de penetración cutánea de **bronidox** a partir de la **disolución acuosa**. Q_i: cantidad de bronidox (mg) en el líquido de lavado, Q_d: en el compartimento dador, Q_p: en la piel, Q_r: en el compartimento receptor, Q₀: la cantidad inicial y BM el balance de masas final.

EMULSIÓN O/A BRONIDOX 0,2%						
CELDA	Q _i (mg)	Q _d (mg)	Q _p (mg)	Q _r (mg)	Q ₀ (mg)	BM (%)
1	-----	1,960	-----	-----	2	97,79
2	-----	2,132	-----	-----	2	106,37
3	-----	1,961	-----	-----	2	98,14
4	-----	2,052	-----	-----	2	102,69
5	-----	2,260	-----	-----	2	112,83
6	-----	2,221	-----	-----	2	110,95

Tabla 4.12. Cantidad de bronidox obtenida al finalizar el ensayo de penetración cutánea de **bronidox** a partir de la **emulsión O/A**. Q_i: cantidad de bronidox (mg) en el líquido de lavado, Q_d: en el compartimento dador, Q_p: en la piel, Q_r: en el compartimento receptor, Q₀: la cantidad inicial y BM el balance de masas final.

HIDROGEL BRONIDOX 0,2%						
CELDA	Q _i (mg)	Q _d (mg)	Q _p (mg)	Q _r (mg)	Q ₀ (mg)	BM (%)
1	0,026	1,774	-----	0,319	2	105,95
2	0,066	1,818	-----	0,362	2	112,29
3	0,032	1,793	-----	0,198	2	101,14
4	0,027	1,659	-----	0,226	2	95,62
5	0,026	1,821	-----	0,273	2	107,03
6	0,029	1,555	-----	0,292	2	93,79

Tabla 4.13. Cantidad de bronidox obtenida al finalizar el ensayo de penetración cutánea de **bronidox** a partir del **hidrogel**. Q_i: cantidad de bronidox (mg) en el líquido de lavado, Q_d: en el compartimento dador, Q_p: en la piel, Q_r: en el compartimento receptor, Q₀: la cantidad inicial y BM el balance de masas final.

Formaldehído

Las cantidades de formaldehído acumuladas en el compartimento receptor, expresadas por unidad de superficie (Q_a/S , mg/cm²), en función del tiempo de ensayo, en cada una de las celdas ensayadas, obtenidas en los ensayos de absorción transdérmica de formaldehído a partir de la solución acuosa, de la emulsión O/A y del hidrogel se muestran en las Figuras 4.7 - 4.9.

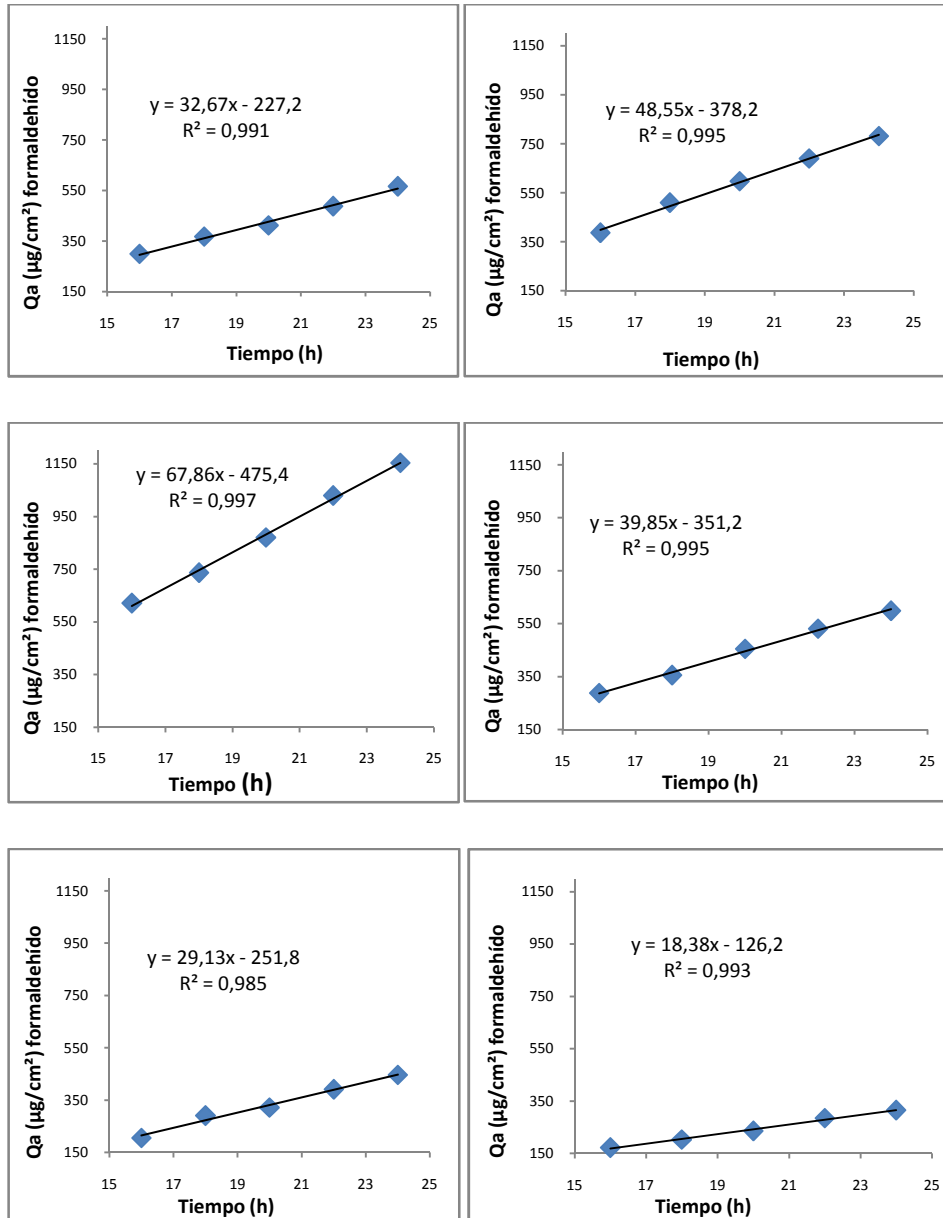


Figura 4.7. Cinética de difusión del **formaldehído** a partir de la **solución acuosa**. Se representan en el eje de ordenadas las cantidades de formaldehído acumuladas en el compartimento receptor por unidad de superficie Qa (µg/cm²) frente al tiempo de extracción para cada celda de Franz ensayada (n=6).

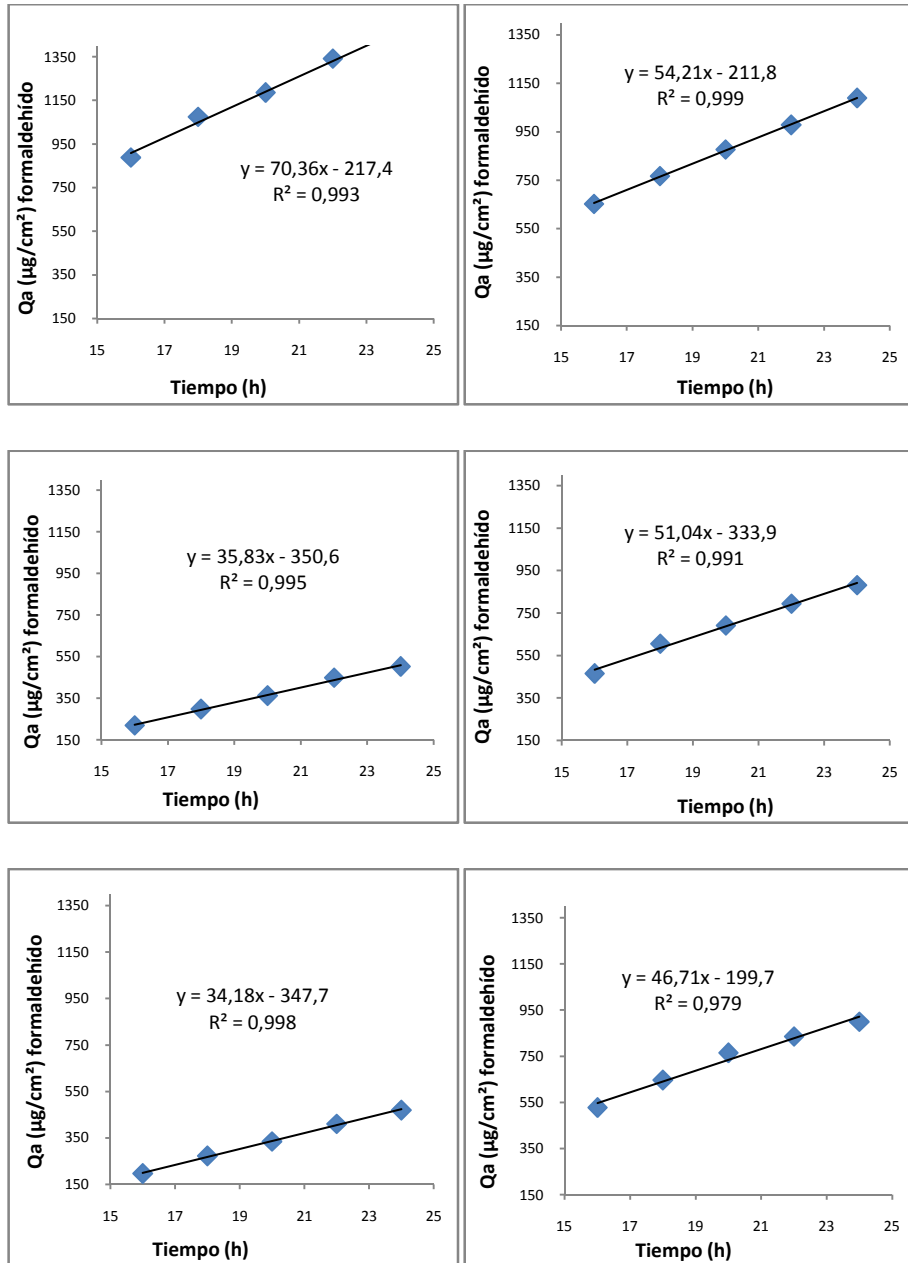


Figura 4.8. Cinética de difusión del **formaldehído** a partir de la **emulsión O/A**. Se representan las cantidades de formaldehído acumuladas en el compartimento receptor por unidad de superficie Q_a ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$), frente al tiempo de extracción para cada celda de Franz ensayada ($n=6$).

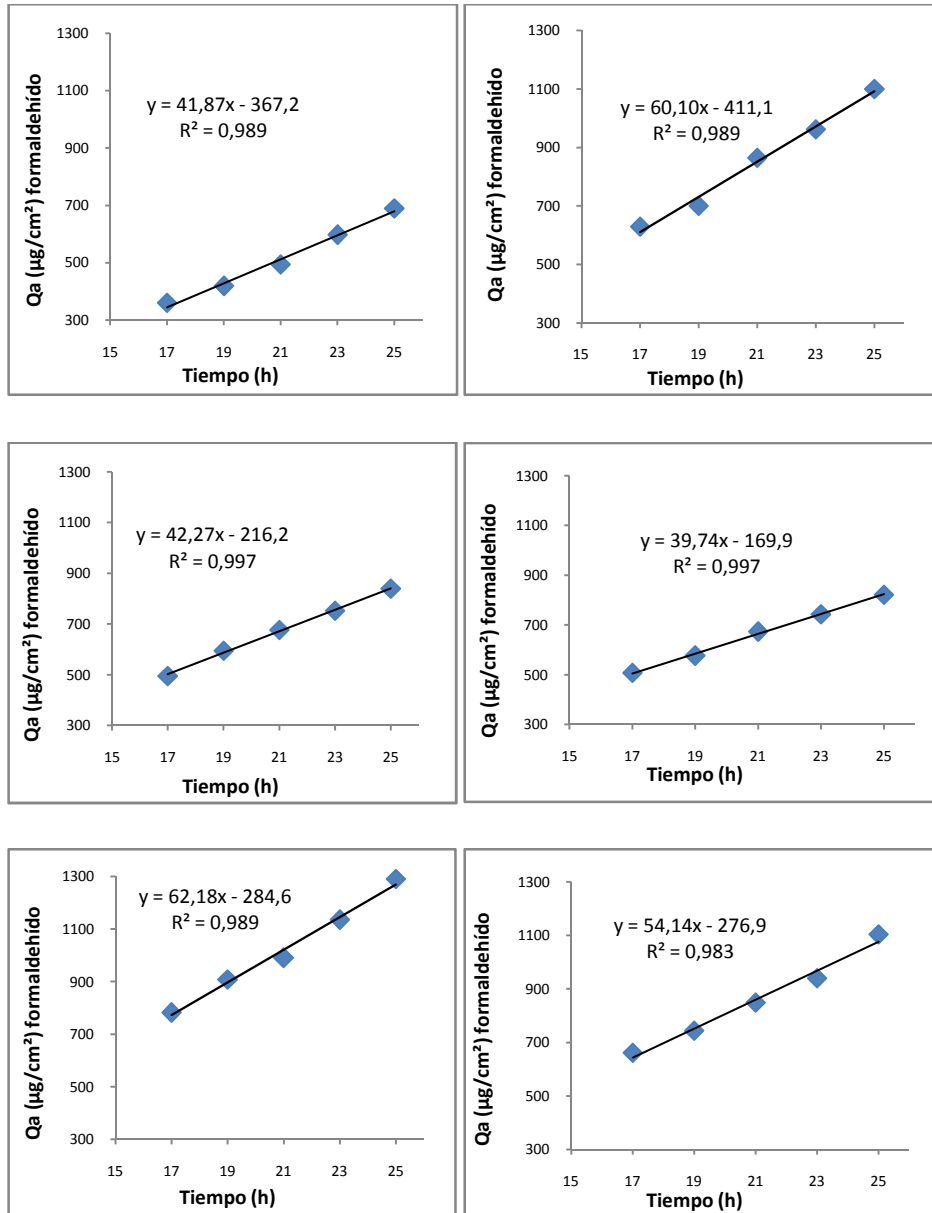


Figura 4.9. Cinética de difusión del **formaldehído** a partir del **hidrogel**. Se representan en el eje de ordenadas las cantidades de formaldehído acumuladas en el compartimento receptor por unidad de superficie Q_a ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$), frente al tiempo de extracción para cada celda de Franz ensayada ($n=6$).

En las Tablas 4.14 - 4.16 se muestran los valores medios y desviación estándar de las cantidades de formaldehído acumuladas por unidad de superficie (Q_a , $\text{mg}/\text{cm}^2 \pm \sigma$) en el compartimento receptor obtenidas para cada tiempo de toma de muestra en el estudio de penetración transdérmica de formaldehído a partir de las formulaciones solución acuosa, emulsión O/A e hidrogel, respectivamente. En las tablas también se muestran los valores medios del tiempo de latencia para la difusión (t_0 , h), de la constante de permeabilidad (K_p (cm/h)) y del flujo transdérmico (J , $\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$) en el estado estacionario.

SOLUCIÓN ACUOSA FORMALDEHÍDO (9%)(n=6)					
Cantidades acumuladas de formaldehído en el compartimento receptor.					
Tiempo (h)	16	18	20	22	24
$Q_a \pm \sigma$ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	337,79 \pm 139,13	411,78 \pm 170,50	483,43 \pm 204,93	570,20 \pm 238,63	644,82 \pm 267,04
Parámetros de permeación					
J (Estado estacionario) ($\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$)	K_p (cm/h)		t_0 (h)		
39,41 \pm 17,24	4,38 $\cdot 10^{-4}$ \pm 1,91 $\cdot 10^{-4}$		7,68 \pm 0,88		

*Tabla 4.14. Valores medios y desviación estándar (σ) de las cantidades de formaldehído acumuladas en el compartimento receptor por unidad de superficie (Q_a) para cada tiempo, del flujo transdérmico (J), de la constante de permeabilidad (K_p) y del tiempo de latencia (t_0) obtenidos en el ensayo de absorción cutánea de **formaldehído** a partir de la **solución acuosa**.*

EMULSIÓN FORMALDEHÍDO (9%)(n=6)					
Cantidades acumuladas de formaldehído en el compartimento receptor.					
Tiempo (h)	16	18	20	22	24
Qa± σ (μg/cm ²)	491,19±240,44	610,52±275,11	702,15±294,25	801,19±316,63	883,11±339,38
Parámetros de permeación					
J (Estado estacionario) (μg/(cm ² ·h))	Kp (cm/h)		t ₀ (h)		
48,72±13,31	5,24·10 ⁻⁴ ± 1,71·10 ⁻⁴		6,29 ± 3,07		

Tabla 4.15. Valores medios y desviación estándar (σ) de las cantidades de formaldehído acumuladas en el compartimento receptor por unidad de superficie (Qa) para cada tiempo, del flujo transdérmico (J), de la constante de permeabilidad (Kp) y del tiempo de latencia (t₀) obtenidos en el ensayo de absorción cutánea de **formaldehído** a partir de la **emulsión O/A**.

HIDROGEL FORMALDEHÍDO (9%)(n=6)					
Cantidades acumuladas de formaldehído en el compartimento receptor.					
Tiempo (h)	17	19	21	23	25
Qa± σ (μg/cm ²)	572,67±135,50	657,10±152,46	758,07±161,87	855,13±176,32	974,20±206,09
Parámetros de permeación					
J (Estado estacionario) (μg/(cm ² ·h))	Kp (cm/h)		t ₀ (h)		
50,05 ±9,98	5,56·10 ⁻⁴ ± 1,11·10 ⁻⁴		5,75 ± 1,71		

Tabla 4.16. Valores medios y desviación estándar (σ) de las cantidades de formaldehído acumuladas en el compartimento receptor por unidad de superficie (Qa) para cada tiempo, del flujo transdérmico (J), de la constante de permeabilidad (Kp) y del tiempo de latencia (t₀) obtenidos en el ensayo de absorción cutánea de **formaldehído** a partir del **hidrogel**.

El análisis estadístico realizado (ANOVA) no mostró diferencias significativas en los valores de flujo transdérmico del formaldehído, ni en el

periodo de latencia de la difusión, que puedan ser atribuidas a la formulación estudiada.

En las Tablas 4.17 – 4.19 se indica la cantidad de formaldehído (μg) en el líquido de lavado (Q_l), en el compartimento dador (Q_d), en la piel (Q_p), en el compartimento receptor (Q_r), la cantidad inicial (Q_0) y el balance de masas final (BM) calculado a partir de los resultados anteriores, expresado en porcentaje (%), obtenida en el ensayo de penetración cutánea de formaldehído partir de la solución acuosa, emulsión O/A e hidrogel, respectivamente:

SOLUCIÓN ACUOSA FORMALDEHÍDO (9%)						
CELDA	Q_l (μg)	Q_d (μg)	Q_p (μg)	Q_r (μg)	Q_0 (μg)	BM (%)
1	1193,82	59531,67	-----	565,69	90000	67,47
2	454,19	67023,76	-----	781,38	90000	75,84
3	565,44	82432,26	-----	1153,15	90000	93,50
4	823,76	65090,53	-----	598,59	90000	73,90
5	1193,81	59531,67	-----	446,19	90000	67,97
6	506,11	73108,52	-----	323,91	90000	82,15

Tabla 4.17. Cantidad de **formaldehído** obtenida al finalizar el ensayo de penetración cutánea de formaldehído a partir de la **disolución acuosa**. Q_l : cantidad de formaldehído (μg) en el líquido de lavado, Q_d : en el compartimento dador, Q_p : en la piel, Q_r : en el compartimento receptor, Q_0 : la cantidad inicial y BM el balance de masas final.

