

## Análisis de la estructura lipídica de la epidermis bovina por espectroscopia F-T Raman

Garro ML<sup>1</sup>, Bitar R.<sup>2</sup>, Galarza, B.C.<sup>1</sup> ; Cantera, C.S.<sup>3</sup>  
1-INTI-Cueros-CIC

2 -Universidade do Vale do Paraíba, UNIVAP SP-Brasil

3- Inti-Cueros

### Introducción

La industria curtidora genera una variedad de desechos potencialmente tóxicos que dependen en gran medida del proceso de depilado utilizado. Para atenuar esta contaminación, se desarrollaron sistemas alternativos de depilado entre ellos, el enzimático.

En el diseño de un depilado enzimático ideal, Yates (1) propuso que las enzimas depilatorias actúan al menos por intermedio de dos componentes; uno relacionado con la difusión y transporte al sitio de acción y otro directamente relacionado con la destrucción celular del folículo piloso.

Los lípidos intercelulares de la epidermis del estrato corneo son un componente importante de la barrera de la piel que aporta impermeabilidad al paso de las enzimas depilatorias. En la piel humana estos lípidos, incluyen ceramidas, colesterol y ácidos grasos en concentraciones de aproximadamente 50%, 25% y 10% respectivamente, junto con pequeñas cantidades de sulfato de colesterol y otros ésteres. (2)

La espectroscopia Raman ha sido utilizada para analizar la organización de las moléculas lipídicas del stratum corneum humano (5).

El efecto de dispersión Raman proviene de la interacción de luz incidente con los electrones de una molécula iluminada, la dispersión Raman es consecuencia del cambio del estado vibracional inicial de la molécula a otro diferente (7). Esta técnica es muy útil para el estudio de cambios en las cadenas de carbono. Anteriormente, los estudios vibracionales espectroscópicos de modelos lipídicos se realizaban con espectroscopia FT- IR ( Infrarroja) y ocasionalmente con Raman, sin embargo esta última técnica presenta algunas ventajas sobre la Infrarroja: 1- La muestra requiere poca preparación porque el agua posee un espectro Raman débil, lo que facilita el análisis de muestras biológicas, 2-. La espectroscopia Raman no requiere de una preparación especial

de la muestra, la que luego de ser analizada es recuperable( 5,8).

El espectro Raman puede recolectarse de pequeñas regiones dentro de una muestra y los resultados se obtienen analizando las bandas características.(6)

Los terpenos son componentes principales de aceites esenciales, se obtienen de distintas plantas y poseen sabores y aromas característicos. Son moléculas lineales o cíclicas, formadas por múltiples unidades del hidrocarburo de cinco átomos de carbono: *isopreno* ó 2-metil-1,3-butadieno Fig.1. Se los clasifica de acuerdo al número de unidades de isopreno y se los subdivide tomando como base a los grupos químicos que tienen unidos: hidrocarburos, alcoholes, óxidos y cetonas (9,10).

Nuestro objetivo es evaluar el empleo de espectroscopia FT- Raman para determinar los cambios moleculares de los lípidos intercelulares que forman la barrera del estrato corneo de la piel bovina tratada con terpenos. Los terpenos por tener la capacidad de debilitar esta barrera, han sido estudiados como aceleradores del flujo de drogas ó promotores de la absorción a través de epidermis humana y de ratones(3,4,5,16)

### Materiales y Métodos

Preparación de las muestras

Trozos de piel bovina de 10 cm x 10 cm conservados en sal, provenientes de curtiembre fueron rehidratados durante 24 h en agua destilada con 10 gotas de un bactericida derivado del ácido dimetil carbámico a temperatura ambiente ..Luego del lado del pelo, se cubrieron con terpenos de naranja puros ( limonene), mediante pipeta plástica descartable durante 24 h

Muestra(1). Otro trozo, del lado pelo también, se cubrió con gotas de una emulsión preparada de la siguiente forma: 10 g de surfactante ( alcohol etoxilado), con 10 g de terpenos y 10 g de agua destilada durante 24 H Muestra( 2) . La muestra

sin agregado de reactivos Muestra (3), fue usada como control.

A continuación, las pieles se envolvieron en papel de aluminio y se conservaron en nitrógeno líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ). En el momento de sacarlas del termo se arrancaron los pelos con pinza de depilar. Luego descongelaron a temperatura ambiente. y la dermis se disecó con hoja de bisturí antes de realizar las medidas espectroscópicas.

### Descripción Experimental/Espectros FT-Raman

Al ser retiradas del termo y antes de obtener los espectros, las muestras se embebieron en solución fisiológica estéril 0.9% para preservar sus características estructurales. La evaluación de los espectros se realizó por medio del espectrómetro marca Bruker RFS 100/S.

Se recolectaron noventa espectros de piel sin tratar, piel rociada con terpenos puros y tratada con emulsión ; 270 espectros en total.

