



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN



EVALUACION DE LAS PROPIEDADES COSMETICAS
EN ESTRATO CORNEO DE LIPOSOMAS CARGADOS
CON MATERIALES DE DIFERENTE SOLUBILIDAD

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
MARTHA ARACELI CANO ZEPEDA

DIRECTOR DE TESIS:
Q. F. B. ABELARDO CHAVEZ MONTES

FALLA DE ORIGEN

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1995



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de
Exámenes Profesionales

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FEG-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'Ns: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.B. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

Evaluación de las propiedades cosméticas en estrato córneo

de liposomas cargados con materiales de diferente solubilidad

que presenta la pasante: Martha Araceli Cano Zepeda
con número de cuenta: 8729392-0 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Bióloga ; en colaboración con :

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 16 de Octubre de 1995

PRESIDENTE Q.F.B. Elizabeth Toriz García

VOCAL Q. Mario A. Morales Delgado

SECRETARIO Q.F.B. Abelardo Chávez Montes

PRIMER SUPLENTE D.E.S.S. Rodolfo Cruz Rodríguez

SEGUNDO SUPLENTE Q.F.B. Efrén Hernández Baltazar

**EVALUACION DE LAS PROPIEDADES COSMETICAS EN
ESTRATO CORNEO DE LIPOSOMAS CARGADOS CON
MATERIALES DE DIFERENTE SOLUBILIDAD.**

Agradezco a mis padres y a mi familia por todo el cariño que me han brindado siempre. A ti papá que me has dado todo tu apoyo, y a ti mamá por tu confianza y ánimo para seguir adelante.

A mis hermanos:

Toño, Mago, Gaby, Isabel, Lety, Juan, Noé.

Gracias por su confianza, cariño y entusiasmo de siempre.

A todos mis amigos de la Facultad y en especial a los de mi generación.

INDICE

INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	2
I. GENERALIDADES	3
1.1. La piel humana	3
1.1.1. Epidermis	4
1.1.2. Dermis	6
1.1.3. Organos accesorios	7
1.2. Membranas celulares	7
1.2.1. Lípidos de membrana	7
1.2.2. Proteínas de membrana	8
1.2.3. Carbohidratos de membrana	9
1.2.4. Organización molecular de las membranas	9
1.3. Liposomas	10
1.3.1. Clasificación de los liposomas	12
1.3.2. Materiales utilizados para la preparación de liposomas	13
1.3.3. Formación de liposomas	15
1.3.4. Factores que afectan al encapsulado	17
1.3.5. Efecto cosmético	18
1.3.6. Preparación de liposomas	19
1.3.7. Caracterización de liposomas	20
1.3.8. Comportamiento de fase de los liposomas	22
1.3.9. Estabilidad de los liposomas	24
1.3.10. Toxicidad de los liposomas	26
1.3.11. Propiedades de los agentes cosméticos utilizados en la elaboración de los liposomas MLV	26

II. METODO	29
2.1. Reactivos	29
2.2. Equipo	29
2.3. Material biológico	29
2.4. Procedimiento	30
2.4.1. Preparación de liposomas tipo MLV (Vesícula grande multilaminar)	30
2.4.2. Ciclo de estabilidad	31
2.4.3. Evaluaciones físicas	31
2.4.4. Estudio de humectación	31
2.4.5. Cuantificación por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)	32
III. RESULTADOS	34
IV. DISCUSION	50
V. CONCLUSIONES	52
VI. APENDICES	53
Apéndice A. Diagrama ternario fosfolípido:agua:vitamina E	53
Apéndice B. Validación de la balanza de torsión (Tensiómetro Du NOUY)	55
Apéndice C. Lista de tablas, gráficos y figuras	65
VII. BIBLIOGRAFIA	68

INTRODUCCION

La importancia de la aplicación y liberación de un agente cosmético ha propiciado el desarrollo de nuevos sistemas de liberación de uno o varios componentes activos en la piel.

A través de los años, los liposomas, vesículas formadas por fosfolípidos han mostrado un gran potencial como sistemas de liberación de fármacos y de agentes cosméticos, tienen como característica disminuir la pérdida transepidermal de agua y de incrementar el reemplazo de los lípidos perdidos en la piel. Además pueden contener sustancias hidrosolubles y liposolubles, tienen alta afinidad a las membranas celulares y son promotores de la función de humectación natural de la piel.