EMULSIÓN O/A FORMALDEHÍDO (9%)						
CELDA	Q _i (μg)	Q _d (μg)	Q _p (μg)	Q _r (μg)	Q ₀ (μg)	BM (%)
1	70,13	52978,05	-----	1458,87	90000	60,56
2	56,05	48972,77	-----	1088,85	90000	55,68
3	46,24	51977,95	-----	502,10	90000	58,36
4	104,49	54127,97	-----	468,63	90000	60,78
5	91,70	51928,37	-----	880,47	90000	58,78
6	66,58	52089,96	-----	899,77	90000	58,95

Tabla 4.18. Cantidad de **formaldehído** obtenida al finalizar el ensayo de penetración cutánea de formaldehído a partir de la **emulsión O/A**. Q_i: cantidad de formaldehído (μg) en el líquido de lavado, Q_d: en el compartimento dador, Q_p: en la piel, Q_r: en el compartimento receptor, Q₀: la cantidad inicial y BM el balance de masas final.

HIDROGEL FORMALDEHÍDO (9%)						
CELDA	Q _i (μg)	Q _d (μg)	Q _p (μg)	Q _r (μg)	Q ₀ (μg)	BM (%)
1	79,40	59920,45	-----	689,85	90000	67,43
2	41,86	59828,10	-----	1099,64	90000	67,74
3	62,18	59965,33	-----	839,11	90000	67,63
4	49,13	60326,81	-----	821,96	90000	68,00
5	91,77	60326,82	-----	1290,23	90000	68,57
6	66,19	60058,78	-----	1104,40	90000	68,05

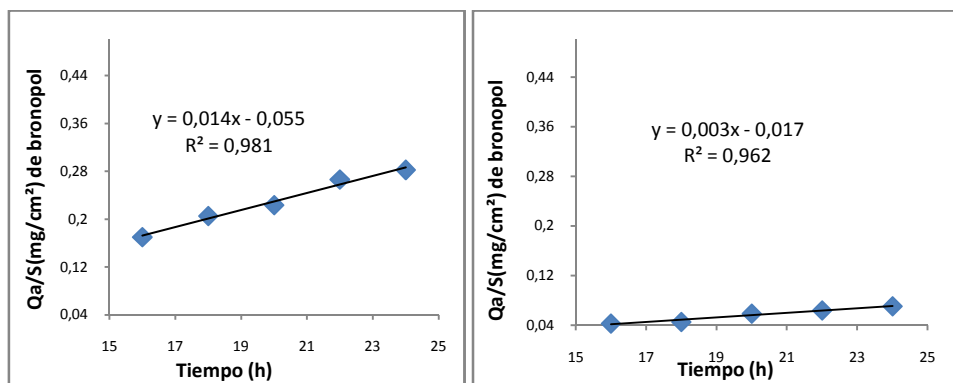
Tabla 4.19. Cantidad de **formaldehído** obtenida al finalizar el ensayo de penetración cutánea de formaldehído a partir del **hidrogel**. Q_i: cantidad de formaldehído (μg) en el líquido de lavado, Q_d: en el compartimento dador, Q_p: en la piel, Q_r: en el compartimento receptor, Q₀: la cantidad inicial y BM el balance de masas final.

Bronopol

En el estudio de absorción transdérmica de las formulaciones que contenían bronopol se evaluó la penetración de este conservante y la formación y penetración del formaldehído liberado a partir de él. En los siguientes apartados se muestran los resultados obtenidos para ambos analitos.

- **Valoración del bronopol**

Las cantidades de bronopol acumuladas en el compartimento receptor, expresadas por unidad de superficie (Q_a/S , mg/cm^2), en función del tiempo de ensayo, en cada una de las celdas ensayadas, obtenidas en los ensayos de absorción transdérmica de bronopol a partir de la solución acuosa, de la emulsión O/A y del hidrogel se muestran en las Figuras 4.10 - 4.12.



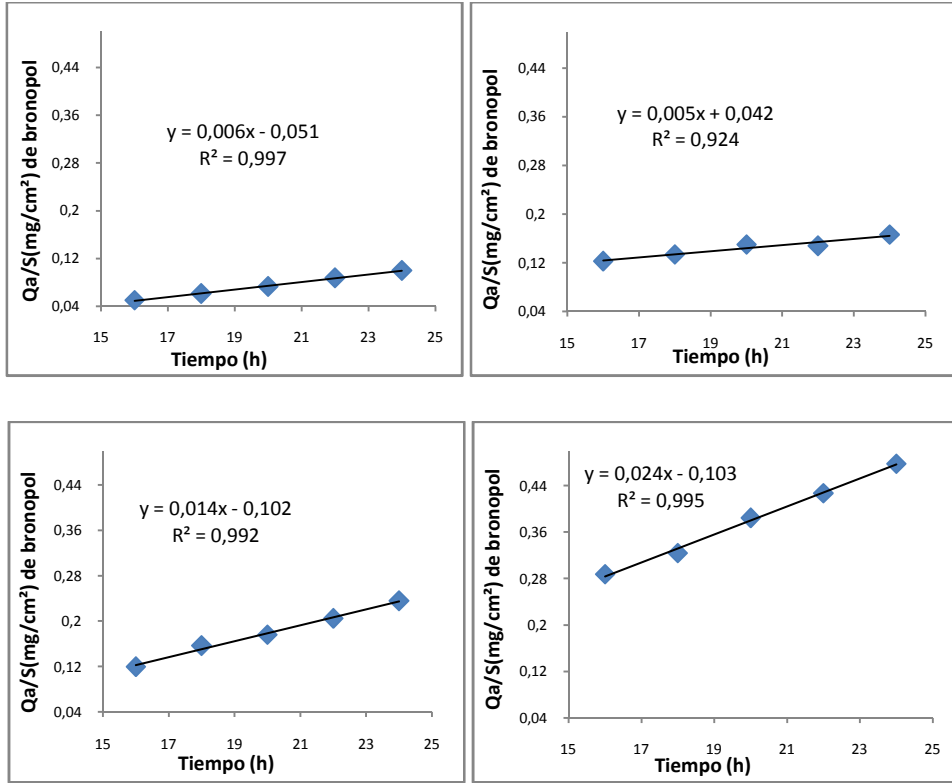
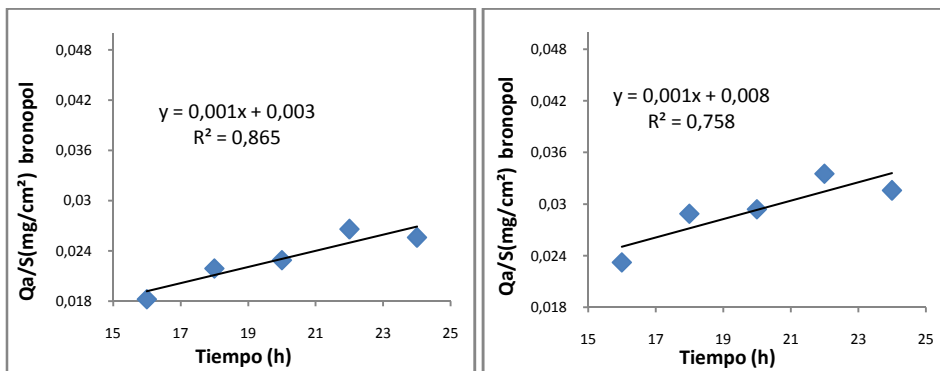


Figura 4.10. Cinética de difusión del **bronopol** a partir de la **solución acuosa**. Se representan las cantidades de bronopol acumuladas en el compartimento receptor por unidad de superficie Q_a (mg/cm^2), frente al tiempo de extracción para cada celda de Franz ensayada ($n=6$).



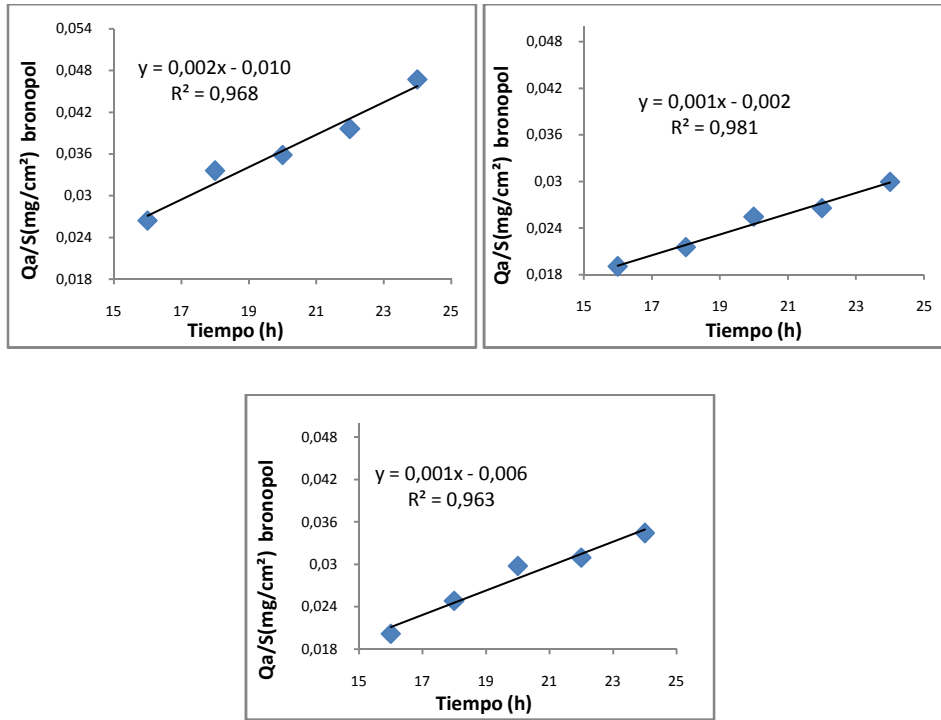
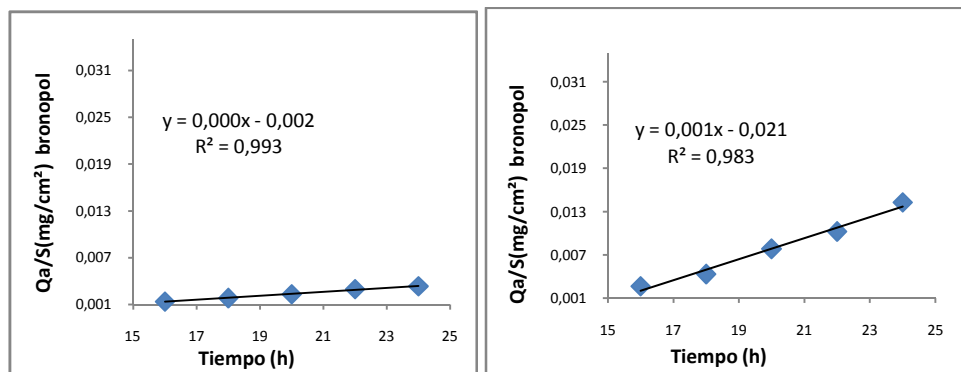


Figura 4.11. Cinética de difusión del **bronopol** a partir de la **emulsión O/A**. Se representan las cantidades de bronopol acumuladas en el compartimento receptor por unidad de superficie Q_a (mg/cm^2), frente al tiempo de extracción para cada celda de Franz ensayada ($n=5$).



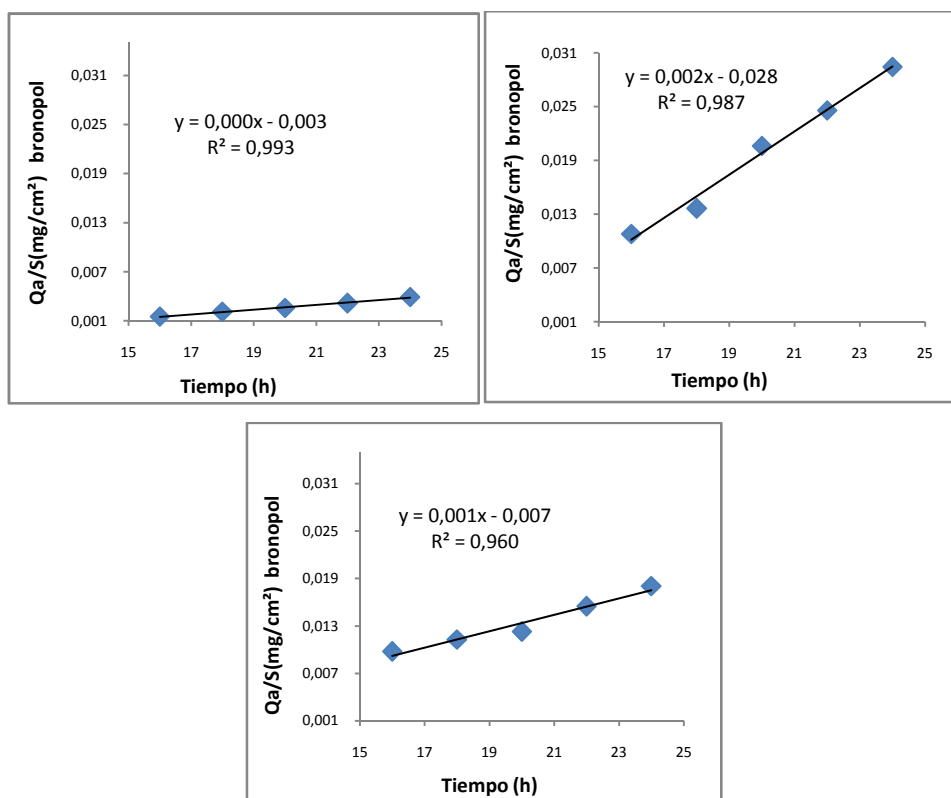


Figura 4.12. Cinética de difusión del **bronopol** a partir del **hidrogel**. Se representan las cantidades de bronopol acumuladas en el compartimento receptor por unidad de superficie Q_a ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$), frente al tiempo de extracción para cada celda de Franz ensayada ($n=5$).

En las Tablas 4.20 y 4.22 se muestran los valores medios y desviación estándar de las cantidades de bronopol acumuladas por unidad de superficie (Q_a , $\text{mg}/\text{cm}^2 \pm \sigma$) para cada tiempo de toma de muestra obtenidas en el estudio de penetración transdérmica de bronopol a partir de las formulaciones solución acuosa, emulsión O/A e hidrogel, respectivamente. Así mismo, en las tablas se muestran los valores medios del tiempo de latencia para la difusión (t_0 , h), de la constante de permeabilidad (K_p , cm/h) y del flujo transdérmico (J , $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$).

SOLUCIÓN ACUOSA BRONOPOL (4%)(n=6)					
Cantidades acumuladas de bronopol en el compartimento receptor.					
Tiempo (h)	16	18	20	22	24
Qa±σ (mg/cm²)	0,13±0,08	0,15±0,09	0,17±0,10	0,19±0,12	0,22±0,13
Parámetros de permeación					
J (Estado estacionario) (μg/(cm²·h))	Kp (cm/h)		t₀ (h)		
11,02 ± 7,90	2,75·10 ⁻⁴ ± 1,97·10 ⁻⁴		6,34 ± 2,01		

Tabla 4.20. Valores medios y desviación estándar (σ) de las cantidades de bronopol acumuladas en el compartimento receptor por unidad de superficie (Qa) para cada tiempo, del flujo transdérmico (J), de la constante de permeabilidad (Kp) y del tiempo de latencia (t₀) obtenidos en el ensayo de absorción cutánea de **bronopol** a partir de la **solución acuosa**.

EMULSIÓN O/A BRONOPOL (4%)(n=5)					
Cantidades acumuladas de bronopol en el compartimento receptor.					
Tiempo (h)	16	18	20	22	24
Qa±σ (mg/cm²)	0,0214±0,0030	0,0261±0,0045	0,0287±0,0044	0,0314±0,0048	0,0337±0,0071
Parámetros de permeación					
J (Estado estacionario) (μg/(cm²·h))	Kp (cm/h)		t₀ (h)		
1,28 ± 0,44	3,0·10 ⁻⁵ ± 1,0·10 ⁻⁵		0,00		

Tabla 4.21. Valores medios y desviación estándar (σ) de las cantidades de bronopol acumuladas en el compartimento receptor por unidad de superficie (Qa) para cada tiempo, del flujo transdérmico (J), de la constante de permeabilidad (Kp) y del tiempo de latencia (t₀) obtenidos en el ensayo de absorción cutánea de **bronopol** a partir de la **emulsión O/A**.

HIDROGEL BRONOPOL (4%)(n=5)					
Cantidades acumuladas de bronopol en el compartimento receptor.					
Tiempo (h)	16	18	20	22	24
Qa ± σ (mg/cm²)	0,0052±0,0042	0,0066±0,0049	0,0091±0,0068	0,0113±0,0081	0,0138±0,0097
Parámetros de permeación					
J (Estado estacionario) (μg/(cm²·h))	Kp (cm/h)		t₀ (h)		
0,8 ± 0,8	2,0·10 ⁻⁵ ± 2,0·10 ⁻⁵		0,00		

*Tabla 4.22. Valores medios y desviación estándar (σ) de las cantidades de bronopol acumuladas en el compartimento receptor por unidad de superficie (Qa) para cada tiempo, del flujo transdérmico (J), de la constante de permeabilidad (Kp) y del tiempo de latencia (t₀) obtenidos en el ensayo de absorción cutánea de **bronopol** a partir del **hidrogel**.*

En las Tablas 4.23 – 4.25 se indica la cantidad de bronopol (mg) en el líquido de lavado (Q_l), en el compartimento dador (Q_d), en la piel (Q_p), en el compartimento receptor (Q_r), la cantidad inicial (Q₀) y el balance de masas final (BM) calculado a partir de los resultados anteriores, expresado en porcentaje (%), obtenida en el ensayo de penetración cutánea de bronopol partir de la solución acuosa, de la emulsión O/A y del hidrogel, respectivamente.

SOLUCIÓN ACUOSA BRONOPOL (4%)						
CELDA	Q _i (mg)	Q _d (mg)	Q _p (mg)	Q _r (mg)	Q ₀ (mg)	BM (%)
1	0,2098	31,027	-----	0,282	40	78,80
2	0,2599	34,463	-----	0,070	40	86,98
3	0,2626	34,608	-----	0,099	40	87,42
4	0,2160	34,321	-----	0,166	40	86,76
5	0,2208	34,644	-----	0,236	40	87,75
6	0,2904	34,026	-----	0,478	40	86,97

Tabla 4.23. Cantidad de **bronopol** obtenida al finalizar el ensayo de penetración cutánea de bronopol a partir de la **disolución acuosa**. Q_i: cantidad de bronopol (mg) en el líquido de lavado, Q_d: en el compartimento dador, Q_p: en la piel, Q_r: en el compartimento receptor, Q₀: la cantidad inicial y BM el balance de masas final.

EMULSIÓN O/A BRONOPOL (4%)						
CELDA	Q _i (mg)	Q _d (mg)	Q _p (mg)	Q _r (mg)	Q ₀ (mg)	BM (%)
1	0,0518	42,5123	-----	0,0256	40	106,47
2	0,0219	46,9074	-----	0,0316	40	117,40
3	0,0759	45,1541	-----	0,0467	40	113,19
4	0,0511	54,6777	-----	0,0299	40	136,89
5	0,0495	42,3446	-----	0,0344	40	106,07

Tabla 4.24. Cantidad de **bronopol** obtenida al finalizar el ensayo de penetración cutánea de bronopol a partir de la **emulsión O/A**. Q_i: cantidad de bronopol (mg) en el líquido de lavado, Q_d: en el compartimento dador, Q_p: en la piel, Q_r: en el compartimento receptor, Q₀: la cantidad inicial y BM el balance de masas final.