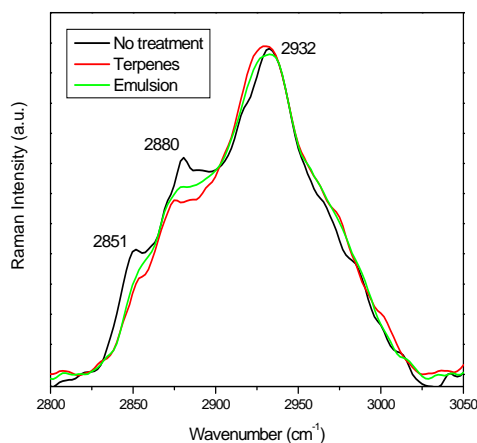
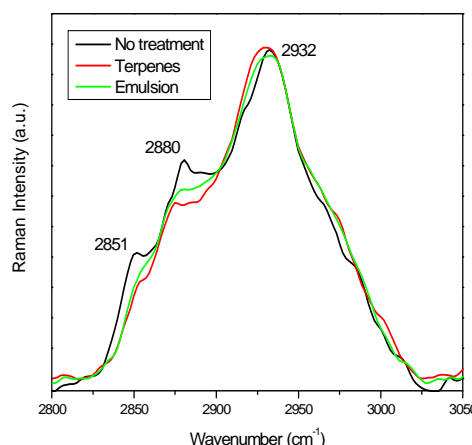
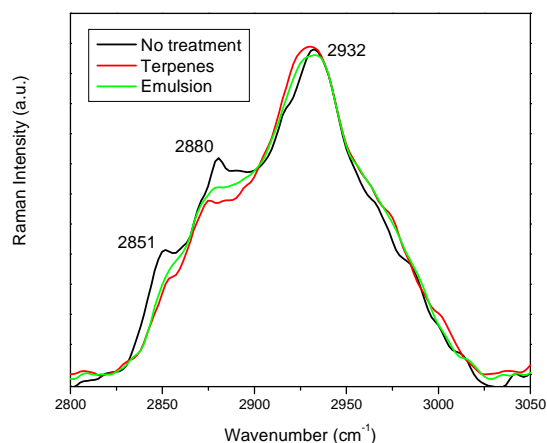
El análisis se obtuvo con un espectrómetro FT-Raman ( Bruker RFS 100/S ) con un laser Nd: YAG como fuente de excitación de luz . El poder del laser para la muestra se mantuvo a  $\sim 252\text{ mW}$  con una resolución de  $4\text{ cm}^{-1}$  .

### Resultados y conclusiones

Existen antecedentes de la aplicación de espectroscopía en el estudio de lípidos de stratum corneum de otras especies , humana principalmente . (5,6,11,12, 13,14, 15)

Es posible suponer de acuerdo a lo obtenido hasta el momento, que la técnica es apropiada para este estudio . La región espectral representada en la **figura**, se corresponde con el modo vibracional de los lípidos que intentamos analizar.

En este estudio se presentan resultados preliminares de lecturas realizadas en muestras de piel bovina , el trabajo continúa en elaboración.



---

---

## Referencias

1. Yates, J.R., Studies in depilation. IX. Effect of skin thickness and diffusion on the rate of depilation of sheepskins, *J. Am. Leath. Chem. Ass.*, 64, 71-81, 1969.
2. Wertz P.W., van den Bergh, The physical, chemical and functional properties of lipids in the skin and other biological barriers, *Chem. Phys. Lipids* 91 ( 1998) 85-96 .
3. Williams A.C., Barry B.W., Penetration enhancers, *Adv Drug Deliv Rev*, 56 , 603-618, 2004
4. Williams A.C., Barry B.W., Terpenes and the lipid-protein partitioning theory of skin penetration enhancement, *Pharm. Res.* 8 ( 1991) 17-24.
5. Vinod B. Nair, Ramesh Panchagnula, The effect of pretreatment with terpenes on Transdermal iontophoretic delivery of arginine vasopressin, *IL Farmaco* 59 (2004) 575-581
5. Lawson E.E., Anigbogu A.N.C., Thermally induced molecular disorder in human stratum corneum lipids compared with a model phospholipids system; FT-Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A* 54 ( 1998) 543-558.
6. Percot A., Lafleur M., Direct observation of domains in model stratum corneum lipid mixtures by Raman microspectroscopy, *Biophys J*, October 2001, p.2144-2153, Vol 81, N°4
7. Tu A. T. Raman Spectroscopy in Biology: Principles and Applications, *JWiley & Sons* . NY. 1982
8. -Unidade de Espectroscopía IR-Raman, Universidade de Sgo. De Compostela : <http://imaisd.usc.es/riadt/iRRaman.asp>
9. Koyama Y., Bando H., Yamashita F., Comparative analysis of percutaneous absorption enhancement by d-limonene and oleic acid based on skin diffusion model. *Pharmac. Res.* , Vol .11, N3, 1994, 377-383.
10. Lehninger A., *Bioquímica, Las bases moleculares de la estructura y función celular*, p.216. Ediciones Omega, S.A.-Barcelona, 1972)
11. Wegener M., Neubert R., Structure of stratum corneum lipids characterized by FT-Raman spectroscopy and DSC.I.ceramides, *Internat. J. of Pharm* 128 ( 1996) 203-213
12. Bowstra J.A., Honeywell-Nguyen L., Gooris G., Ponce M. Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. *Progress in Lipid Research*. v.42, n.1, p.1-36, 2003.
13. Narishetty Sunil T.K , Panchagnula R, Effect of L-menthol and 1,8 cineole on phase behavior and molecular organization of SC lipids and skin permeation of zidovudine, *J of Controlled Rel.*,102 ( 2005) 59-70.
14. Vinod B., Panchagnula R, The effect of pretreatment with terpenes on Transdermal iontophoretic delivery of arginine vasopressin, *IL Farmaco* 59 ( 2004) 575-581.
15. Laugel C., Yagoubi N., ATR-FTIR spectroscopy : a chemometric approach for studying the lipid organization of the stratum corneum *Chemistry and Phys. of Lipids*, 135 (2005) 55-68
16. Jain A.K., Thomas N.S., Panchagnula R., Transdermal delivery of imipramine hydrochloride. I . Effect of terpenes , *J of Cont. Rel.*, 79, 1-3 ( 2002), , p.93-101.