Por lo anterior los liposomas se han ganado el mercado cosmético nacional e internacional como sistemas de liberación, sin embargo, a pesar de su importancia, en México no se han realizado esfuerzos para estudiar su desempeño cosmético y mucho menos para su elaboración, ya que se depende totalmente de tecnologías realizadas en el extranjero; por tal motivo, éste trabajo pretende despertar un interés por el desarrollo de sistemas de liberación de cosméticos para su estudio y producción.

OBJETIVOS

Elaborar liposomas tipo MLV (vesícula grande multilaminar) por el método del "Rotavapor".

Proponer agentes cosméticos susceptibles a ser encapsulados en los liposomas que posean diferentes grados de solubilidad.

Evaluar la forma y el tamaño de los liposomas obtenidos.

Realizar la cuantificación de los agentes cosméticos encapsulados.

Determinar la estabilidad física de los liposomas por medio de pruebas de estabilidad acelerada.

Determinar la humectación sobre estrato córneo de los liposomas obtenidos por estudios de elongación.

I. GENERALIDADES

1.1. LA PIEL HUMANA

La piel es un órgano constituido por tejidos reunidos estructuralmente para desempeñar actividades específicas, es una estructura compleja que cumple varias funciones vitales y esenciales para la vida.

La piel es el órgano más grande del cuerpo, tiene una superficie de 2m² con un peso que varía entre 3 y 4.5kg en el adulto promedio. La piel es una frontera activa que se interpone entre el organismo y el medio ambiente.

La piel ayuda al control de la temperatura corporal, previene la pérdida de material orgánico e inorgánico, recibe estímulos del medio ambiente, almacena componentes químicos, excreta agua y sales y sintetiza sustancias importantes (19, 53).

El pH de la piel está en un rango de 4.5 a 6 (6).

Estructuralmente la piel consta de dos partes: La parte exterior compuesta de epitelios llamada epidermis, la cual está unida a la parte interior más gruesa formada por tejido conjuntivo, denominado dermis. Debajo de la dermis se encuentra una capa o tela subcutánea de tejidos llamada fascia superficial, y está formada por el tejido conjuntivo areolar y adiposo. Las fibras de la dermis se extienden dentro de la fascia superficial y fijan la piel a la tela subcutánea, la cual a su vez está fijamente adherida a los tejidos y órganos subyacentes (19, 53).

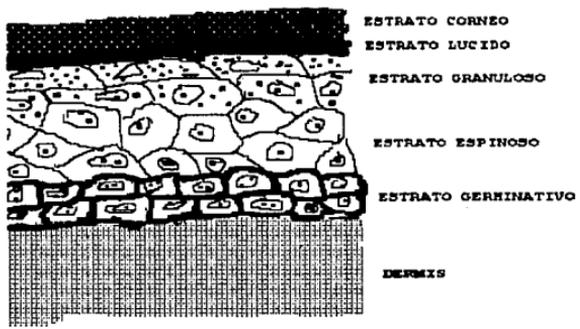


Figura 1. Estructura de la piel (10).

1.1.1. Epidermis

La epidermis está compuesta de epitelio estratificado en cuatro o cinco capas celulares, dependiendo de su localización en el cuerpo. En las áreas de mayor fricción como las palmas y las plantas de los pies, la epidermis tiene cinco capas, en las partes restantes del cuerpo tiene cuatro capas. La epidermis se regenera por sí misma en un período de 45 días(5, 19, 53).

Las capas que forman a la epidermis son de adentro hacia afuera:

1. ESTRATO BASAL.

Es una capa simple de células columnares, capaces de división celular continua. La epidermis crece por la división de las células del estrato basal y en las capas profundas del estrato espinoso. A medida que estas células se multiplican hacen presión hacia la superficie.

2. ESTRATO ESPINOSO.

Esta capa, encima de la capa basal, contiene de 8 a 10 filas de células poligonales que se unen íntimamente. La superficie de estas células tiene una apariencia espinosa.

3. ESTRATO GRANULOSO.

Consta de dos o tres filas de células aplanadas que contiene gránulos de una sustancia denominada queratohialina que colorea intensamente. Esta sustancia está involucrada en el primer paso de la formación de la queratina. La queratina es una proteína impermeable al agua, que se concentra en la capa más superficial de la dermis. La capa granulosa contiene células cuyo núcleo se encuentra en diversos estados de desintegración.