HIDROGEL BRONOPOL (4%)						
CELDA	Q _i (mg)	Q _d (mg)	Q _p (mg)	Q _r (mg)	Q ₀ (mg)	BM (%)
1	0,0824	31,2012	-----	0,0033	40	78,21
2	0,4159	28,5180	-----	0,0143	40	72,37
3	0,0456	30,2147	-----	0,0039	40	75,66
4	0,2073	28,7197	-----	0,0295	40	72,39
5	0,1428	30,3957	-----	0,0181	40	76,39

Tabla 4.25. Cantidad de **bronopol** obtenida al finalizar el ensayo de penetración cutánea de bronopol a partir del **hidrogel**. Q_i: cantidad de bronopol (mg) en el líquido de lavado, Q_d: en el compartimento dador, Q_p: en la piel, Q_r: en el compartimento receptor, Q₀: la cantidad inicial y BM el balance de masas final.

- **Valoración del formaldehído**

En las Figuras 4.13 – 4.15 se muestra la representación gráfica de las cantidades de formaldehído acumuladas en el compartimento receptor, expresadas por unidad de superficie (Qa/S, mg/cm²), para cada tiempo de toma de muestra, en cada una de las celdas ensayadas, obtenidas a partir de las formulaciones que contienen bronopol al 4% en solución acuosa, emulsión O/A y en hidrogel, respectivamente.

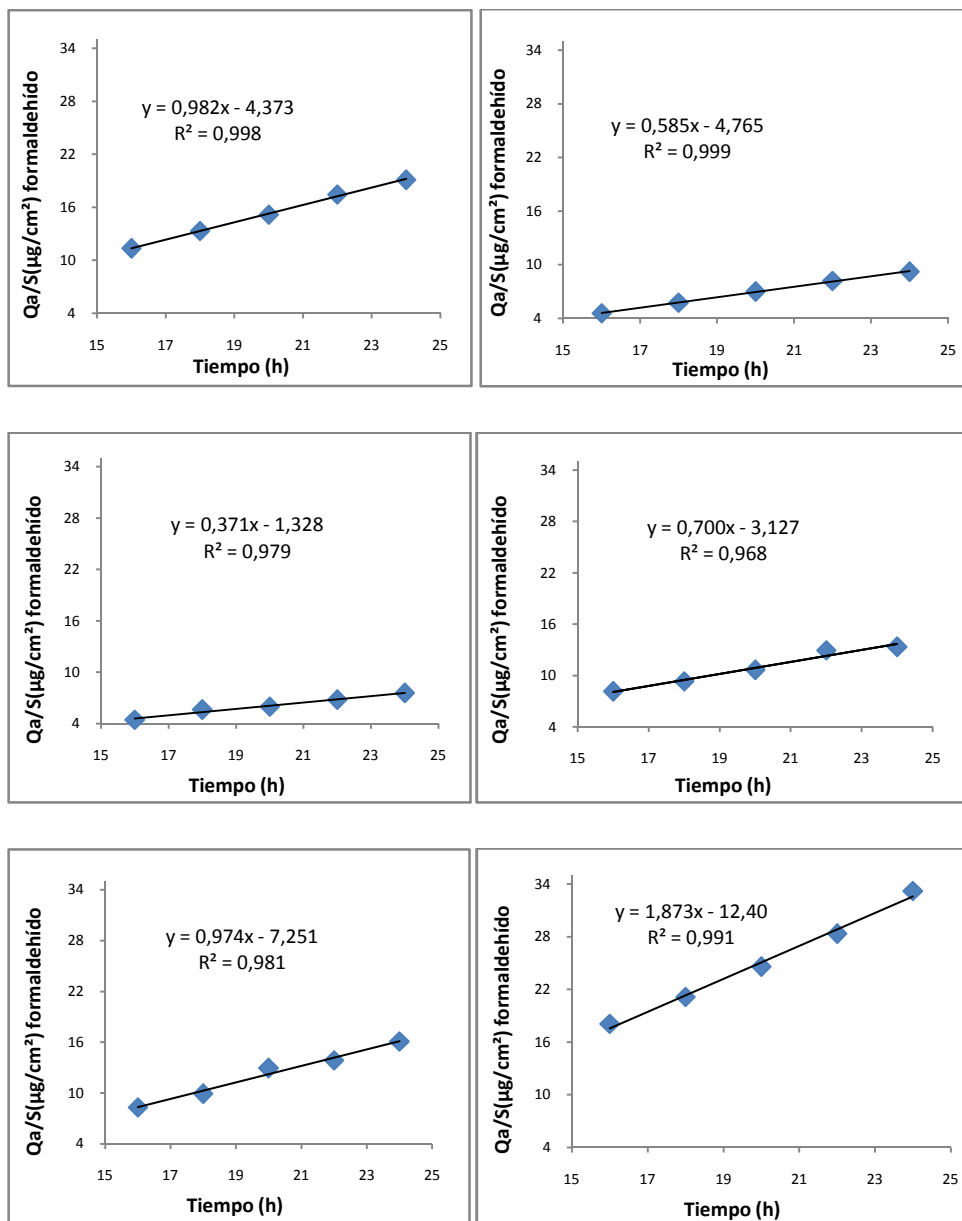


Figura 4.13. Cinética de difusión del **formaldehído** a partir de la **solución acuosa que contiene bronopol al 4%**. Se representan las cantidades de formaldehído acumuladas en el compartimento receptor por unidad de superficie Q_a ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) frente al tiempo de extracción para cada celda de Franz ensayada ($n=6$).

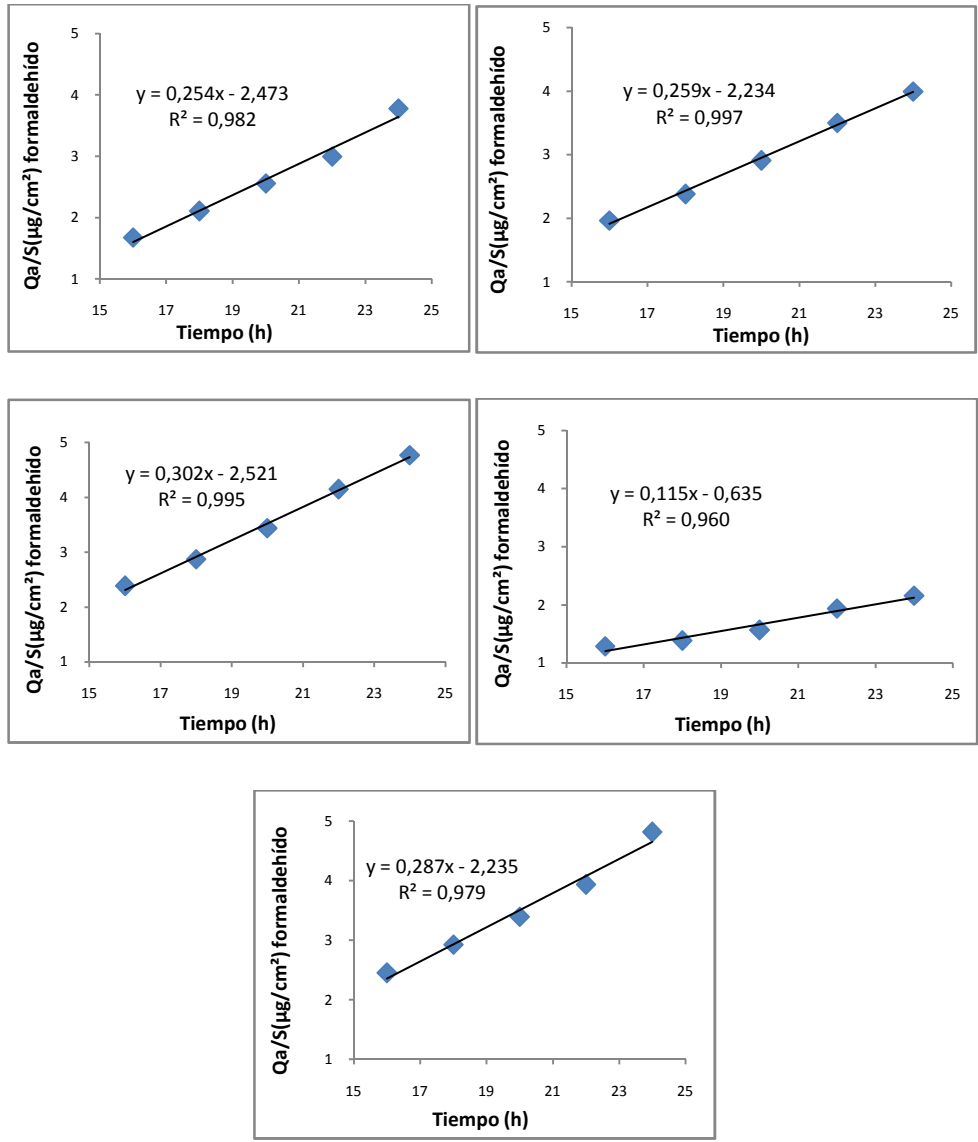


Figura 4.14. Cinética de difusión del **formaldehído** a partir de la **emulsión O/A que contiene bronopol al 4%**. Se representan las cantidades de formaldehído acumuladas en el compartimento receptor por unidad de superficie Q_a ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$), frente al tiempo de extracción para cada celda de Franz ensayada ($n=5$).

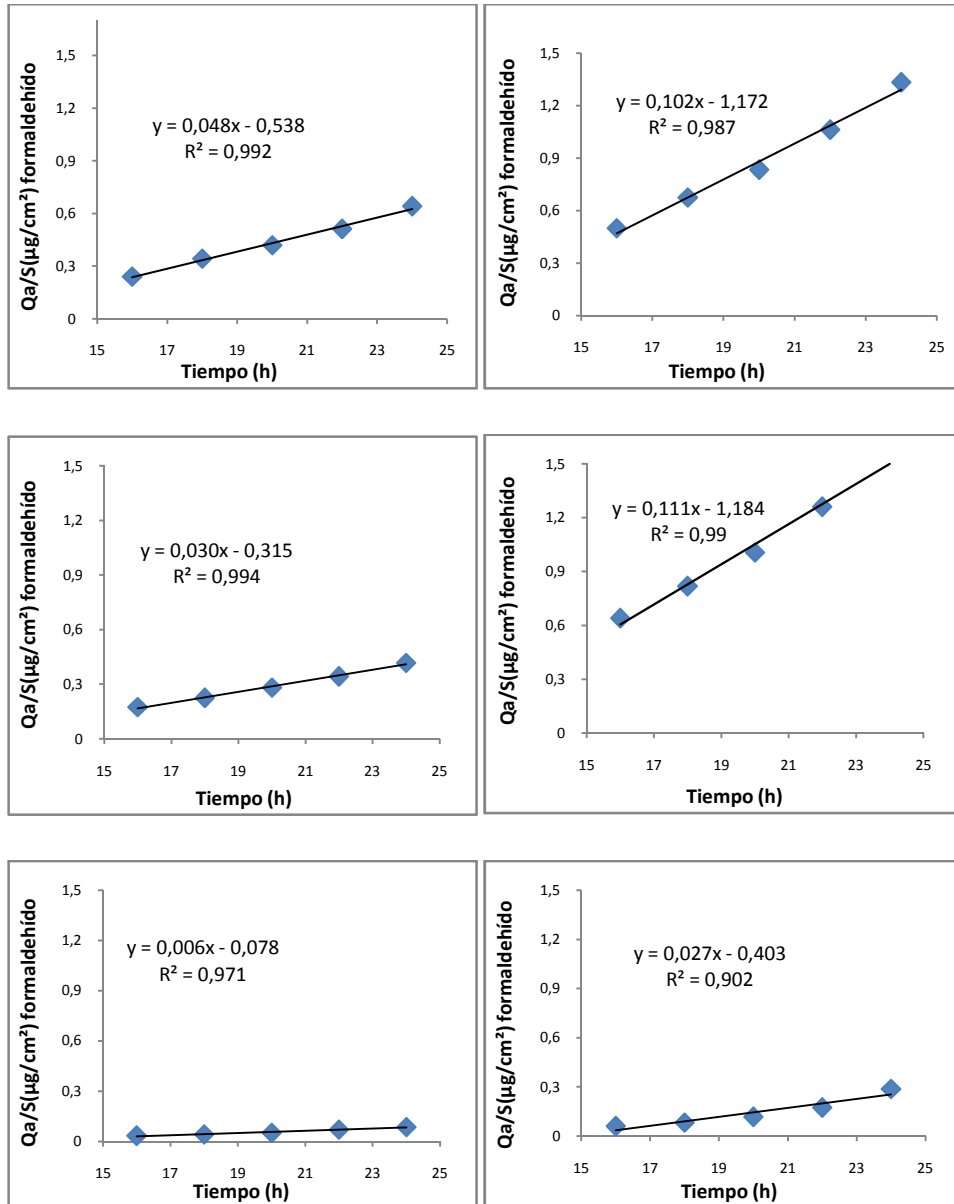


Figura 4.15. Cinética de difusión del **formaldehído** a partir del **hidrogel que contiene bronopol al 4%**. Se representan las cantidades de formaldehído acumuladas en el compartimento receptor por unidad de superficie Q_a ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) frente al tiempo de extracción para cada celda de Franz ensayada ($n=6$).

En las Tablas 4.26 y 4.28 se muestran los valores medios acompañados de la desviación estándar de las cantidades de formaldehído acumuladas por unidad de superficie (Q_a , $\text{mg}/\text{cm}^2 \pm \sigma$) para cada tiempo de toma de muestra obtenidas en el estudio de penetración transdérmica desde las formulaciones que contienen bronopol al 4% en solución acuosa, emulsión O/A e hidrogel, respectivamente. Así mismo, en las tablas se muestran los valores medios del tiempo de latencia para la difusión (t_0 , h) y del flujo transdérmico (J , $\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$) del formaldehído.

SOLUCIÓN ACUOSA BRONOPOL (4%)(n=6)					
Cantidades acumuladas de formaldehído en el compartimento receptor.					
Tiempo (h)	16	18	20	22	24
$Q_a \pm \sigma$ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	9,16 \pm 4,64	10,85 \pm 5,29	12,73 \pm 6,18	14,60 \pm 7,09	16,43 \pm 8,45
Parámetros de permeación					
J (Estado estacionario) ($\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$)			t_0 (h)		
0,9141 \pm 0,5247			7,70 \pm 0,85		

*Tabla 4.26. Valores medios y desviación estándar (σ) de las cantidades de **formaldehído** acumuladas en el compartimento receptor por unidad de superficie (Q_a) para cada tiempo, del flujo transdérmico (J) y del tiempo de latencia (t_0) obtenidos para el formaldehído liberado a partir de la **solución acuosa que contiene bronopol al 4%**.*

EMULSIÓN BRONOPOL (4%)(n=5)					
Cantidades acumuladas de formaldehído en el compartimento receptor.					
Tiempo (h)	16	18	20	22	24
Qa± σ (μg/cm ²)	1,95±0,44	2,33±0,56	2,77±0,69	3,30±0,79	3,90±0,96
Parámetros de permeación					
J (Estado estacionario) (μg/(cm ² ·h))			t ₀ (h)		
0,2434 ± 0,0744			8,00 ± 1,56		

Tabla 4.27. Valores medios y desviación estándar (σ) de las cantidades de **formaldehído** acumuladas en el compartimento receptor por unidad de superficie (Qa) para cada tiempo, del flujo transdérmico (J) y del tiempo de latencia (t₀) obtenidos para el formaldehído liberado a partir de la **emulsión O/A que contiene bronopol al 4%**.

HIDROGEL BRONOPOL (4%)(n=6)					
Cantidades acumuladas de formaldehído en el compartimento receptor.					
Tiempo (h)	16	18	20	22	24
Qa± σ (μg/cm ²)	0,27±0,22	0,36±0,29	0,45±0,35	0,57±0,44	0,71±0,54
Parámetros de permeación					
J (Estado estacionario) (μg/cm ² ·h)			t ₀ (h)		
0,0540 ± 0,0429			11,96 ± 1,70		

Tabla 4.28. Valores medios y desviación estándar (σ) de las cantidades de **formaldehído** acumuladas en el compartimento receptor por unidad de superficie (Qa) para cada tiempo, del flujo transdérmico (J) y del tiempo de latencia (t₀) obtenidos para el formaldehído liberado a partir del **hidrogel que contiene bronopol al 4%**.

El análisis estadístico realizado (ANOVA) puso de manifiesto diferencias significativas en los parámetros analizados, flujo transdérmico, y periodo de latencia de la difusión de los dos activos, que pueden ser atribuidas a la formulación seleccionada. El flujo transdérmico de bronopol

desde el hidrogel y la emulsión son muy similares, e inferiores (0,8 y 1,28 $\mu\text{g}/(\text{cm}^2\cdot\text{h})$, respectivamente) a los alcanzados con la solución (11,02 $\mu\text{g}/(\text{cm}^2\cdot\text{h})$). En este ensayo también se encontraron diferencias en los tiempos de latencia, en concreto la solución acuosa presenta un tiempo de 6,34 h mientras que en el caso del hidrogel y la emulsión este tiempo es cero.

Los flujos obtenidos para el formaldehído procedente del bronopol también han mostrado diferencias significativas siendo 0,91 $\mu\text{g}/(\text{cm}^2\cdot\text{h})$ para la solución acuosa, 0,24 $\mu\text{g}/(\text{cm}^2\cdot\text{h})$ para la emulsión y 0,05 $\mu\text{g}/(\text{cm}^2\cdot\text{h})$ para el hidrogel.

Los tiempos de latencia son elevados, en el caso de la solución fue de 7,7 horas, en el caso de la emulsión fue de 8 horas y en el caso del hidrogel fue de 11,96 horas.

Formaldehído a partir de DMDM hidantoína

En las Figuras 4.16 – 4.18 se muestra la representación gráfica de las cantidades de formaldehído acumuladas en el compartimento receptor, expresadas por unidad de superficie (Q_a/S , mg/cm^2), para cada tiempo de toma de muestra, en cada una de las celdas ensayadas, obtenidas a partir de las formulaciones que contienen DMDM hidantoína en solución acuosa, emulsión O/A e hidrogel, respectivamente.

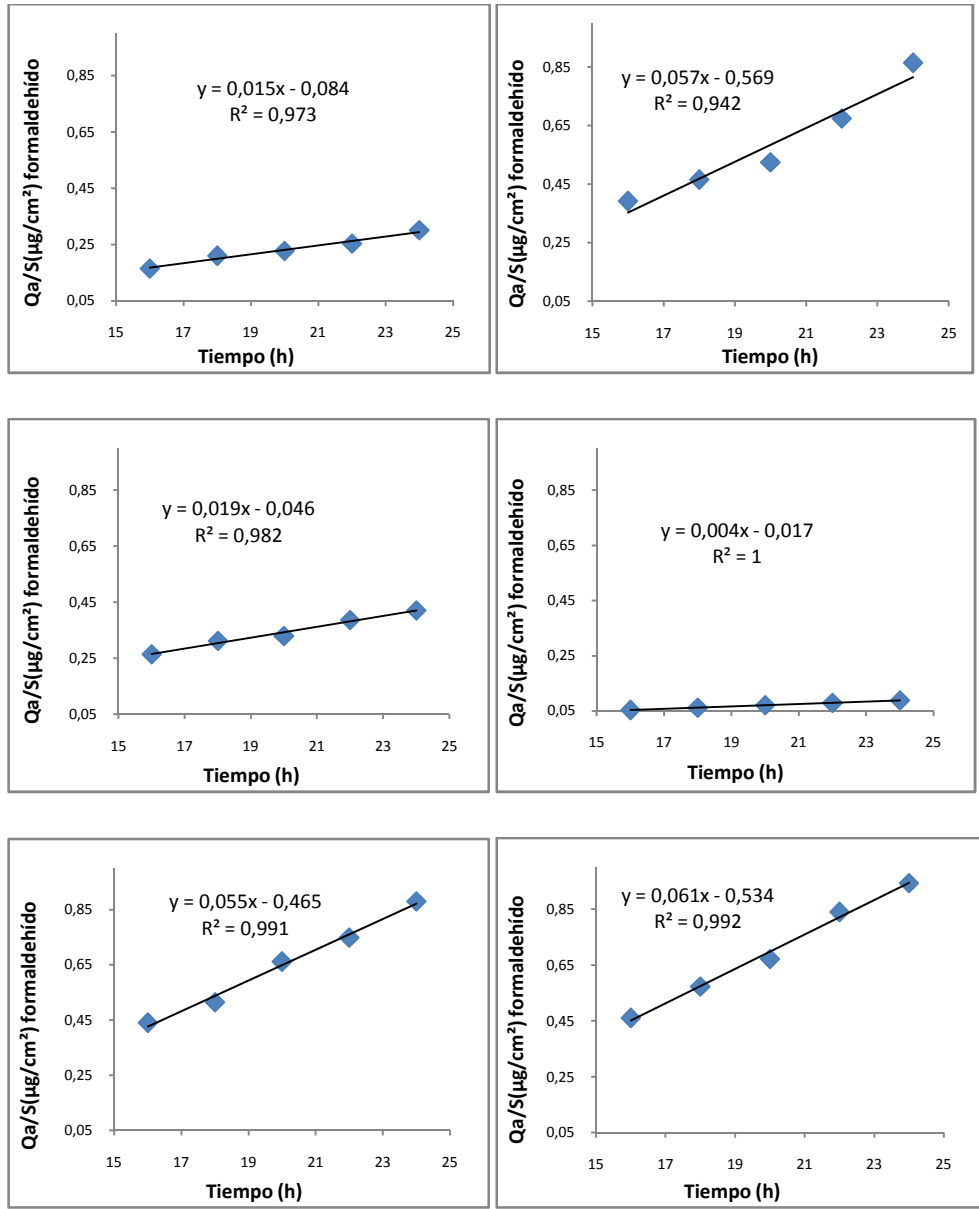


Figura 4.16. Cinética de difusión del **formaldehído** a partir de la **solución acuosa que contiene DMDM hidantoína 3%**. Se representan las cantidades de formaldehído acumuladas en el compartimento receptor por unidad de superficie Q_a ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) frente al tiempo de extracción para cada celda de Franz ensayada ($n=6$).

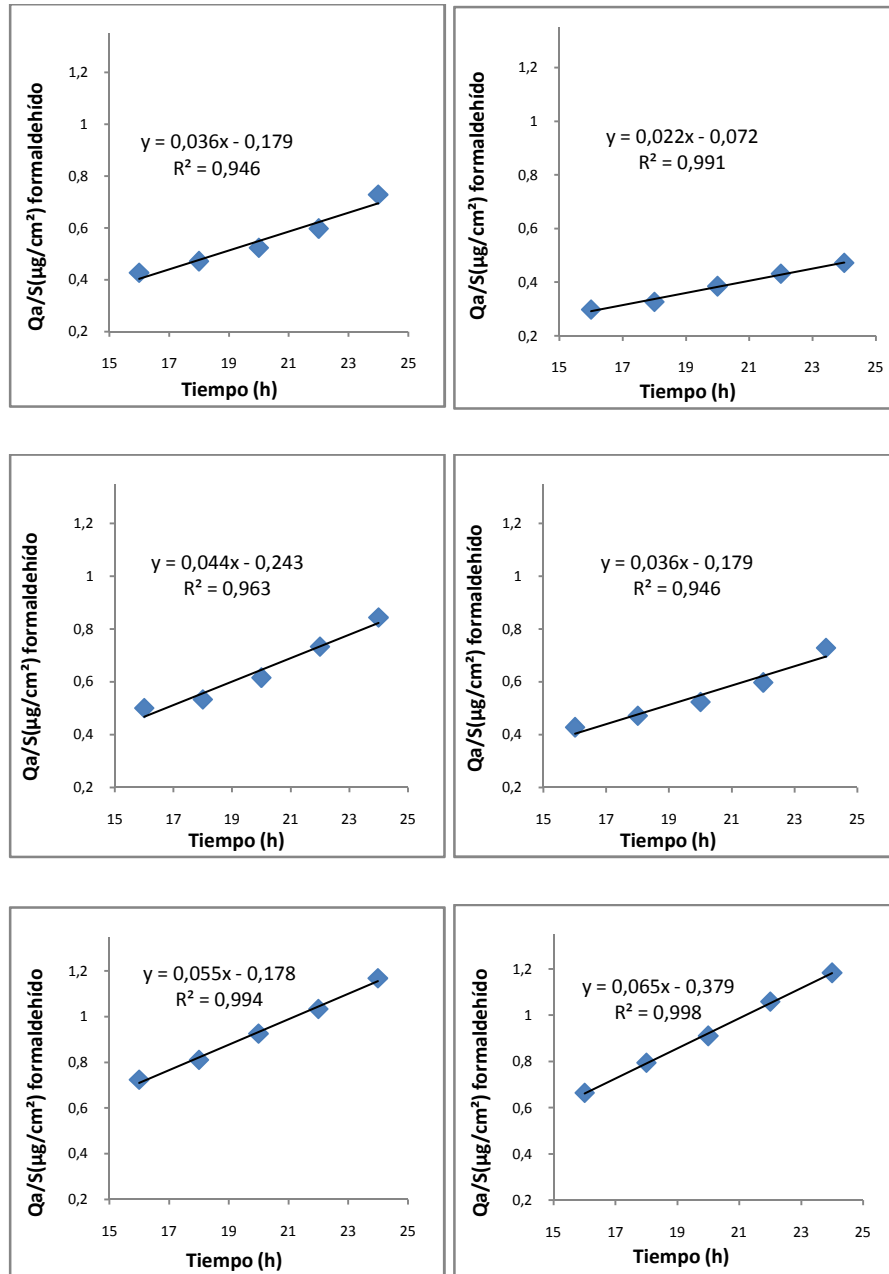


Figura 4.17. Cinética de difusión del **formaldehído** a partir de la **emulsión O/A que contiene DMDM hidantoína 3%**. Se representan las cantidades de formaldehído acumuladas en el compartimento receptor por unidad de superficie Q_a ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) frente al tiempo de extracción para cada celda de Franz ensayada ($n=6$).

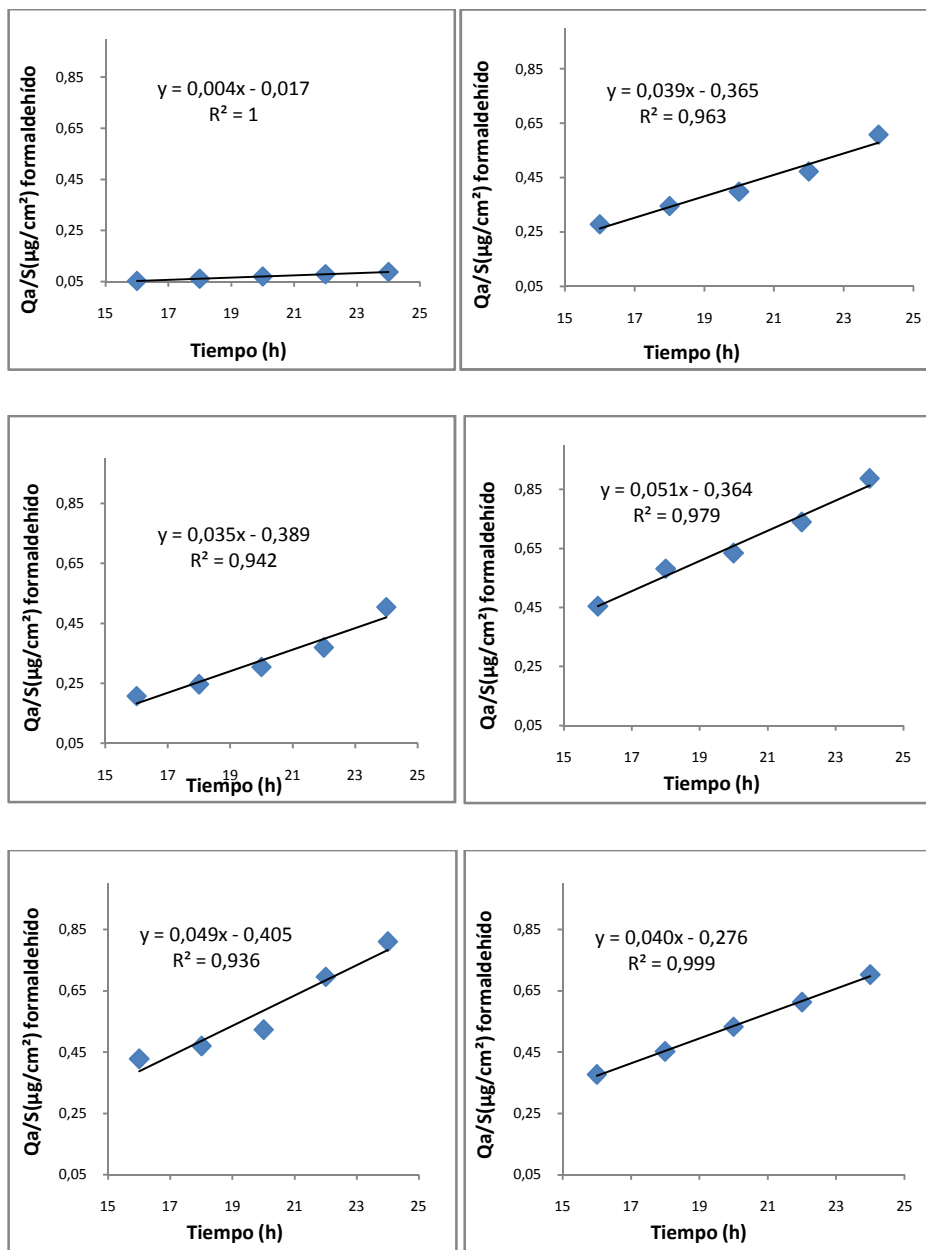


Figura 4.18. Cinética de difusión del **formaldehído** a partir del **hidrogel que contiene DMDM hidantoína 3%**. Se representan las cantidades de formaldehído acumuladas en el compartimento receptor por unidad de superficie Q_a ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) frente al tiempo de extracción para cada celda de Franz ensayada ($n=6$).

En las Tablas 4.29 y 4.31 se muestran los valores medios acompañados de la desviación estándar de las cantidades de formaldehído acumuladas por unidad de superficie (Q_a , $\text{mg}/\text{cm}^2 \pm \sigma$) obtenidas para cada tiempo de toma de muestra a partir de las formulaciones que contienen DMDM hidantoína al 3% en solución acuosa, emulsión O/A e hidrogel, respectivamente. Así mismo, en las tablas se muestran los valores medios del tiempo de latencia para la difusión (t_0 , h) y del flujo transdérmico (J , $\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$) del formaldehído.

SOLUCIÓN ACUOSA DMDM HIDANTOÍNA (3%)(n=6)					
Cantidades acumuladas de formaldehído en el compartimento receptor.					
Tiempo (h)	16	18	20	22	24
$Q_a \pm \sigma$ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	0,344 \pm 0,113	0,415 \pm 0,134	0,483 \pm 0,178	0,580 \pm 0,223	0,682 \pm 0,266
Parámetros de permeación					
J (Estado estacionario) ($\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$)				t_0 (h)	
0,042 \pm 0,022				6,9 \pm 3,0	

*Tabla 4.29. Valores medios y desviación estándar (σ) de las cantidades de **formaldehído** acumuladas en el compartimento receptor por unidad de superficie (Q_a) para cada tiempo, del flujo transdérmico (J) y del tiempo de latencia (t_0) obtenidos para el formaldehído liberado a partir de la **solución acuosa que contiene DMDM hidantoína al 3%**.*

EMULSIÓN DMDM HIDANTOÍNA (3%) (n=6)					
Cantidades acumuladas de formaldehído en el compartimento receptor.					
Tiempo (h)	16	18	20	22	24
Qa± σ (μg/cm ²)	0,477±0,174	0,540±0,201	0,612±0,229	0,713±0,258	0,819±0,281
Parámetros de permeación					
J (Estado estacionario) (μg/(cm ² ·h))			t ₀ (h)		
0,043 ± 0,016			5,21 ± 2,03		

Tabla 4.30. Valores medios y desviación estándar (σ) de las cantidades de **formaldehído** acumuladas en el compartimento receptor por unidad de superficie (Qa) para cada tiempo, del flujo transdérmico (J) y del tiempo de latencia (t₀) obtenidos para el formaldehído liberado a partir de la **emulsión O/A que contiene DMDM hidantoína al 3%**. N: número de ensayos realizados.

HIDROGEL DMDM HIDANTOÍNA (3%) (n=6)					
Cantidades acumuladas de formaldehído en el compartimento receptor.					
Tiempo(h)	16	18	20	22	24
Qa± σ (μg/cm ²)	0,349±0,093	0,419±0,114	0,479±0,115	0,578±0,138	0,702±0,137
Parámetros de permeación					
J (Estado estacionario) (μg/(cm ² ·h))			t ₀ (h)		
0,043 ± 0,007			7,76 ± 2,28		

Tabla 4.31. Valores medios y desviación estándar (σ) de las cantidades de **formaldehído** acumuladas en el compartimento receptor por unidad de superficie (Qa) para cada tiempo, del flujo transdérmico (J) y del tiempo de latencia (t₀) obtenidos para el formaldehído liberado a partir del **hidrogel que contiene DMDM hidantoína al 3%**. n: número de ensayos realizados.

El análisis estadístico realizado (ANOVA y la prueba Kruskal-Wallis) mostró que no existen diferencias significativas en los parámetros

analizados, flujo transdérmico y periodo de latencia en la difusión del formaldehído, que pudieran ser atribuidas a la formulación seleccionada.

4.5 DISCUSIÓN

4.5.1 Estudio de estabilidad

Los estudios de estabilidad de los activos ensayados en los líquidos y condiciones empleadas en la realización de los ensayos de difusión son una parte fundamental en el proceso de investigación y deben ser realizados previamente, con la finalidad de garantizar que los resultados obtenidos son válidos y fiables.

Los ensayos de estabilidad de bronidox realizados indican que cuando las muestras se conservan a temperatura inferior a 37°C la concentración de bronidox permanece inalterada durante el periodo de tiempo en el que se realizan los ensayos. Por consiguiente, estos resultados indican que el analito es estable en las condiciones en las que se han desarrollado los ensayos de penetración cutánea del bronidox.

Sin embargo, si las muestras se mantienen a una temperatura de 70°C el analito se degrada. Este resultado, fue esencial para seleccionar las condiciones en las que se debían preparar las formulaciones y realizar la extracción del conservante de las muestras de piel, excluyendo en todos los casos la utilización de una temperatura superior a 40°C.

Para el resto de compuestos ensayados la bibliografía consultada aportó los datos necesarios para conocer sus características de estabilidad

(Moore, et al.,1981;Kapupara, et al., 2016; Schanno, et al., 1980; Lv, et al., 2015), asegurando de ese modo que los ensayos realizados no interferían en la estabilidad a de los compuestos.

4.5.2 Estudios de absorción transdérmica. Consideraciones sobre seguridad de los conservantes.

La absorción percutánea depende de diversos factores como son la composición y consistencia de las formulaciones, el tipo de piel, el lugar de aplicación y la oclusión, entre otros (Romonchuk, et al., 2008; Vecchia, et al., 2005).

Por motivos éticos y económicos, los estudios de absorción cutánea *in vivo* no son frecuentes, y por ello se recurre a realizar los estudios transdérmicos *in vitro* (CEIIR, 2007), ya sea utilizando piel de animales o piel humana procedente de donantes. Las pieles animales más utilizadas suelen ser piel de cerdo, roedores, cerdo de guinea o conejos (Marro et al., 2001; Van de Sandt y Rutten, 1995; Van Ravenzwaay y Leibold, 2004).

La absorción en estudios *in vitro*, y sobre todo con pieles de animales como rata, conejo o cerdo, es generalmente más alta que la obtenida *in vivo* en humanos, pero, aun así, resulta un método adecuado para realizar predicciones sobre permeabilidad (Jung, et al., 2014). De hecho, los resultados obtenidos en ensayos de permeabilidad *in vitro* con celdas de Franz, se corresponden bien con los obtenidos en modelos *in vivo*, ya que se ha demostrado que existe una excelente correlación entre las cinéticas

de los procesos de absorción de los métodos *in vitro* y los *in vivo* (Franz, et al.,2009).

Para realizar el estudio que se presenta se utilizó piel de oreja de cerdo. Se ha demostrado que la piel de cerdo es muy similar a la piel humana y por lo tanto ofrece resultados muy fiables en los estudios de absorción percutánea.

Es importante destacar que aunque los conservantes se pueden emplear tanto en medicamentos como en cosméticos, el objetivo de esta tesis es aportar conocimiento para la realización de estudios de absorción transdérmica de cosméticos, por lo que se han buscado alternativas para poder evitar el sacrificio de animales, ya que a lo largo de los últimos años, y en especial a partir de la Regulación Europea 1223/2009 sobre productos cosméticos, se ha incrementado el interés en desarrollar nuevos métodos, alternativos a la experimentación animal, para asegurar la seguridad de productos cosméticos, que replacen el uso de animales de laboratorio.

Para facilitar la comprensión de los datos, se resume en la Tabla 4.32 el porcentaje de conservante que contiene la formulación cosmética que alcanza el compartimento receptor después de una larga exposición.

	BRONIDOX	FORMALDEHÍDO	BRONOPOL
SOLUCIÓN ACUOSA	22,5%	0,72%	0,55%
EMULSIÓN	0%	0,98%	0,08%
HIDROGEL	13,9%	1,08%	0,03%

Tabla 4.32. Porcentajes de bronidox, formaldehído y bronopol acumuladas en el compartimento receptor para cada ensayo.

Debemos tener en cuenta que las concentraciones de los conservantes utilizadas en los ensayos realizados en este trabajo, fueron muy superiores a las concentraciones autorizadas, de acuerdo con la normativa vigente, para su uso en productos cosméticos. Esto fue así, atendiendo a los límites de detección y de cuantificación de los analitos mediante los métodos analíticos disponibles. Para la valoración cuantitativa del bronidox se utilizó el método analítico descrito en el apartado 3.2 del capítulo 3, que presenta un límite de detección de 28,70 mg/L y un límite de cuantificación de 95,69 mg/L. Para la valoración cuantitativa del formaldehído se utilizó el método general de colorimetría (*Commission Directive 90/207/EEC*), que presenta un límite de detección de 38,43 mg/L y un límite de cuantificación de 128,12 mg/L.

La idea inicial del trabajo era simular una exposición de una forma más real y para ello se comenzó el estudio con tomas de muestras a tiempos cortos y utilizando concentraciones de los conservantes próximas a las de uso. Sin embargo, se tuvo que desestimar este diseño debido a que las concentraciones de los conservantes en las muestras obtenidas no entraban dentro de los límites de detección. Estos resultados hicieron que

el diseño de toma de muestras del estudio se enfocara para definir el flujo del conservante en estado estacionario empleando para ello concentraciones de los conservantes en las formulaciones ensayadas mucho más elevadas a las permitidas y tiempos de toma de muestra durante periodos más prolongados, con objeto de poder extrapolar a *posteriori* la absorción desde las concentraciones habituales de uso.