4. ESTRATO LUCIDO.

Esta capa existe solamente en la piel gruesa, en las palmas de las manos y en las plantas de los pies. Consta de tres o cuatro filas de células muertas, claras y planas que contienen una sustancia translúcida denominada eleidina. La eleidina se deriva de la queratohialina y se transforma finalmente en queratina.

5. ESTRATO CORNEO.

Esta capa consta de 25 a 30 hileras de células muertas aplanadas dispersas en un medio lipídico, las células están formadas de la proteína queratina. La queratina sirve como cubierta impermeable al agua. Estas células se desprenden y son reemplazadas continuamente.

Los lípidos en el estrato córneo están formados por ácidos grasos, esteroides y ceramidas. Con una menor proporción de fosfolípidos que en la capa basal.

El estrato córneo sirve como barrera contra las ondas luminosas y caloríficas, las bacterias y muchas sustancias químicas (6, 15, 19, 28, 53, 61).

Se han identificado tres subcapas en el estrato córneo en base a diferencias de tinción características, llamadas basal, intermedia y capas de células germinativas (4).

El agua juega un papel importante en las propiedades físicas de estrato córneo. El resistir la pérdida de humedad que se requiere para la flexibilidad, depende de la presencia de ciertos lípidos en asociación con las proteínas de la porción celular del estrato córneo. La plasticidad de la piel por la unión de agua ha sido asociada con lo llamado "agua secundaria", la cual es unida molecularmente a los componentes del estrato córneo.

Los lípidos protegen a la piel de daño por agua y pérdida excesiva de humedad con la formación espontánea de emulsiones con agua en la superficie de la piel.

El estrato córneo ha sido comparado como un sistema de tabiques (proteínas) embebidas en un cemento (lípidos) (42).

Cuando los componentes lípidos son degradados la cohesividad disminuye y resulta la descamación (6).

El color de la piel se debe a un pigmento denominado melanina, que va del amarillo al negro. Este pigmento se encuentra en las capas basal, espinosa y granulosa de las personas de raza blanca. En los negros la melanina se encuentra en todas las capas epidermales. Cuando la piel se expone a los rayos ultravioletas, aumentan la cantidad y la oscuridad de la melanina, la cual da mayor protección al cuerpo contra las radiaciones. Otro pigmento llamado caroteno se encuentra en la córnea y en las áreas grasosas de la dermis en las personas de origen oriental. El color rosado de la piel caucásica o blanca es debido a los vasos sanguíneos de la dermis. La epidermis no posee vasos sanguíneos.

1.1.2. Dermis

La dermis está compuesta de tejido conjuntivo que contiene fibras colágenas y elásticas. Numerosos vasos sanguíneos, nervios, glándulas y folículos pilosos se hallan en la dermis. La región superior a la dermis denominada región papilar, debido a que su área superficial se encuentra aumentada grandemente por pequeñas proyecciones de forma de dedo, denominadas papilas. Estas estructuras se proyectan en la epidermis y contienen corpúsculos táctiles (de Meissner) que son terminaciones sensibles a la presión profunda.

La porción restante de la dermis se llama zona reticular. Esta área contiene muchos vasos sanguíneos además fibras colágenas y elásticas. Los espacios entre las fibras entrelazadas están ocupadas por tejido adiposo y glándulas sudoríparas. La región reticular está unida a los órganos profundos como el hueso y el músculo por la tela subcutánea.

1.1.3. Organos accesorios

Los órganos derivados de la piel: glándulas, pelos y uñas, desempeñan funciones necesarias y a veces vitales. Los pelos y las uñas ofrecen protección al cuerpo, mientras que las glándulas sudoríparas cumplen su función vital ayudando a regular la temperatura corporal. Las glándulas sebáceas sirven para la secreción de desechos (19, 53).

1.2. MEMBRANAS CELULARES

Las membranas celulares son soluciones viscosas bidimensionales que rodean a todas las células vivas, actúan como barreras con permeabilidades selectivas.

La mayor parte de las membranas están compuestas de forma predominante de lípidos, proteínas y carbohidratos.

1.2.1. Lípidos de membrana

Los lípidos constituyen del 25 al 80 % en peso de la membrana variando su cantidad y tipo de una célula a otra.

Los lípidos son comúnmente de naturaleza anfipática (contienen regiones hidrofóbicas -no polares- y regiones hidrofílicas -polares-).