De acuerdo con los resultados obtenidos, las características de la formulación en la que se incorpora el **bronidox** es determinante para su penetración a través de la piel. Así, no se ha observado el paso de bronidox a través de la piel desde la emulsión O/A. En cambio, en el caso de que el bronidox se encuentre en hidrogel, la Kp alcanza un valor de $6,17 \cdot 10^{-3} \pm 1,54 \cdot 10^{-3}$ (cm/h) y desde la solución acuosa incrementa de forma significativa (un 223%), alcanzando valores de $1,38 \cdot 10^{-2} \pm 0,26 \cdot 10^{-2}$ (cm/h). Este comportamiento podría ser debido a la mayor viscosidad del hidrogel en relación con la solución acuosa, que podría haber dificultado la difusión del bronidox y haber quedado algo más retenido desde el hidrogel que desde la solución.

Resultó sorprendente que desde la emulsión O/A el conservante no atravesara la piel. *A priori* cabría esperar mayor paso del conservante a través de la piel desde la emulsión, ya que las emulsiones al incluir en su composición promotores de la penetración son buenos vehículos para favorecer el paso de sustancias a través de la piel. En el caso de la emulsión de estudio en su composición se encontraban sustancias presentes en la base autoemulsionable (Neo Pcl®), que podría favorecer el paso de

distintas sustancias a través de la piel (Otto, et al., 2009). Además, las emulsiones producen un ligero efecto oclusivo, que da lugar a una buena hidratación de la piel, que en general favorece la penetración transdérmica de los compuestos que incorpora (Mehta, 2007; Otto, et al., 2009). Si bien el bronidox no tiene un coeficiente de reparto muy elevado ($\log P = 0,3$), tampoco su solubilidad en agua lo es $0,46\%$ a 20°C , por lo que quizá no se libera desde la emulsión O/A y por tanto no es absorbido a través de la piel cuando se aplica utilizando esta formulación. El método analítico disponible no ha permitido cuantificar los niveles de conservante en tejido, lo que indica que no se acumula en el mismo de forma importante, o dicho de otra forma: la cantidad de bronidox que se acumula en el tejido es inferior a $0,11 \text{ mg/cm}^2$, que es la cantidad mínima detectable marcada por el límite de detección del método analítico utilizado.

También se observó una diferencia significativa en el tiempo de latencia de difusión del bronidox desde las formulaciones hidrogel y solución acuosa. El tiempo de latencia del bronidox desde la solución fue de 7,47 horas y desde el hidrogel fue de 3,55 horas, es decir, desde el hidrogel el bronidox penetra a través de la piel con menor flujo, pero el proceso de difusión se inicia antes. En cualquier caso, en ambas formulaciones el tiempo requerido para que se inicie la absorción transdérmica del bronidox es bastante elevado por lo que se requeriría un tiempo de exposición prolongado para que el paso a través de la piel del conservante comenzase a ser relevante. Estos hallazgos indican que si se hace un uso correcto de los cosméticos que lo contienen, el bronidox no llegaría al torrente sanguíneo, ya que de acuerdo con la normativa vigente

este debe ser utilizado como conservante únicamente en productos de enjuague.

Es importante resaltar que los flujos mencionados se han obtenido incorporando bronidox a la concentración del 0,2% en las formulaciones, en lugar de al 0,1% que es la cantidad máxima permitida, debido a que a partir de las formulaciones preparadas al 0,1% no se podían cuantificar las cantidades de conservante en las muestras experimentales utilizando el método analítico disponible. A esta concentración el flujo transdérmico que podría alcanzar sería de $6,17 \cdot 10^{-3} \mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$ para el hidrogel y de $1,38 \cdot 10^{-2} \mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$ para la solución.

La penetración a través de la piel del **formaldehído** parece ser independiente del tipo de formulación en la que se incorpora, ya que la constante de permeabilidad del formaldehído es muy similar para las tres formulaciones estudiadas (ANOVA, $p > 0,05$), siendo $4,38 \cdot 10^{-4} \pm 1,91 \cdot 10^{-4}$ ($\text{cm} \cdot \text{h}$) en el caso de la solución acuosa, $5,24 \cdot 10^{-4} \pm 1,71 \cdot 10^{-4}$ ($\text{cm} \cdot \text{h}$) en el caso de la emulsión y $5,56 \cdot 10^{-4} \pm 1,11 \cdot 10^{-4}$ ($\text{cm} \cdot \text{h}$) en el hidrogel. El formaldehído presenta un coeficiente de reparto de 1,2 y se disuelve completamente en agua, es fácilmente soluble en éter, alcohol y en otros solventes polares. Esta elevada solubilidad puede ser el factor que contribuya en la difusión del formaldehído a través de la membrana sin quedar retenido en ella cuando se aplican las formulaciones estudiadas. Además, los tiempos de latencia para la difusión desde las tres formulaciones también fueron muy similares y no mostraron entre ellos diferencias estadísticamente significativas (ANOVA, $p > 0,05$), siendo de

7,68 horas para la solución acuosa, de 6,29 horas para la emulsión y de 5,75 horas para el hidrogel. En los tres casos, el tiempo de exposición estimado para que el paso de formaldehído a través de la piel fuera relevante fue muy elevado.

El balance de masas de los ensayos con formaldehído muestra que alrededor del 30% del formaldehído que contienen las muestras se ha podido evaporar durante la realización de los estudios, a pesar de que tanto el compartimento dador como el receptor se protegieron con Parafilm® durante la realización de los ensayos. No se ha profundizado en el análisis de este aspecto, si bien parece *a priori*, más probable que la evaporación se produzca desde el compartimento dador, en el que la cantidad de conservante es mucho más elevada y está más expuesto al ambiente.

Es importante resaltar que las constantes de permeabilidad mencionadas se han obtenido incorporando formaldehído a una concentración del 9% en las formulaciones, en lugar de al 0,2% que es la cantidad máxima permitida. Al igual que en el caso del bronidox, el hecho de haber seleccionado una concentración de formaldehído tan elevada estuvo condicionado por la sensibilidad del método analítico utilizado (método general de colorimetría (*Commission Directive 90/207/EEC*)), para la cuantificación de este conservante. Es cierto que utilizando el método analítico de derivatización post-columna (*Miralles, et al., 2018*) y realizando la microextracción líquido-líquido en fase inversa (RP-DLLME), que en él se describe, se puede determinar formaldehído a concentraciones muy

pequeñas, ya que este método analítico presenta un límite de detección de 0,7 ng/ml y un límite de cuantificación de 2,3 ng/mL. Sin embargo, no fue viable utilizar este método analítico en este ensayo debido a que el número de muestras a analizar para cada ensayo no lo hacía compatible.

A la concentración de formaldehído permitida en la normativa vigente, el flujo transdérmico del conservante que se podría alcanzar sería de 0,29 $\mu\text{g}/(\text{cm}^2\cdot\text{h})$ para la solución, de 0,35 $\mu\text{g}/(\text{cm}^2\cdot\text{h})$ para la emulsión y 0,37 $\mu\text{g}/(\text{cm}^2\cdot\text{h})$ para el hidrogel.

Para las formulaciones que contenían **bronopol** se evaluó la penetración transdérmica de este conservante así como la penetración transdérmica del formaldehído liberado desde el mismo.

El análisis estadístico realizado (ANOVA) mostró diferencias significativas en los parámetros analizados, flujo transdérmico, y periodo de latencia de la difusión de los dos activos. El flujo transdérmico de bronopol desde el hidrogel y la emulsión son muy similares (0,8 y 1,28 $\mu\text{g}/(\text{cm}^2\cdot\text{h})$, respectivamente), e inferiores a los alcanzados con la solución (11,02 $\mu\text{g}/(\text{cm}^2\cdot\text{h})$). En este caso, los resultados evidencian la importancia del vehículo utilizado. Las características físico-químicas del bronopol no difieren mucho del bronidox, tiene un coeficiente de reparto bajo ($\log P=0.6$), pero su solubilidad en agua a temperatura ambiente no es muy elevada 0,28 g/L, por lo que quizá este sea el motivo por el que no se libere en gran cantidad desde la emulsión O/A. Las diferencias observadas en la permeabilidad desde la solución acuosa y el hidrogel son mucho más importantes para el bronopol que para el bronidox. Mientras que en el

caso del bronidox el flujo transdérmico desde el hidrogel se reducía a algo menos de la mitad respecto a la solución, en el caso del bronopol se reduce al 7%. La viscosidad del hidrogel podría haber dificultado en gran medida la difusión del bronopol a su través y haber provocado que quede más retenido en él.

En este ensayo también se encontraron diferencias en los tiempos de latencia, en concreto la solución acuosa presenta un tiempo de latencia de 6,34 h mientras que en el caso del hidrogel y la emulsión este tiempo es cero. Por ello, es importante resaltar que aunque los flujos transdérmicos del bronopol para la emulsión y el hidrogel son muy inferiores a los obtenidos para la solución, la probabilidad de que llegue bronopol al torrente sanguíneo es mayor en el caso del hidrogel y de la emulsión debido a que no presenta tiempo de latencia, es decir el bronopol atraviesa la piel desde el mismo momento en el que el producto cosmético formulado como gel o como emulsión es aplicado sobre la piel.

La observación de que el balance de masas de bronopol al finalizar los estudios sea inferior al 100% confirma que este compuesto, en el periodo de realización de los ensayos, se transforma en formaldehído.

Dado que se valoró formaldehído en el compartimento receptor, y que el incremento de concentración con el tiempo fue lineal, tal como se observa en las figuras 4.13 - 4.15 se pudo caracterizar su cinética.

Los flujos obtenidos para el formaldehído procedente del bronopol incorporado a las formulaciones de estudio también han mostrado

diferencias significativas siendo $0,91 \mu\text{g}/(\text{cm}^2\cdot\text{h})$ para la solución acuosa, $0,24 \mu\text{g}/(\text{cm}^2\cdot\text{h})$ para la emulsión y $0,05 \mu\text{g}/(\text{cm}^2\cdot\text{h})$ para el hidrogel.

Por lo que respecta al tiempo de latencia, fue de la misma magnitud cuando se aplicó el bronopol en solución o en emulsión que cuando se empleó formaldehído directamente, mientras que desde el hidrogel fue superior, llegando a las 11,96 h. Estos resultados apoyan que la liberación de formaldehído desde la solución y la emulsión se produce de una forma rápida, puesto que el perfil de difusión se corresponde con el observado con la aplicación de formaldehído. Por el contrario, la liberación del mismo desde el hidrogel es algo más lenta.

Hay que tener en cuenta que en estos ensayos el formaldehído se ha valorado únicamente en el compartimento receptor. Este puede haberse producido directamente en el compartimento receptor una vez hubiera atravesado la piel el bronopol, o bien en el seno de la formulación y atravesar la piel como tal. Se puede asumir que se genera en formulación, puesto que los tiempos de latencia son más elevados que cuando se aplica formaldehído directamente, aspecto que puede atribuirse a que al proceso de difusión se añade el tiempo de liberación. De acuerdo con los resultados, puede decirse que en solución se inicia la liberación de forma más rápida que desde la emulsión y el hidrogel. Además el tipo de formulación es determinante de la cantidad de formaldehído liberado y actúa como factor limitativo de su paso a través de piel. El valor medio de K_p caracterizado en los estudios en los que se administró formaldehído es $5,06\cdot 10^{-4} \pm 1,57\cdot 10^{-4} (\text{cm}\cdot\text{h})$. A partir de este se calculó la cantidad de

formaldehído liberado desde el bronopol que fue 1806 μg para la solución acuosa, 481,02 μg para la emulsión y 106,71 μg para el hidrogel

La DMDM hidantoína está sujeta a limitación en cuanto a cantidad que puede emplearse en productos cosméticos por un doble motivo, por un lado resulta irritante para la piel por exposición directa, pero además actúa como liberador de formaldehído. Este último aspecto es el que se ha valorado en esta tesis doctoral. Al igual que cuando se ha valorado la cantidad de formaldehído en receptor posterior a la aplicación de bronopol en la formulación, también cuando se utiliza como conservante DMDM hidantoína aparecen cantidades de formaldehído en el compartimento receptor crecientes con el tiempo que permiten caracterizar su cinética. En este caso no se ha valorado la DMDM hidantoína como tal, ya que su mecanismo de acción como conservante se basa únicamente en la formación paulatina de formaldehído.

De acuerdo con los resultados obtenidos, la formulación en la que se incorpora la **DMDM hidantoína** no es determinante para la penetración de formaldehído a través de la piel, al igual que sucede con las formulaciones que contienen formaldehído. De hecho el flujo transdérmico de formaldehído ha sido prácticamente idéntico para las tres formulaciones, 0,042 $\mu\text{g}/(\text{cm}^2\cdot\text{h})$ en el caso de la solución acuosa y 0,043 $\mu\text{g}/(\text{cm}^2\cdot\text{h})$ en el caso de la emulsión y del hidrogel. Estos flujos transdérmicos, son muy inferiores a los obtenidos en el ensayo en el que el formaldehído se utiliza como conservante en las formulaciones. Esta diferencia es atribuible a la existencia de una correlación directa entre la concentración de un activo

en el vehículo y su paso a través de la membrana. Si se toma como referencia los valores de coeficiente de permeabilidad de formaldehído calculados en los ensayos precedentes, se puede aproximar la concentración de formaldehído que se mantiene constante en formulación durante el ensayo realizado con DMDM hidantoína, aproximadamente 83 µg/mL formaldehído.

En este ensayo, los tiempos de latencia del formaldehído (6,9, 5,21 y 7,75 horas, para la solución, emulsión e hidrogel, respectivamente) se corresponden con los obtenidos en las formulaciones que contienen formaldehído. Estos resultados apoyan que la liberación de formaldehído se produce de una forma rápida, puesto que el perfil de difusión se corresponde con el observado con la aplicación de formaldehído.

Los resultados indican que los productos cosméticos que contengan estos conservantes liberadores de formaldehído (bronopol o DMDM hidantoína), si bien la liberación de formaldehído se inicia desde su aplicación sobre la piel, se necesitan tiempos de exposición relativamente elevados para que el paso de formaldehído a través de la misma sea relevante.

Se debe considerar que todos los ensayos se han realizado en condiciones de oclusión de la piel, lo que puede aumentar la absorción del conservante, ya que la oclusión ocasiona un incremento en la temperatura y humedad de la capa córnea y produce la dilatación de los poros de la piel. Por tanto, cabe suponer que en condiciones normales la absorción transdérmica *in vivo* podría ser algo inferior, al menos desde las

formulaciones en solución e hidrogel ya que estas, por sí mismas, no tienen un efecto oclusivo.

Es importante conocer que desde un punto de vista sanitario y toxicológico las nitrosaminas se encuentran en el punto de mira debido a su marcado carácter carcinogénico (COLIPA, 2009). El Reglamento UE (Reglamento Europeo, 2009) prohíbe su presencia en los productos cosméticos, pero es posible encontrarlas al producirse la nitrosación de grupos amino secundarios presentes en algunas impurezas que puedan contener los cosméticos comercializados (Billedeau, S. M. et al., 1994). Son agentes nitrosantes algunos de los conservantes estudiados en esta tesis como el bronopol o el bronidox, pero además se ha demostrado que el formaldehído ejerce un efecto catalítico en la formación de nitrosaminas (COLIPA, 2009). En el trabajo realizado, las formulaciones ensayadas fueron elaboradas en el mismo momento de su uso y con la mínima cantidad de componentes, lo que redujo drásticamente la presencia de impurezas y en consecuencia la posible formación de nitrosaminas. Sin embargo, sería interesante determinar la formación de nitrosaminas durante el proceso de permeabilidad cutánea para estos conservantes, ya que hasta el momento este hecho no está esclarecido.

El formaldehído, además de ser un potencial carcinógeno, es un potente irritante que puede afectar la piel, a la mucosa oral y a la conjuntiva (Scheman et al., 2008). Por este motivo, es importante tener en cuenta que la toxicidad del formaldehído se puede manifestar sin que este acceda a la circulación sistémica. De hecho, la dermatitis de contacto que

sufren en muchas ocasiones pacientes alérgicos al formaldehído puede resultar crónica, ya que resulta casi imposible evitar el contacto por completo tanto a nivel laboral como a nivel domiciliario. Estas dermatitis de contacto se presentan a menudo en las manos de muchas mujeres, ya que por razones sociales y culturales en general están más expuestas a los productos de limpieza que en muchas ocasiones dañan la barrera cutánea, facilitándose así la penetración del formaldehído que se encuentra presente en los mismos productos de limpieza, o en productos de higiene o cosmética (Agher et al., 1999). Además, determinados grupos de población como son los peluqueros y sanitarios desarrollan con frecuencia dermatitis de contacto ocupacional, que se atribuye al uso de productos que contienen formaldehído o sustancias liberadores de formaldehído, entre ellos los aceites de corte o jabones (Aalto-Korte et al., 2008). Ocurre en muchas ocasiones que el evento primario no es la sensibilidad al formaldehído, sino que se da primero una dermatitis irritativa y posteriormente una sensibilización al formaldehído como consecuencia de una mayor penetración por deterioro de la barrera cutánea (Latorre, et al., 2011). Además, no toda la alergia producida por los liberadores de formaldehído es producida por el formaldehído liberado, sino que algunos de sus componentes pueden actuar también como alérgenos (Kireche, et al., 2010). La prevalencia de sensibilización al formaldehído se encuentra alrededor de un 2%. Y se incrementa a un 36,4% la prevalencia de pacientes que son alérgicos al formaldehído y también lo son a una o más sustancias liberadoras de formaldehído. En el caso de bronopol, el porcentaje de pacientes que presenta sensibilización debida al

formaldehído liberado es pequeño, en su gran mayoría las alergias son causadas por el bronopol en sí (*Latorre, et al., 2011*).

En un sentido conservador, los pacientes alérgicos al formaldehído deberían evitar su uso, aunque esta restricción es difícil de llevar a la práctica debido al elevado número de productos de uso habitual que lo contienen. Además, deberían restringir el empleo regular de productos que contengan sustancias liberadoras de formaldehído.

A pesar de que las limitaciones analíticas con las que se ha contado en la realización de este trabajo no han permitido un análisis profundo del proceso de liberación de formaldehído a partir de bronopol y DMDM hidantoína y su repercusión en su paso a través de la piel, los resultados obtenidos permiten comprobar que es difícil conocer la cantidad de formaldehído que se libera desde los liberadores del mismo, puesto que el tipo de formulación que se seleccione, así como la concentración del liberador empleada, condicionan este proceso.

Teniendo en cuenta las concentraciones autorizadas por la normativa vigente, una vez calculados los porcentajes de cada conservante estudiado que llegan al torrente circulatorio, se puede aproximar la exposición sistémica y evaluar el riesgo de su empleo.