Los elementos lipídicos de la composición de la membrana son fosfolípidos, glicolípidos, esfingolípidos y esteroides.

Del 35 al 75 % de los fosfolípidos de membrana están representados por la fosfatidilcolina, mientras que los fosfolípidos cargados negativamente (fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y difosfatidilglicerol) junto con la fosfatidiletanolamina constituyen del 15 al 25%.

En ambientes acuosos los lípidos polares se dispersan en forma de micelas (estructuras globulares) en las que los extremos hidrofóbicos de naturaleza hidrocarbonada se alejan de los ambientes acuosos, mientras que las regiones hidrofílicas interactúan con la fase acuosa. Por lo cual los

fosfolípidos se dispersan con facilidad en soluciones acuosas, pero sin llegar a ser una verdadera solución molecular.

En la figura 2 se observan los arreglos moleculares de los fosfolípidos en sistemas acuosos (9).

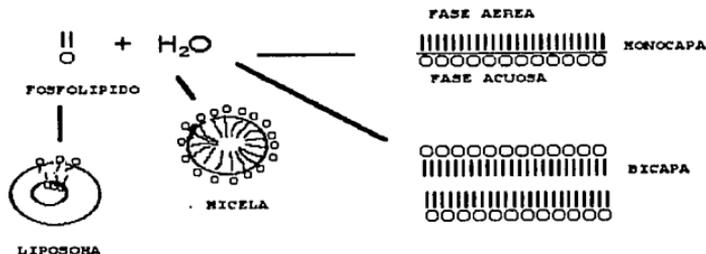


Figura 2. Arreglos moleculares de los fosfolípidos en sistemas acuosos (9).

1.2.2. Proteínas de membrana

La mayoría de las membranas contienen de un 50 al 60 % de proteína. Cada tipo de membrana contiene varias o muchas clases de proteínas o polipéptidos. Las proteínas de membrana pueden clasificarse en dos categorías: proteínas extrínsecas o periféricas, que se hallan unidas débilmente a la superficie de la membrana y pueden separarse de ella en forma soluble, y las proteínas intrínsecas o integrales constituyen el 70 % o más de la proteína total de la membrana, están unidas muy fuertemente a la porción lipídica y sólo pueden separarse por un tratamiento drástico.

Otra clasificación de las proteínas es por su composición y propiedades de solubilidad.

- Proteínas simples como albúminas, globulinas, gluteinas, prolaminas, albuminoides.
- Proteínas conjugadas como nucleoproteínas, fosfoproteínas, porfirinoproteínas, glucoproteínas, lipoproteínas.
- Proteínas derivadas, protaminas e histonas, proteasas, peptonas, péptidos.

En general las membranas celulares contienen proteínas simples, que pueden ser globulares (32).

1.2.3. Carbohidratos de membrana

Los carbohidratos asociados a las membranas celulares constituyen en promedio, entre el 2 y 8 % en peso seco total de la membrana.

Entre los carbohidratos que con mayor frecuencia se encuentran en las membranas plasmáticas están, galactosa, manosa, fructuosa, glucosa, glucosamina y ácido siálico. Estos suelen asociarse con las proteínas y los lípidos formando glicoproteínas y glicolípidos.

1.2.4. Organización molecular de las membranas

En la actualidad, se considera un arreglo molecular dinámico, en donde las moléculas presentan una gran movilidad dentro de la estructura y se encuentran en interacción permanente. Muchos procesos que se realizan en y alrededor de las membranas dependen de las interacciones específicas entre sus componentes.

En la figura 3 se observan el modelo de membrana de Danielli y Davson (A) en la cual las proteínas están asociadas de manera globular a las cabezas polares del fosfolípido a ambos lados de la bicapa; y el modelo de Robertson (B) en el que se plantea a las proteínas integradas pero en estructuras extendidas en contacto directo con las cabezas de los fosfolípidos.

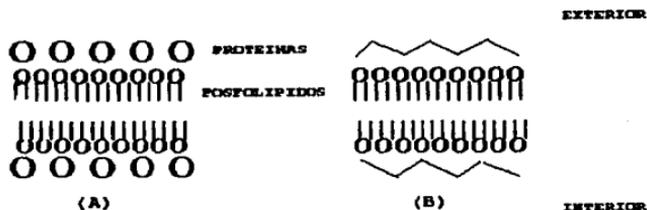


Figura 3. Modelo molecular de membrana de Danielli y Davson (A), Modelo de membrana de Robertson (B) (32).

El modelo más satisfactorio actualmente de estructura de membrana es el de Mosaico Fluido postulado por S.J. Singer y G.L. Nicolson. Este modelo afirma que los fosfolípidos de membrana se hallan ordenados en bicapas formando una matriz fluida de cristales líquidos. En esta bicapa, las moléculas lipídicas individuales pueden moverse lateralmente, dotando a la bicapa de fluidez, flexibilidad y resistencia eléctrica, además de relativa permeabilidad a las moléculas muy polares.

Las proteínas de la membrana son globulares, algunas de las proteínas se hallan incluidas en la membrana y penetran en la fase lipídica desde cada lado, mientras que otras se hallan totalmente sepultadas en ella.

En la figura 4 se observa el modelo del mosaico fluido para la estructura de una membrana (32).

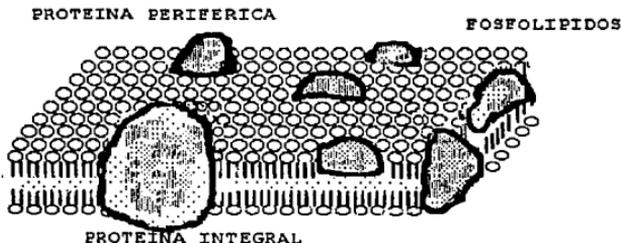


Figura 4. Modelo de membrana del mosaico fluido (32).

1.3. LIPOSOMAS

A partir del año de 1960 los liposomas fueron estudiados por Bangham y Papahadjopoulos (29). Los liposomas son vesículas esféricas constituidas por una bicapa de moléculas anfipáticas y una cavidad en su centro en medio acuoso. Los liposomas tienen un gran potencial como sistemas de liberación de fármacos y agentes cosméticos, pueden ser incluidos péptidos en las vesículas y ser administrados por diferentes vías.

Las cadenas lipofílicas se orientan hacia la mitad de la bicapa, mientras que las cadenas polares se disponen en la superficie interna y externa de la vesícula como se observa en la figura 5 con el modelo de un liposoma (30).

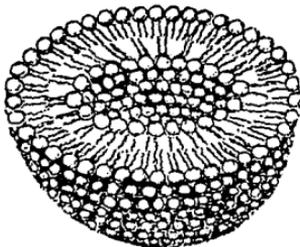


Figura 5. Modelo de un liposoma (30).

Las membranas formadas por una doble capa de fosfolípidos son semejantes a las membranas celulares del tejido vivo en su estructura y pueden ser producidas sintéticamente.

En la actualidad existen nuevos productos cosméticos con liposomas que pueden encapsular ingredientes activos necesarios para la piel y ser aplicados directamente sobre la misma. Los liposomas son acarreadores eficientes y específicos de fármacos y otras sustancias (13, 37).

El primer cosmético con liposomas fué denominado Capture. Los nuevos productos tienen nombres tales como Brookosomas, Dermosomas, Glicosomas, Lipocutin, Lipodermin, Concentrado de liposomas E-10, Natipides, Niosomas, Esfingosomas, Super-Lipodermin, etc (30).

1.3.1. Clasificación de los liposomas

Dependiendo del tamaño, volumen de capacidad acuosa, número de bicapas y estructura multimembrana pueden clasificarse en tres tipos:

1. **Vesícula pequeña unilaminar (SUV)**. Hecha de una pared y una cavidad acuosa simple, su diámetro va de 80 a 100 nm.
2. **Vesícula grande unilaminar (LUV)**. Con un diámetro entre 200 y 1000 nm, se caracteriza por un amplio volumen acuoso cuarenta veces mayor que el pequeño.
3. **Vesícula grande multilaminar (MLV)**. Muchas paredes y compartimentos concéntricos, el tamaño puede alcanzar entre 400 y 2500 nm (38).

En la figura 6 observamos la representación esquemática de los tipos de liposomas anteriormente señalados.