La evaluación de la toxicidad del **bronopol** se recoge desde diversas perspectivas. Por una parte, el valor de LD₅₀ de bronopol para conejos por vía transdérmica se estima que es de 64-160 mg/kg. Los valores de NOEL (Nivel sin efecto adverso observable) de 2 mg/Kg/día y LOAEL (nivel mínimo

con efecto adverso observable) de 5mg/Kg/día se basan en pruebas de irritación dérmica. Por último, para la exposición crónica por vía tópica se establece un NOEL (Nivel sin efecto observable) de 10 mg/kg/día, que se basa en los valores de absorción oral, y a falta de información sobre absorción transdérmica se asume que se absorbe el 100% de la dosis aplicada ([archive.epa.gov>pesticides>web>pdf>2770red](http://archive.epa.gov/pesticides/web/pdf/2770red)). La concentración autorizada de **bronopol** para su uso en cosméticos es de un 1 mg/g. De acuerdo con los resultados obtenidos en esta tesis, solo llegaría al torrente circulatorio el 0,55% en el caso de que la formulación fuera una emulsión y mucho menos en el caso de otras formulaciones, considerando siempre una exposición prolongada al producto. Por lo que para llegar a alcanzar una exposición equivalente al NOEL para un efecto irritante se requeriría estar expuesto a más de 25 kg de formulación de forma continua (y 5 veces este valor para que se produjeran efectos sistémicos), lo que es totalmente improbable. Estos cálculos se han aproximado sin considerar la eliminación que se va produciendo en el organismo a medida que se va absorbiendo, por lo que con un criterio conservador están sobreestimados. Por ello, se puede afirmar que las concentraciones que indica la normativa vigente son suficientemente seguras para este conservante, incluso podrían emplearse concentraciones superiores.

Por otro lado, en el caso del **bronidox**, la concentración autorizada para cosméticos es del 0,1%. De ese porcentaje solo llegaría al torrente circulatorio el 22,5% en el caso de la solución y el 13,9% en el caso de que la formulación fuera un hidrogel, siempre y cuando se estuviera expuesto durante un largo periodo de tiempo. Este conservante, de acuerdo a la

normativa, solo puede ser usado en sustancias de enjuague, lo que reduce mucho el tiempo de exposición. Si se tiene en cuenta que el LD50 por vía oral para ratón es de 590 mg/kg y 455 mg/kg para ratas (<http://www.metabolomicscentre.ca>), se puede afirmar que las concentraciones que indica la normativa actual para este conservante son muy seguras.

En el caso del **formaldehído**, la concentración autorizada para cosméticos es de 0,1%. De ese porcentaje solo llegaría al torrente circulatorio el 1% tras un largo periodo de exposición. Además es interesante destacar que la semivida del formaldehído es de apenas 1 minuto, por lo que en aproximadamente 10 minutos se habría eliminado prácticamente toda la cantidad de formaldehído acumulada. En este caso la absorción sería el factor limitativo ya que su eliminación es mucho más rápida. El NOAEL de exposición crónica dérmica es de 2050 mg/kg/día (Registration Dossier - ECHA) y la LD50 por vía oral para ratas es de 100mg/kg (Til, et al., 1988), por lo que una vez más se puede afirmar que las concentraciones que indica la normativa para este conservante son suficientemente seguras.

CAPITULO 5

5 RESUMEN Y CONCLUSIONES.

El objetivo de este trabajo de investigación ha sido evaluar la absorción transdérmica de diversos conservantes de uso restringido en cosméticos (bronopol, bronidox y formaldehído). Para ello se han realizado ensayos *in vitro* con piel de oreja de cerdo procedentes de animales utilizados en otros proyectos de investigación autorizados y que fueron suministradas por el animalario de la Facultad de Medicina de la Universitat de València. Estos ensayos de permeabilidad fueron realizados con celdas de difusión tipo Franz. Los conservantes seleccionados se incorporaron a tres tipos de formulaciones cosméticas: una solución acuosa, un hidrogel y una emulsión para poder determinar si estos conservantes en presencia o ausencia de una serie de materias primas, de uso común en los preparados cosméticos, modifican sus propiedades cinéticas.

Se calcularon los valores de flujo transdérmico y periodo de latencia para los conservantes ensayados en presencia de los vehículos seleccionados para aportar información que pueda mejorar el cálculo de la dosis de exposición sistémica (SED) y por lo tanto seleccionar el margen de seguridad (MoS) de los conservantes estudiados. Además, para caracterizar la absorción transdérmica del bronidox fue necesario el desarrollo y la validación de un nuevo método analítico.

Del trabajo realizado se han obtenido las siguientes conclusiones:

1. El método analítico desarrollado para la cuantificación de bronidox por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), y con fotodiodo de

detección UV/visible, permite cuantificar de forma sensible y fiable las cantidades de bronopol en las muestras procedentes del ensayo de absorción transdérmica. Demostró ser específico, presentar buena linealidad, exactitud y precisión, siendo los límites de detección y cuantificación de 28,70 $\mu\text{g/mL}$ y 95,69 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

2. El grado de absorción del **bronidox** cuando se administra sobre la piel en diferentes formas tópicas es función del tipo de excipientes presentes en las formulaciones cosméticas que contienen el conservante. Las emulsiones son los sistemas que menos promueven la absorción transdérmica del bronidox.
3. Los excipientes utilizados en las formulaciones cosméticas que contienen **bronopol** condicionan la penetración transdérmica de este conservante, siendo la solución acuosa el medio que más promueve su absorción transdérmica.
4. La absorción transdérmica de formaldehído, aplicado directamente o como DMDM hidantoína, no está determinada por los excipientes utilizados en las formulaciones cosméticas. Sin embargo, la penetración transdérmica del formaldehído a partir de las formulaciones que contienen bronopol se modifica de acuerdo con la formulación empleada, y es superior cuando se emplea solución acuosa.
5. Teniendo en cuenta las concentraciones autorizadas por la normativa europea y una vez calculados para cada conservante los porcentajes que llegan al torrente circulatorio, se puede concluir

que el uso de estas sustancias en las condiciones exigidas por la normativa vigente es suficientemente seguro.

CAPITULO 6

6 BIBLIOGRAFÍA

Aalto-Korte, K., Kuuliala, O., Suuronen, K. U., & Alanko, K. (2008). Occupational contact allergy to formaldehyde and formaldehyde releasers. *Contact Dermatitis*, 59(5), 280-289.

Aalto-Korte, K., & Turpeinen, M. (1993). Transepidermal water loss and absorption of hydrocortisone in widespread dermatitis. *British Journal of Dermatology*, 128(6), 633-635.

Abd, E., Yousef, S. A., Pastore, M. N., Telaprolu, K., Mohammed, Y. H., Namjoshi, S., ... & Roberts, M. S. (2016). Skin models for the testing of transdermal drugs. *Clinical pharmacology: advances and applications*, 8, 163.

AEMPS. «Garantías Sanitarias de los Productos Cosméticos». <https://www.aemps.gob.es/informa/notasInformativas/cosmeticosHigiene/2016/docs/COS_2-2016-garantias-sanitarias.pdf>. [Consulta: 15 de abril de 2019].

AENOR (2003). Cosmetic raw materials. 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxane. Quantification of 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxane by high performance liquid chromatography (HPLC). UNE 84640:2003. Madrid. AENOR. [Consulta: 23 de octubre de 2017].

Agner, T., Flyvholm, M. A., & Menné, T. (1999). Formaldehyde allergy: a follow-up study. *American Journal of Contact Dermatitis*, 10(1), 12-17.

Alexandersson, R., Kolmodin-Hedman, B., & Hedenstierna, G. (1982). Exposure to formaldehyde: effects on pulmonary function. *Archives of Environmental Health: An International Journal*, 37(5), 279-284.

Allevato, M. (2006). Cosméticos—maquillajes. *Act Terap Dermatol*, 29(200), 200-208.

Álvarez-Rivera, G., Llompарт, M., Garcia-Jares, C., & Lores, M. (2015). Identification of unwanted photoproducts of cosmetic preservatives in personal care products under ultraviolet-light using solid-phase microextraction and micro-matrix solid-phase dispersion. *Journal of Chromatography A*, 1390, 1-12.

Álvarez-Rivera, G., Llompарт, M., Lores, M., & Garcia-Jares, C. (2018). Preservatives in cosmetics: Regulatory aspects and analytical methods. *In Analysis of Cosmetic Products* (pp. 175-224). Elsevier.

Andega, S., Kanikkannan, N., & Singh, M. (2001). Comparison of the effect of fatty alcohols on the permeation of melatonin between porcine and human skin. *Journal of controlled release*, 77(1-2), 17-25.

Anderson, B. D., & Raykar, P. V. (1989). Solute structure-permeability relationships in human stratum corneum. *Journal of investigative dermatology*, 93(2), 280-286.

- Barker, N., & Hadgraft, J.** (1981). Facilitated percutaneous absorption: a model system. *International Journal of Pharmaceutics*, 8(3), 193-202.
- Barker, N., Hadgraft, J., & Rutter, N.** (1987). Skin permeability in the newborn. *Journal of investigative dermatology*, 88(4), 409-411.
- Barry, B. W.** (1983). Methods for studying percutaneous absorption. *Dermatological formulation*, 234-250.
- Barry, B. W.** (1987). Mode of action of penetration enhancers in human skin. *Journal of controlled release*, 6(1), 85-97.
- Barry, B. W., & Bennett, S. L.** (1987). Effect of penetration enhancers on the permeation of mannitol, hydrocortisone and progesterone through human skin. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 39(7), 535-546.
- Barry, B. W.** (1991). Lipid-protein-partitioning theory of skin penetration enhancement. *Journal of Controlled Release*, 15(3), 237-248.
- Barusi, Á., Medina, F. X., & Colesanti, G. (Eds.)**. (1998). *El color en la alimentación mediterránea: elementos sensoriales y culturales de la nutrición* (Vol. 115). Icaria Editorial.
- Berardesca, E., De Rigal, J., Leveque, J. L., & Maibach, H. I.** (1991). In vivo biophysical characterization of skin physiological differences in races. *Dermatology*, 182(2), 89-93.
- Bergfeld, W. F., Belsito, D. V., Marks Jr, J. G., & Andersen, F. A.** (2005). Safety of ingredients used in cosmetics. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 52(1), 125-132.
- Bergh, M., Magnusson, K., Nilsson, J. L. G., & Karlberg, A. T.** (1998). Formation of formaldehyde and peroxides by air oxidation of high purity polyoxyethylene surfactants. *Contact Dermatitis*, 39(1), 14-20.
- Berner, B., & Liu, P.** (1995). Alcohols. Percutaneous penetration enhancers, 45-60.
- Berton, T. R., Pavone, A., & Fischer, S. M.** (2001). Ultraviolet-B irradiation alters the cell cycle machinery in murine epidermis in vivo. *Journal of investigative dermatology*, 117(5), 1171-1178.
- Billedeau, S. M., Heinze, T. M., Wilkes, J. G., & Thompson Jr, H. C.** (1994). Application of the particle beam interface to high-performance liquid chromatography-thermal energy analysis and electron impact mass spectrometry for detection of non-volatile N-nitrosamines. *Journal of Chromatography A*, 688(1-2), 55-65.

- BOE.** «RealDecreto1599/1997». <<https://www.boe.es/boe/dias/1997/10/31/pdfs/BOE-A-31486-31513.pdf>>. [Consulta: 12 de marzo de 2019], 1997.
- BOE.** «Real Decreto 85/2018». <<https://www.boe.es/boe/dias/2018/02/27/pdfs/BOE-A-2018-2693.pdf>>. [Consulta: 15 de abril de 2019]. 2018.
- Bouwstra, J. A., Gooris, G. S., Weerheim, A., Kempenaar, J., & Ponec, M.** (1995). Characterization of stratum corneum structure in reconstructed epidermis by X-ray diffraction. *Journal of lipid research*, 36(3), 496-504.
- Bowman, P. D., Schuschereba, S. T., Lawlor, D. F., Gilligan, G. R., Mata, J. R., & DeBaere, D. R.** (1997). Survival of human epidermal keratinocytes after short-duration high temperature: synthesis of HSP70 and IL-8. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 272(6), C1988-C1994.
- Bressler, R. S., & Bressler, C. H.** (1989). Functional anatomy of the skin. *Clinics in podiatric medicine and surgery*, 6(2), 229-246.
- Bronaugh, R. L., Stewart, R. F., & Congdon, E. R.** (1982). Methods for in vitro percutaneous absorption studies II. Animal models for human skin. *Toxicology and applied pharmacology*, 62(3), 481-488.
- Bronaugh, R. L.** (2004). Methods for in vitro percutaneous absorption. *Marzulli and Maibach's Dermatotoxicology*, 7, 307-10.
- Bruce, A. W.** (1984). Basic quality assurance and quality control in the clinical laboratory. Little, Brown.
- Bryce, D. M., Croshaw, B., Hall, J. E., Holland, V. R., & Lessel, B.** (1978). The activity and safety of the antimicrobial agent bronopol (2-bromo-2-nitropropan-1, 3-diol). *J. Soc. Cosmet. Chem*, 29, 3-24.
- Burge, S.** (1994). Cohesion in the epidermis. *British Journal of Dermatology*, 131(2), 153-159.
- Butlerow, A.** (1859). Ueber einige Derivate des Jodmethylens. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 111(2), 242-252.
- Buttar, H. S., & Downie, R. H.** (1980). The biotransformation and disposition of bronopol following topical and intravenous administration to rats. *Toxicology letters*, 6(2), 101-107.

Carrillo, P. (2009). Propiedades del aceite de oliva en el mantenimiento de la integridad cutánea. *Seminario médico*, 61(2), 61-90.

Caussin, J., Gooris, G. S., Janssens, M., & Bouwstra, J. A. (2008). Lipid organization in human and porcine stratum corneum differs widely, while lipid mixtures with porcine ceramides model human stratum corneum lipid organization very closely. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1778(6), 1472-1482.

Cázares-Delgadillo, J., Naik, A., Kalia, Y. N., Quintanar-Guerrero, D., & Ganem-Quintanar, A. (2005). Skin permeation enhancement by sucrose esters: a pH-dependent phenomenon. *International journal of pharmaceutics*, 297(1-2), 204-212.

CEIIER. Comité de Ética del Instituto de Injvestigaciones de Enfermedades Raras. Recomendaciones sobre los aspectos éticos de las colecciones de muestras o bancos de materiales humanos con fines de investigación biomédica. España: Instituto de salud Carlos III, (2007). [Consulta: 15 de abril de 2019]

Challis, B. C., Trew, D. F., Guthrie, W. G., & Roper, D. V. (1995).Reduction of nitrosamines in cosmetic products. *International journal of cosmetic science*, 17(3), 119-131.

Chang, S. K., & Riviere, J. E. (1991). Percutaneous absorption of parathion in vitro in porcine skin: effects of dose, temperature, humidity, and perfusate composition on absorptive flux. *Toxicological Sciences*, 17(3), 494-504.

Chatelain, E., Gabard, B., & Surber, C. (2003). Skin penetration and sun protection factor of five UV filters: effect of the vehicle. *Skin Pharmacology and Physiology*, 16(1), 28-35.

Chattaraj, S. C., & Walker, R. B. (1995).Penetration enhancer classification.In Percutaneous penetration enhancers (pp. 5-20).CRC Press Boca Raton, FL.

Chen, Q. P., & Li, Q. T. (2001). Effect of cardiolipin on proton permeability of phospholipid liposomes: the role of hydration at the lipid–water interface. *Archives of biochemistry and biophysics*, 389(2), 201-206.

Cole, P., Adami, H. O., Trichopoulos, D., & Mandel, J. (2010).Formaldehyde and lymphohematopietic cancers: a review of two recent studies. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 58(2), 161-166.

COLIPA, The European Cosmetics Association "Technical guidance document on minimising and determining nitrosamines in cosmetics", 2009.[Consulta: 18 de septiembrel de 2019].

Collier, P. J., Ramsey, A. J., Austin, P., & Gilbert, P. (1990). Growth inhibitory and biocidal activity of some isothiazolone biocides. *Journal of Applied Bacteriology*, 69(4), 569-577.

Commission Directive 90/207/EEC of 4 April 1990 amending the Second Directive 82/434/EEC on the approximation of the laws of the Member State relating to methods of analysis necessary for checking the composition of cosmetic products, *Official Journal L108,28/04/1990P.0092-0101 Finnish special edition: Chapter 13 Volume 19 P. 0177 Swedish special edition: Chapter 13 Volume 19 P. 017*. [Consulta: 18 de marzo de 2019].

Cooper, E. R. (1984). Increased skin permeability for lipophilic molecules. *Journal of pharmaceutical sciences*, 73(8), 1153-1156.

Cornwell, P. A., & Barry, B. W. (1993). The routes of penetration of ions and 5-fluorouracil across human skin and the mechanisms of action of terpene skin penetration enhancers. *International Journal of Pharmaceutics*, 94(1-3), 189-194.

Cosmetics Europe, 2008. Guidelines for the Evaluation of the Efficacy of Cosmetic Products. www.cosmeticseurope.eu/publications-cosmetics-europe-association/guidelines.html?view=item&id=23. [Consulta: 11 de abril de 2018].

Crofton, K. M., Paul, K. B., DeVito, M. J., & Hedge, J. M. (2007). Short-term in vivo exposure to the water contaminant triclosan: evidence for disruption of thyroxine. *Environmental toxicology and pharmacology*, 24(2), 194-197.

Croshaw, B., Groves, M. J., & Lessel, B. (1964). Some properties of bronopol, a new antimicrobial agent active against *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, (Suppl. 127).

Cross, S. E., & Roberts, M. S. (1995). Importance of dermal blood supply and epidermis on the transdermal iontophoretic delivery of monovalent cations. *Journal of pharmaceutical sciences*, 84(5), 584-592.

Cross, S. E., & Roberts, M. S. (2008). Use of in vitro human skin membranes to model and predict the effect of changing blood flow on the flux and retention of topically applied solutes. *Journal of pharmaceutical sciences*, 97(8), 3442-3450.

Darbre, P. D. (2006). Environmental oestrogens, cosmetics and breast cancer. *Best practice & research clinical endocrinology & metabolism*, 20(1), 121-143.

Davies, D. J., Ward, R. J., & Heylings, J. R. (2004). Multi-species assessment of electrical resistance as a skin integrity marker for in vitro percutaneous absorption studies. *Toxicology in vitro*, *18*(3), 351-358.

De Groot, A. C., Flyvholm, M. A., Lensen, G., Menné, T., & Coenraads, P. J. (2009). Formaldehyde-releasers: relationship to formaldehyde contact allergy. Contact allergy to formaldehyde and inventory of formaldehyde-releasers. *Contact dermatitis*, *61*(2), 63-85.

De Groot, A. C., & Veenstra, M. (2010). Formaldehyde-releasers in cosmetics in the USA and in Europe. *Contact Dermatitis*, *62*(4), 221-224.

Diez-Sales, O., Perez-Sayas, E., Martín-Villodre, A., & Herráez-Domínguez, M. (1993). The prediction of percutaneous absorption: I. Influence of the dermis on in vitro permeation models. *International journal of pharmaceutics*, *100*(1-3), 1-7.

DIRECTIVE COUNCIL.«76/768/EEC on the Approximation of the Laws of the Member States Relating to Cosmetic Products».European Commission, Brussels, Belgium. 1999. [Consulta: 28 de diciembre de 2018].

Dossing, M., & Olsen, J. H. (1982). Formaldehyde-induced symptoms in day-care workers. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J*, *43*, 366-370.

ECETOC (European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals).percutaneous absorption (Monograph No.20). Brussels. 1993,6;pp.1-80. [Consulta: 15 de abril de 2019].

Eckhart, L., Declercq, W., Ban, J., Rendl, M., Lengauer, B., Mayer, C., ...&Tschachler, E. (2000). Terminal differentiation of human keratinocytes and stratum corneum formation is associated with caspase-14 activation. *Journal of Investigative Dermatology*, *115*(6), 1148-1151.

Elias, P. M. (1983). Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *Journal of Investigative Dermatology*, *80*.

Elias, P. M. (2007). The skin barrier as an innate immune element.In *Seminars in immunopathology* (Vol. 29, No. 1, p. 3).Springer-Verlag.

Emeis, D., Anker, W., & Wittern, K. P. (2007).Quantitative ¹³C NMR spectroscopic studies on the equilibrium of formaldehyde with its releasing cosmetic preservatives. *Analytical chemistry*, *79*(5), 2096-2100.

Engelhardt, H., & Klinkner, R. (1985).Determination of free formaldehyde in the presence of donators in cosmetics by HPLC and post-column derivation. *Chromatographia*, *20*(9), 559-565.

Espinosa, M., & Encarnación, J. A. M. (2013). Germaine de Capuccini: iniciativa empresarial y entorno socioeconómico en el desarrollo de la industria cosmética española. *Revista de Historia Industrial*, (51), 79-106.

Estrin, N.F. (Ed.), (1973). *Cosmetic Ingredient Dictionary*. CTFA – Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association, Washington, DC.

Fasth, I. M., Ulrich, N. H., & Johansen, J. D. (2018). Ten-year trends in contact allergy to formaldehyde and formaldehyde-releasers. *Contact dermatitis*, 79(5), 263-269.

FDA. Guidelines for Industry. Analytical procedures and methods validation. 2000.

Feldmann, R. J., & Malbach, H. I. (1965). Penetration of ¹⁴C hydrocortisone through normal skin: the effect of stripping and occlusion. *Archives of Dermatology*, 91(6), 661-666.

Femenía-Font, A., Balaguer-Fernández, C., Merino, V., & López-Castellano, A. (2006). Combination strategies for enhancing transdermal absorption of sumatriptan through skin. *International journal of pharmaceutics*, 323(1-2), 125-130.

Fernandez, C., Nielloud, F., Fortuné, R., Vian, L., & Marti-Mestres, G. (2002). Benzophenone-3: rapid prediction and evaluation using non-invasive methods of in vivo human penetration. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 28(1), 57-63.

Fernández, M. R., Biosca, J. A., Norin, A., Jörnvall, H., & Parés, X. (1995). Class III alcohol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*: structural and enzymatic features differ toward the human/mammalian forms in a manner consistent with functional needs in formaldehyde detoxication. *FEBS letters*, 370(1-2), 23-26.

Ferry, L. L., Argentieri, G., & Lochner, D. H. (1995). The comparative histology of porcine and guinea pig skin with respect to iontophoretic drug delivery. *Pharmaceutica Acta Helveticae*, 70(1), 43-56.

Final Report on the Safety Assessment of 5-Bromo-5-Nitro-1,3-Dioxane. International Journal of Toxicology. 1990;9(2):279-88. [Consulta: 8 de febrero de 2019].

Flynn, G. L., & Yalkowsky, S. H. (1972). Correlation and prediction of mass transport across membranes I: Influence of alkyl chain length on flux-determining properties of barrier and diffusant. *Journal of pharmaceutical sciences*, 61(6), 838-852.

Flyvholm, M. A. (1997). Formaldehyde exposure at the workplace and in the environment. *Occupational Health and Industrial Medicine*, 3(37), 131.

- Fore J.A.**(2006) review of skin and the effects of aging on skin structure and function. *Ostomy Wound Manage* ,52(9), 24-37.
- Franz, T. J.** Percutaneous absorption. On the relevance of in vitro data.. I. *Inwst. Dermatol.*, 64 (1975) 190, 19.
- Franz, T. J.** (1978). The finite dose technique as a valid in vitro model for the study of percutaneous absorption in man. In *Skin-Drug Application and Evaluation of Environmental Hazards* (Vol. 7, pp. 58-68). Karger Publishers.
- Franz, T. J., Lehman, P. A., & Raney, S. G.** (2009). Use of excised human skin to assess the bioequivalence of topical products. *Skin pharmacology and physiology*, 22(5), 276-286.
- García González, J. M.** (2015). *La transformación de la longevidad en España de 1910 a 2009* (Vol. 290). CIS-Centro de Investigaciones Sociológicas.
- Geis, P. A.** (2006). Preservation strategies. *Cosmetic microbiology, 2nd ed., Taylor & Francis Group, New York*, 163-180.
- Ghannoum, M., Thomson, M., Bowman, W., & Al-Khalil, S.** (1986). Mode of action of the antimicrobial compound 5-Bromo-5-nitro-1, 3-dioxane (Bronidox). *Folia microbiologica*, 31(1), 19-31.
- Gibson, W. T., & Teall, M. R.** (1983). Interactions of C12 surfactants with the skin: changes in enzymes and visible and histological features of rat skin treated with sodium lauryl sulphate. *Food and Chemical Toxicology*, 21(5), 587-594.
- Girolomoni, G., Tessari, G., & Bos, J. D.** (2006). The skin as an immunologic organ. *Handbook of Systemic Autoimmune Diseases*, 5, 3-9.
- González, J. M. G.** (2014). ¿ Por qué vivimos más? Descomposición por causa de la esperanza de vida española de 1980 a 2009. *Revista Española de Investigaciones Sociológicas (REIS)*, 148(1), 39-59.
- González Minero, F. J., & Bravo Díaz, L.** (2017). Historia y actualidad de productos para la piel, cosméticos y fragancias. Especialmente los derivados de las plantas. *Ars Pharmaceutica (Internet)*, 58(1), 5-12.
- González Serrano, P.** (1996). El vestido y la cosmética en el Antiguo Egipto.
- Goon, A. T. J., Gruvberger, B., Persson, L., Isaksson, M., & Bruze, M.** (2003). Presence of formaldehyde in topical corticosteroid preparations available on the Swedish market. *Contact dermatitis*, 48(4), 199-203.

Gottschalck, T.E., McEwen, G.N. (2006). International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook, tenth ed. CTFA – Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association, Washington, DC.

Gupta, R. R., Jain, S. K., & Varshney, M. (2005). AOT water-in-oil microemulsions as a penetration enhancer in transdermal drug delivery of 5-fluorouracil. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 41(1), 25-32.

Hadgraft, J., Walters, K. A., & Guy, R. H. (1992, June). Epidermal lipids and topical drug delivery. In *Seminars in dermatology* (Vol. 11, No. 2, pp. 139-144).

Hadgraft, J., Peck, J., Williams, D. G., Pugh, W. J., & Allan, G. (1996). Mechanisms of action of skin penetration enhancers/retarders: Azone and analogues. *International Journal of Pharmaceutics*, 141(1-2), 17-25.

Hadgraft, J., & Valenta, C. (2000). pH, pKa and dermal delivery. *International journal of pharmaceutics*, 200(2), 243-247.

Hartmann, A. A. (1983). Effect of occlusion on resident flora, skin-moisture and skin-pH. *Archives of dermatological research*, 275(4), 251-254.

Harvey, P. W. (2003). Parabens, oestrogenicity, underarm cosmetics and breast cancer: a perspective on a hypothesis. *Journal of Applied Toxicology: An International Journal*, 23(5), 285-288.

Hauksson, I., Pontén, A., Isaksson, M., Hamada, H., Engfeldt, M., & Bruze, M. (2016). Formaldehyde in cosmetics in patch tested dermatitis patients with and without contact allergy to formaldehyde. *Contact Dermatitis*, 74(3), 145-151.

He, K., Huang, J., Lagenaur, C. F., & Aizenman, E. (2006). Methylisothiazolinone, a neurotoxic biocide, disrupts the association of SRC family tyrosine kinases with focal adhesion kinase in developing cortical neurons. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 317(3), 1320-1329.

Heck, D. H. A., Casanova, M., & Starr, T. B. (1990). Formaldehyde toxicity—new understanding. *Critical reviews in toxicology*, 20(6), 397-426.

Hendriks, F. M. (2001). Mechanical behaviour of human skin in vivo—a literature review. In *Nat. Lab. Unclassified Report 820. Philips Research Laboratories*.

Hendriks, F. M. (2005). Mechanical behaviour of human epidermal and dermal layers in vivo.

Hilton, J., Woollen, B. H., Scott, R. C., Auton, T. R., Trebilcock, K. L., & Wilks, M. F. (1994). Vehicle effects on in vitro percutaneous absorption through rat and human skin. *Pharmaceutical research*, 11(10), 1396-1400.

Hung, H., Blanchard, P., Halsall, C.J., Bidleman, T.F., Stern, G.A., Fellin, P., Muir, D.C., Barrie, L.A., Jantunen, L.M., Helm, P.A., Ma, J., Konoplev, A.,(2005). *Sci. Total Environ.* 342, 119.

IARC. International Agency for Research on Cancer.(2006). Formaldehyde, 2-Butoxyethanol and 1-tert-Butoxypropan-2-ol. In Formaldehyde, 2-Butoxyethanol and 1-tert-Butoxypropan-2-ol. [Consulta: 26 de mayo de 2019].

ICCR Working Group on Cosmetic Product Preservation. General and Technical Frequently Asked Questions (FAQs) on Preservatives in Cosmetics. [Monografía en Internet]. Ottawa: International Cooperation on Cosmetic Regulation; 2014. Disponible a: <http://ec.europa.eu/DocsRoom/documents/17203/>. [Consulta: 14 de febrero de 2019].

Idson, B. (1975). Percutaneous absorption. *Journal of pharmaceutical sciences*, 64(6), 901-924.

Illel, B., Schaefer, H., Wepierre, J., & Doucet, O. (1991). Follicles play an important role in percutaneous absorption. *Journal of pharmaceutical sciences*, 80(5), 424-427.

ICH, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for humans use, ICH Harmonised Tripartite guideline (2005). Validation of Analytical Procedures: text and Methodology. Q2 (R1). http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Qquality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf. [Consulta: 14 de febrero de 2019].

Iozzo, R. V. (Ed.). (2000). *Proteoglycans: structure, biology and molecular interactions*. CRC Press.

ISO 22716:2007, 2007. Cosmetics – Good Manufacturing Practices (GMP) – Guidelines on Good Manufacturing Practices. <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:22716:ed-1:v2:en>. [Consulta: 20 de abril de 2019].

Jacobi, U., Weigmann, H. J., Ulrich, J., Sterry, W., & Lademann, J. (2005). Estimation of the relative stratum corneum amount removed by tape stripping. *Skin Research and Technology*, 11(2), 91-96.

Jeong, S. H., Kim, B. Y., Kang, H. G., Ku, H. O., & Cho, J. H. (2005). Effects of butylated hydroxyanisole on the development and functions of reproductive system in rats. *Toxicology*, 208(1), 49-62.

Jones, P. H., & Watt, F. M. (1993). Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. *Cell*, 73(4), 713-724.

Jung, E. C., & Maibach, H. I. (2014). Animal models for percutaneous absorption. In *Topical Drug Bioavailability, Bioequivalence, and Penetration* (pp. 21-40). Springer, New York, NY.

Kabara, J. J. (1997). Preservative-free and self-preserving cosmetics and drugs: Principles and Practices. CRC Press.

Kapupara, P., Parekh, D., & Shah, K. (2016). Method development and validation of Bronopol (Preservative) and its Stability Indicating Study by UV Spectrophotometry. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 9(7), 916-918.

Karande, P., & Mitragotri, S. (2002). High throughput screening of transdermal formulations. *Pharmaceutical research*, 19(5), 655-660.

Kennedy, A. H., Golden, G. M., Gay, C. L., Guy, R. H., Francoeur, M. L., & Mak, V. H. (1996). Stratum corneum lipids of human epidermal keratinocyte air-liquid cultures: implications for barrier function. *Pharmaceutical research*, 13(8), 1162-1167.

Kim, Y. H., Ghanem, A. H., Mahmoud, H., & Higuchi, W. I. (1992). Short chain alkanols as transport enhancers for lipophilic and polar/ionic permeants in hairless mouse skin: mechanism (s) of action. *International journal of pharmaceuticals*, 80(1-3), 17-31.

Kireche, M., Gimenez-Arnau, E., & Lepoittevin, J. P. (2010). Preservatives in cosmetics: reactivity of allergenic formaldehyde-releasers towards amino acids through breakdown products other than formaldehyde. *Contact Dermatitis*, 63(4), 192-202.

Kondo, S., Hozumi, Y., & Aso, K. (1990). Long-term organ culture of rabbit skin: effect of EGF on epidermal structure in vitro. *Journal of investigative dermatology*, 95(4), 397-402.

Koziel, J., & Potempa, J. (2013). Protease-armed bacteria in the skin. *Cell and tissue research*, 351(2), 325-337.

Lademann, J., Otberg, N., Jacobi, U., Hoffman, R. M., & Blume-Peytavi, U. (2005, December). Follicular penetration and targeting. In *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* (Vol. 10, No. 3, pp. 301-303). Elsevier.

- Lanigan, R. S., & Yamarik, T. A.** (2002). Final report on the safety assessment of BHT (1). *International journal of toxicology*, 21, 19-94.
- Latorre, N., Silvestre, J. F., & Monteagudo, A. F.** (2011). Dermatitis de contacto alérgica por formaldehído y liberadores de formaldehído. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 102(2), 86-97.
- Lee, C. K., Uchida, T., Kitagawa, K., Yagi, A., Kim, N. S., & Goto, S.** (1994). Skin permeability of various drugs with different lipophilicity. *Journal of pharmaceutical sciences*, 83(4), 562-565.
- Leistner, L.** (2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International journal of food microbiology*, 55(1-3), 181-186.
- Liebert, M. A.** (1988). Final report on the safety assessment of DMDM hydantoin. *Journal of American collage of toxicology*, 7(3).
- Lindström, A., Buerge, I. J., Poiger, T., Bergqvist, P. A., Müller, M. D., & Buser, H. R.** (2002). Occurrence and environmental behavior of the bactericide triclosan and its methyl derivative in surface waters and in wastewater. *Environmental science & technology*, 36(11), 2322-2329.
- Lippert, H** (2012). *Anatomía con orientación clínica para estudiantes*. Marbán.(1.9)116-117
- Liu, S., Xie, Q., Chen, J., Sun, J., He, H., & Zhang, X.** (2013). Development and comparison of two dispersive liquid-liquid microextraction techniques coupled to high performance liquid chromatography for the rapid analysis of bisphenol A in edible oils. *Journal of Chromatography A*, 1295, 16-23.
- Löffler, H., Dreher, F., & Maibach, H. I.** (2004). Stratum corneum adhesive tape stripping: influence of anatomical site, application pressure, duration and removal. *British journal of dermatology*, 151(4), 746-752.
- López Agüero, L. C., & Stella, A. M.** (2007). Dermatología estética a través del tiempo. *Revista argentina de dermatología*.
- Lundov, M. D., Moesby, L., Zachariae, C., & Johansen, J. D.** (2009). Contamination versus preservation of cosmetics: a review on legislation, usage, infections, and contact allergy. *Contact Dermatitis*, 60(2), 70-78.
- Lv, C., Hou, J., Xie, W., & Cheng, H.** (2015). Investigation on formaldehyde release from preservatives in cosmetics. *International journal of cosmetic science*, 37(5), 474-478.

Manabe, E., Sugibayashi, K., & Morimoto, Y. (1996). Analysis of skin penetration enhancing effect of drugs by ethanol-water mixed systems with hydrodynamic pore theory. *International journal of pharmaceutics*, 129(1-2), 211-221.

Manchee, R. J., Broster, M. G., Stagg, A. J., & Hibbs, S. E. (1994). Formaldehyde solution effectively inactivates spores of *Bacillus anthracis* on the Scottish island of Gruinard. *Applied and environmental microbiology*, 60(11), 4167-4171.

Marchini, G., Lindow, S., Brismar, H., Ståbi, B., Berggren, V., Ulfgren, A. K., ...& Gudmundsson, G. H. (2002). The newborn infant is protected by an innate antimicrobial barrier: peptide antibiotics are present in the skin and vernix caseosa. *British Journal of Dermatology*, 147(6), 1127-1134.

Marekov, L. N., & Steinert, P. M. (1998). Ceramides are bound to structural proteins of the human foreskin epidermal cornified cell envelope. *Journal of Biological Chemistry*, 273(28), 17763-17770.

Maricich, S. M., Wellnitz, S. A., Nelson, A. M., Lesniak, D. R., Gerling, G. J., Lumpkin, E. A., & Zoghbi, H. Y. (2009). Merkel cells are essential for light-touch responses. *Science*, 324(5934), 1580-1582.

Marro, D., Guy, R. H., & Delgado-Charro, M. B. (2001^a). Characterization of the iontophoretic permselectivity properties of human and pig skin. *Journal of Controlled Release*, 70(1-2), 213-217.

Marsh, G. M. (1982). Proportional mortality patterns among chemical plant workers exposed to formaldehyde. *Occupational and Environmental Medicine*, 39(4), 313-322.

Matyska, M. T., Pesek, J. J., & Yang, L. (2000). Screening method for determining the presence of N-nitrosodiethanolamine in cosmetics by open-tubular capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A*, 887(1-2), 497-503.

Mehta, R. (2007). Topical and transdermal drug delivery: What a pharmacist needs to know. *British Pharmacopoeia*, 2, 756.

Meyer, W., Schwarz, R., & Neurand, K. (1978). The skin of domestic mammals as a model for the human skin, with special reference to the domestic pig. In *Skin-Drug Application and Evaluation of Environmental Hazards* (Vol. 7, pp. 39-52). Karger Publishers.

Miralles, P., Bellver, R., Chisvert, A., & Salvador, A. (2016). Vortex-assisted emulsification semimicroextraction for the analytical control of restricted ingredients in cosmetic

products: determination of bronopol by liquid chromatography. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 408(7), 1929-1934.

Miralles, P., Chisvert, A., Alonso, M. J., Hernandorena, S., & Salvador, A. (2018). Determination of free formaldehyde in cosmetics containing formaldehyde-releasing preservatives by reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction and liquid chromatography with post-column derivatization. *Journal of Chromatography A*, 1543, 34-39.

Mittal, A., Sara, U. V. S., Ali, A., & Aqil, M. (2009). Status of fatty acids as skin penetration enhancers-a review. *Current drug delivery*, 6(3), 274-279.

Mitragotri, S., Anissimov, Y. G., Bunge, A. L., Frasc, H. F., Guy, R. H., Hadgraft, J., ...& Roberts, M. S. (2011). Mathematical models of skin permeability: an overview. *International journal of pharmaceuticals*, 418(1), 115-129.

Mommers, J. M., Ter Meulen, A. C., Van Erp, P. E. J., & Van de Kerkhof, P. C. M. (1999). Influence of tacalcitol on cell cycle kinetics of human keratinocytes following standardized injury. *Skin Pharmacology and Physiology*, 12(4), 174-181.

Montejo, C., García, M. J., & Domínguez-Gil, A. (1986). Monitorización de fármacos: importancia del error analítico. *Revista AEFH*, 10, 257-62.

Montoya, J. L. (2008). Conservantes: tipos y sistemas de conservación. *Offarm: farmacia y sociedad*, 27(1), 58-64.

Moore, K. E., & Stretton, R. J. (1981). The effect of pH, temperature and certain media constituents on the stability and activity of the preservative, Bronopol. *Journal of Applied Bacteriology*, 51(3), 483-494.

Moser, K., Kriwet, K., Naik, A., Kalia, Y. N., & Guy, R. H. (2001). Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. *European journal of pharmaceuticals and Biopharmaceutics*, 52(2), 103-112.

Murahata, R. I., Toton-Quinn, R., & Finkey, M. B. (1988). Effect of pH on the production of irritation in a chamber irritation test. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 18(1), 62-66.

Mustapha, R. B., Lafforgue, C., Fenina, N., & Marty, J. P. (2011). Influence of drug concentration on the diffusion parameters of caffeine. *Indian journal of pharmacology*, 43(2), 157.

Nakashima, H., Matsunaga, I., Miyano, N., & Kitagawa, M. (2000). Determination of antimicrobial agents in non-formalin adhesives for wallpaper. *Journal of health science*, 46(6), 447-454.

Naoki, O., Kozo, T., Yoshiharu, M., & Tsuneji, N. (1994). Combined effect of d-limonene and temperature on the skin permeation of ketoprofen. *International journal of pharmaceuticals*, 105(1), 31-38.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxane, CID=1807, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5-Bromo-5-nitro-1_3-dioxane. [Consulta: 20 de abril de 2019].

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Bronopol, CID=2450, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Bronopol>. [Consulta: 20 de abril de 2019].

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. CID=22947, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/DMDM-Hydantoin>. [Consulta: 20 de abril de 2019].

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Formaldehyde, CID=712, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Formaldehyde>. [Consulta: 20 de abril de 2019].

Neely, W. B. (1963). ACTION OF FORMALDEHYDE ON MICROORGANISMS II. Formation of 1, 3-Thiazane-4-Carboxylic Acid in *Aerobacter Aerogenes* Treated with Formaldehyde. *Journal of bacteriology*, 85(6), 1420-1422.

Nickoloff, B. J., & Naidu, Y. (1994). Perturbation of epidermal barrier function correlates with initiation of cytokine cascade in human skin. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 30(4), 535-546.

Novotný, J., Janůšová, B., Novotný, M., Hrabálek, A., & Vávrová, K. (2009). Short-chain ceramides decrease skin barrier properties. *Skin pharmacology and Physiology*, 22(1), 22-30.

OECD. Organisation for Economic Co-operation and Development. ENV/JM/MONO(2011)36. Guideline for testing of chemicals. Skin absorption: in vitro method (Guideline 428). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing, paris. 2004a;pp. 1-8. [Consulta: 6 de marzo de 2019].

Orita, I., Sato, T., Yurimoto, H., Kato, N., Atomi, H., Imanaka, T., & Sakai, Y. (2006). The ribulose monophosphate pathway substitutes for the missing pentose phosphate pathway

in the archaeon *Thermococcus kodakaraensis*. *Journal of bacteriology*, 188(13), 4698-4704.

Otto, A., Du Plessis, J., & Wiechers, J. W. (2009). Formulation effects of topical emulsions on transdermal and dermal delivery. *International journal of cosmetic science*, 31(1), 1-19.

Panchagnula, R., Desu, H., Jain, A., & Khandavilli, S. (2004). Effect of lipid bilayer alteration on transdermal delivery of a high-molecular-weight and lipophilic drug: studies with paclitaxel. *Journal of pharmaceutical sciences*, 93(9), 2177-2183.

Pareja, B. (2003). La Dermofarmacia. *Ciencia e Investigación*, 6(2), 8-8.

Park, J. H., Lee, J. W., Kim, Y. C., & Prausnitz, M. R. (2008). The effect of heat on skin permeability. *International journal of pharmaceutics*, 359(1-2), 94-103.

Pereira Arcidiácono, L. (2012). Envejecimiento cutáneo: mecanismos fisiológicos subyacentes y determinación de la eficacia cosmética de un producto anti-age mediante la aplicación de instrumentos de bioingeniería cutánea.

Pérez Martínez, M. C., & Becerra Bahamón, Á. M. (2017). *Evaluación de un modelo difusivo convectivo del formaldehído en un ambiente de trabajo cerrado* (Bachelor's thesis, Fundación Universidad de América).

Polati, S., Gosetti, F., & Gennaro, M. C. (2007). *Preservatives in cosmetics. Analytical methods* (pp. 211-241). Elsevier: Amsterdam, The Netherland.

Prausnitz, M. R., Elias, P. M., Franz, T. J., Schmuth, M., Tsai, J. C., Menon, G. K., ...& Feingold, K. R. (2012). Skin barrier and transdermal drug delivery. *Dermatology*, 3, 2065-2073.

Pró E. Anatomía Clínica. 2ª ed. Buenos Aires: Panamericana; 2014. p.p 18-46.

Proksch, E., Holleran, W. M., Menon, G. K., Elias, P. M., & Feingold, K. R. (1993). Barrier function regulates epidermal lipid and DNA synthesis. *British Journal of Dermatology*, 128(5), 473-482.

Prusakiewicz, J. J., Harville, H. M., Zhang, Y., Ackermann, C., & Voorman, R. L. (2007). Parabens inhibit human skin estrogen sulfotransferase activity: possible link to paraben estrogenic effects. *Toxicology*, 232(3), 248-256.

Puglia, C., Bonina, F., Trapani, G., Franco, M., & Ricci, M. (2001). Evaluation of in vitro percutaneous absorption of lorazepam and clonazepam from hydro-alcoholic gel formulations. *International journal of pharmaceutics*, 228(1-2), 79-87.

RAE. «Definición de Dermocosmetica». <<http://dle.rae.es/?id=CHeoV0g>>. [Consulta: 12 de marzo de 2019].

Rafoth, A., Gabriel, S., Sacher, F., & Brauch, H. J. (2007). Analysis of isothiazolinones in environmental waters by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1164(1-2), 74-81.

Reed, J. T., Ghadially, R., & Elias, P. M. (1995). Skin type, but neither race nor gender, influence epidermal permeability barrier function. *Archives of dermatology*, 131(10), 1134-1138.

Reglamento Europeo. Reglamento (CE) Nº 1223/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo del 30 de Noviembre de 2009 sobre productos cosméticos (versión refundida). [Monografía en Internet]. Bruselas: Parlamento Europeo; 2017. Disponible en : <https://www.boe.es/doue/2009/342/L00059-00209.pdf> [Consulta: 12 de diciembre de 2017].

Reinhard, E., Waeber, R., Niederer, M., Maurer, T., Maly, P., & Scherer, S. (2001). Preservation of products with MCI/MI in Switzerland. *Contact dermatitis*, 45(5), 257-264.

Renwick, A. G. (1998). Toxicokinetics in infants and children in relation to the ADI and TDI. *Food Additives & Contaminants*, 15(S1), 17-35.

Rhein, L. D., Simion, A., Hill, R. L., Cagan, R. H., Mattai, J. A. I. R. A. J. H., & Maibach, H. I. (1990). Human cutaneous response to a mixed surfactant system: role of solution phenomena in controlling surfactant irritation. *Dermatology*, 180(1), 18-23.

Riviere, J. E., Sage, B., & Williams, P. L. (1991). Effects of vasoactive drugs on transdermal lidocaine iontophoresis. *Journal of pharmaceutical sciences*, 80(7), 615-620.

Roberts, M. S., & Walker, M. (1993). Water. The most natural penetration enhancer. *Drugs and the pharmaceutical sciences*, 59, 1-30.

Roberts, M. S. (1998). The relationship between structure and barrier function of skin. *Dermal absorption and toxicity assessment*, 1-42.

Romonchuk WJ, Bunge AL.(2008). Temperatre variations in diffusion cell systems. En: Prespectives in percutaneous penetration (Vol. 9a). Abstract of presentations at the ninth international perspectives in percutaneous penetration conference held in La Grande Motte. Brain KR, Walters KA (eds). *STS Publishing, Cardiff*.p. 86.

Rosen, M., & McFarland, A. G. (1984). Free formaldehyde in anionic shampoos. *J Soc Cosmet Chem*, 35, 157-169.

Rule, K. L., Ebbett, V. R., & Vikesland, P. J. (2005). Formation of chloroform and chlorinated organics by free-chlorine-mediated oxidation of triclosan. *Environmental Science & Technology*, 39(9), 3176-3185.

Russell, G. A., & Danen, W. C. (1968). Reactions of resonance stabilized anions. XXX. Electron-transfer processes. 8. Coupling reactions of radicals with carbanions. *Journal of the American Chemical Society*, 90(2), 347-353.

Russell, L. M., Wiedersberg, S., & Delgado-Charro, M. B. (2008). The determination of stratum corneum thickness An alternative approach. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 69(3), 861-870.

Ruxton, G. D., & Wilkinson, D. M. (2011). Avoidance of overheating and selection for both hair loss and bipedality in hominins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(52), 20965-20969.

Saito, H., & Onoda, T. (1974). Antibacterial action of bronopol on various bacteria, especially on *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemotherapy*, 22(9), 1466-1473.

Salvador, A., & Chisvert, A. (Eds.). (2011). *Analysis of cosmetic products*. Elsevier.

Sánchez-Prado, L., Llompart, M., Lores, M., Fernández-Álvarez, M., García-Jares, C., & Cela, R. (2006a). Further research on the photo-SPME of triclosan. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 384(7-8), 1548-1557.

Sanchez-Prado, L., Llompart, M., Lores, M., García-Jares, C., Bayona, J. M., & Cela, R. (2006b). Monitoring the photochemical degradation of triclosan in wastewater by UV light and sunlight using solid-phase microextraction. *Chemosphere*, 65(8), 1338-1347.

Sánchez Rodríguez, K., & Alessandrini González, R. (2007). Algunas consideraciones éticas sobre la cirugía plástica. *Revista Cubana de Cirugía*, 46(4), 0-0.

Sasseville, D. (2004). Hypersensitivity to preservatives. *Dermatologic therapy*, 17(3), 251-263.

Savage, J. H., Matsui, E. C., Wood, R. A., & Keet, C. A. (2012). Urinary levels of triclosan and parabens are associated with aeroallergen and food sensitization. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 130(2), 453-460.

SCCS, Scientific Committee on Consumer Safety, SCCS/1602/18. The SCCS's Notes of Guidance for the Testing of Cosmetic Ingredients and Their Safety Evaluation, 10th revision, 2018. [Consulta: 12 de marzo de 2019].

SCCSindex,

http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/index_en.htm

Schanno, R. J., Westlund, J. R., & Foelsch, D. H. (1980). Evaluation of 1, 3-dimethylol-5, 5-dimethyl hydantoin as A Cosmetic Preservative. *Journal of The Society of Cosmetic Chemists*, 31, 85-96.

Schaefer, H., & Lademann, J. (2001). The role of follicular penetration. *Skin Pharmacology and Physiology*, 14(Suppl. 1), 23-27.

Scheman, A., Jacob, S., Zirwas, M., Warshaw, E., Nedorost, S., Katta, R., ...& Castanedo-Tardan, M. P. (2008). Contact allergy: alternatives for the 2007 North American Contact Dermatitis Group (NACDG) standard screening tray. *Disease-a-month: DM*, 54(1-2), 7-156.

Scheuplein, R. J. (1965). Mechanism of percutaneous adsorption: I. Routes of penetration and the influence of solubility. *Journal of investigative Dermatology*, 45(5), 334-346.

Scheuplein, R. J. (1967). Mechanism of percutaneous absorption: II. Transient diffusion and the relative importance of various routes of skin penetration. *Journal of Investigative Dermatology*, 48(1), 79-88.

Scheuplein, R. J., & Blank, I. H. (1971). Permeability of the skin. *Physiological reviews*, 51(4), 702-747.

Schmook, F. P., Meingassner, J. G., & Billich, A. (2001). Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. *International journal of pharmaceutics*, 215(1-2), 51-56.

Scott, E.H., Kanti, A., McNamee, M.P., William, A.A. (2006). Cosmetics microbiology. A practical approach (Chapter 9). In: Geis, P.A. (Ed.), *Consumer Safety Considerations of Cosmetic Preservation*. Taylor & Francis Group, New York.

Sekkat, N., Kalia, Y. N., & Guy, R. H. (2004). Porcine ear skin as a model for the assessment of transdermal drug delivery to premature neonates. *Pharmaceutical research*, 21(8), 1390-1397.

Selvaraju, S. B., Khan, I. U., & Yadav, J. S. (2005). Biocidal activity of formaldehyde and nonformaldehyde biocides toward *Mycobacterium immunogenum* and *Pseudomonas fluorescens* in pure and mixed suspensions in synthetic metalworking fluid and saline. *Applied and environmental microbiology*, 71(1), 542-546.

Shklovskaya, E., O'Sullivan, B. J., Ng, L. G., Roediger, B., Thomas, R., Weninger, W., & de St Groth, B. F. (2011). Langerhans cells are precommitted to immune tolerance induction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(44), 18049-18054.

Shokri, J., Nokhodchi, A., Dashbolaghi, A., Hassan-Zadeh, D., Ghafourian, T., & Jalali, M. B. (2001). The effect of surfactants on the skin penetration of diazepam. *International Journal of Pharmaceutics*, 228(1-2), 99-107.

Simon, G. A., & Maibach, H. I. (1998). Relevance of hairless mouse as an experimental model of percutaneous penetration in man. *Skin Pharmacology and Physiology*, 11(2), 80-86.

Steinberg, D. C. (2012). *Preservatives for cosmetics*. Carol Stream, IL: Allured Books.

Steinert, P. M., & Marekov, L. N. (1997). Direct evidence that involucrin is a major early isopeptide cross-linked component of the keratinocyte cornified cell envelope. *Journal of Biological Chemistry*, 272(3), 2021-2030.

Stoica, G. E., Franke, T. F., Moroni, M., Mueller, S., Morgan, E., Iann, M. C., ...& Stoica, A. (2003). Effect of estradiol on estrogen receptor- α gene expression and activity can be modulated by the ErbB2/PI 3-K/Akt pathway. *Oncogene*, 22(39), 7998.

Storrs, F. J., & Bell, D. E. (1983). Allergic contact dermatitis to 2-bromo-2-nitropropane-1, 3-diol in a hydrophilic ointment. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 8(2), 157-170.

Stretton, R. J., & Manson, T. W. (1973). Some Aspects of the Mode of Action of the Antibacterial Compound Bronopol (2-bromo-2-nitropropan-1, 3-diol). *Journal of Applied Bacteriology*, 36(1), 61-76.

Tegner, E., & Fregert, S. (1973). Contamination of cosmetics with formaldehyde from tubes. *Contact Dermatitis Newsletter*, 13, 353.

Terasaka, S., Inoue, A., Tanji, M., & Kiyama, R. (2006). Expression profiling of estrogen-responsive genes in breast cancer cells treated with alkylphenols, chlorinated phenols, parabens, or bis- and benzoylphenols for evaluation of estrogenic activity. *Toxicology letters*, 163(2), 130-141.

Thomas, N. S., & Panchagnula, R. (2003). Transdermal delivery of zidovudine: effect of vehicles on permeation across rat skin and their mechanism of action. *European journal of pharmaceutical sciences*, 18(1), 71-79.

Til, H. P., Woutersen, R. A., Feron, V. J., & Clary, J. J. (1988). Evaluation of the oral toxicity of acetaldehyde and formaldehyde in a 4-week drinking-water study in rats. *Food and chemical toxicology*, 26(5), 447-452.

Touitou, E., Meidan, V. M., & Horwitz, E. (1998). Methods for quantitative determination of drug localized in the skin. *Journal of controlled release*, 56(1-3), 7-21.

ToxFAQs, A. S. T. D. R. (1999). Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ASTDR): Formaldehyde.

Treffel, P., Panisset, F., Faivre, B., & Agache, P. (1994). Hydration, transepidermal water loss, pH and skin surface parameters: correlations and variations between dominant and non-dominant forearms. *British Journal of Dermatology*, 130(3), 325-328.

Trujillo, R., & Lindell, K. F. (1973). New formaldehyde base disinfectants. *Applied microbiology*, 26(1), 106-110.

Tsai, J. C., Lin, C. Y., Sheu, H. M., Lo, Y. L., & Huang, Y. H. (2003). Noninvasive characterization of regional variation in drug transport into human stratum corneum in vivo. *Pharmaceutical research*, 20(4), 632-638.

Tsuzuki, N., Ooi, W., & Takeru, H. (1988). Effect of primary alcohols on percutaneous absorption. *International journal of pharmaceuticals*, 46(1-2), 19-23.

Uhr, H., Moews, K., & Lamoratta, M. (2017). *U.S. Patent Application No. 15/128,678*.

Uotila, L., & Koivusalo, M. (1989). Glutathione-dependent oxidoreductases: formaldehyde dehydrogenase. *Coenzymes and Cofactors, Glutathione. Chemical, Biochemical and Medical Aspects*, 3(part A), 517-551.

US Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. (1998). Guidance for Industry. Bioanalytical Methods Validation for Human Studies. Food and Drug Administration/Center for Drug Evaluation and Research, Rockville, MD. [Consulta: 12 de marzo de 2019].

Valenta, C., Siman, U., Kratzel, M., & Hadgraft, J. (2000). The dermal delivery of lignocaine: influence of ion pairing. *International journal of pharmaceuticals*, 197(1-2), 77-85.

Van de Sandt, J. J. M., & Rutten, A. A. J. J. L. (1995). Differential effects of chemical irritants in rabbit and human skin organ cultures. *Toxicology in vitro*, 9(2), 157-168.

- Van Ravenzwaay, B., & Leibold, E.** (2004). A comparison between in vitro rat and human and in vivo rat skin absorption studies. *Human & experimental toxicology*, 23(9), 421-430.
- Vecchia, B. E., & Bunge, A. L.** (2005). Animal Models: A Comparison of Permeability Coefficients for Excised Skin. *Dermal absorption models in toxicology and pharmacology*, 305.
- Visscher, M. O., Utturkar, R., Pickens, W. L., LaRuffa, A. A., Robinson, M., Wickett, R. R., ...& Hoath, S. B.** (2011). Neonatal skin maturation—vernix caseosa and free amino acids. *Pediatric dermatology*, 28(2), 122-132.
- Wagner, H., Kostka, K. H., Lehr, C. M., & Schaefer, U. F.** (2001). Interrelation of permeation and penetration parameters obtained from in vitro experiments with human skin and skin equivalents. *Journal of controlled release*, 75(3), 283-295.
- Wertz, P. W., & Downing, D. T.** (1989). Transdermal Drug Delivery. *Development Issues and Research Initiatives, Hadgraft, J.J., Guy R H. Eds. Marcel Dekker Inc, New York*, 35, 1-22.
- Wertz, P. W., & van den Bergh, B.** (1998). The physical, chemical and functional properties of lipids in the skin and other biological barriers. *Chemistry and physics of lipids*, 91(2), 85.
- Wesley, N. O., & Maibach, H. I.** (2003). Racial (ethnic) differences in skin properties. *American journal of clinical dermatology*, 4(12), 843-860.
- Wester, R. C., & Maibach, H. I.** (1995). Penetration enhancement by skin hydration. *Percutaneous penetration enhancers. CRC Press, Boca Raton*, 21-28.
- Whittle, C., & Baldassare, G.** (2004). Ultrasonografía de piel y anexos. *Revista chilena de radiología*, 10(2), 81-88.
- Wilkinson, S. C., & Williams, F. M.** (2002). Effects of experimental conditions on absorption of glycol ethers through human skin in vitro. *International archives of occupational and environmental health*, 75(8), 519-527.
- Williams, A. C.** (2003). *Transdermal and topical drug delivery: from theory to clinical practice* (pp. 169-194). London: Pharmaceutical Press.
- Witorsch, R. J., & Thomas, J. A.** (2010). Personal care products and endocrine disruption: a critical review of the literature. *Critical reviews in toxicology*, 40(sup3), 1-30.
- Yamane, M. A., Williams, A. C., & Barry, B. W.** (1995). Terpene penetration enhancers in propylene glycol/water co-solvent systems: effectiveness and mechanism of action. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 47(12A), 978-989.

Zhai, H., & Maibach, H. I. (2001). Effects of skin occlusion on percutaneous absorption: an overview. *Skin Pharmacology and Physiology*, 14(1), 1-10.