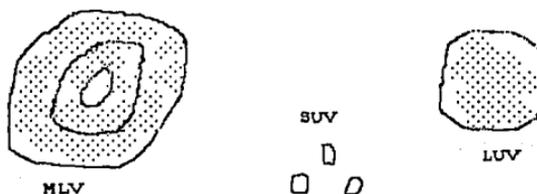


Figura 6. Representación esquemática de diferentes tipos de liposomas, vesícula grande multilaminar (MLV), vesícula pequeña unilaminar (SUV) y vesícula grande unilaminar (LUV) (14).

Otra manera de clasificar a los liposomas, de acuerdo a Weiner et al. es el que muestra la tabla 1 (60).

TIPO DE VESICULA	TERMINO USADO	TAMAÑO (µm)
PEQUEÑA UNILAMELAR SONICADA	SUV	0.025-0.05
VESICULA GRANDE MULTILAMELAR	MLV	0.05-10
VESICULA GRANDE UNILAMELAR	LUV	0.1
EVAPORACION EN FASE REVERSA	REV	0.5
PRESA FRANCESA	FPV	0.05
INYECCION CON ETHER	EIV	0.02

Tabla 1. Ejemplos de nomenclatura usada para liposomas de acuerdo al método de elaboración (60).

1.3.2. Materiales usados en la preparación de liposomas

Los liposomas están formados de fosfolípidos naturales, semisintéticos y/o sintéticos, además de esteroides y otras sustancias (26).

A. FOSFOLIPIDOS

Son moléculas complejas, triésteres de glicerol en los que una cadena lateral de un ácido graso es reemplazada por un diéster asimétrico de un ácido fosfórico. La mitad de éste diéster se une a una molécula de glicerol, mientras que la otra mitad se une a diversos grupos formando derivados (37).

En la figura 7 se observa un modelo esquemático de un fosfolípido.



Figura 7. Modelo esquemático de la estructura de un fosfolípido (24).

Los fosfolípidos representan más del 50% en peso de lípidos presentes en las membranas biológicas. La estructura química general de este tipo de lípidos se ejemplifica con el ácido fosfatídico (60).

Existen diferentes familias de fosfolípidos por esterificación de el ácido fosfatídico con amino alcoholes y alcoholes (glicerol, etanolamina, colina, serina e inositol)(37).

El fosfolípido más abundante en plantas y animales es la fosfatidilcolina (PC), también llamada lecitina, y la fosfatidiletanolamina (PE), algunas veces referida como cefalina.

En la fosfatidilserina (PS), el ácido fosfórico del ácido fosfatídico (PA) es esterificado a el grupo hidróxilo del aminoácido L-serina, y en el fosfatidilinositol (PI) a uno de los hidróxilos de el azúcar ciclico inositol. En el caso de fosfatidilglicerol (PG), el alcohol es esterificado a grupo fosfato. Las estructuras químicas de los anteriores fosfolípidos se representan en la figura 8 (60).

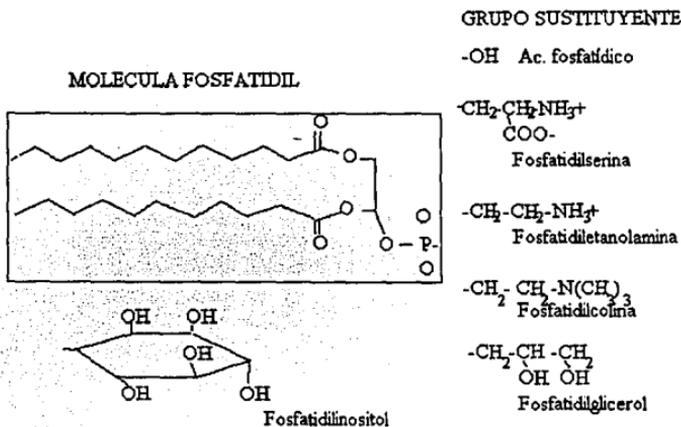


Figura 8. Estructuras químicas de fosfolípidos utilizados comunmente en la preparación de liposomas (60).

B. FOSFOLIPIDOS SINTETICOS

Generalmente se usan fosfolípidos saturados como dipalmitoil fosfatidil colina (DPPC), diestearil fosfatidil colina (DSPC), dipalmitoil

fosfatidil etanolamina (DPPE), dipalmitoil fosfatidil serina (DPPS), ácido dipalmitoil fosfatídico (DDA), dipalmitoil fosfatidil glicerol (DPPG):

Algunos fosfolípidos insaturados son utilizados en la preparación de liposomas incluyen: dioleoil fosfatidil colina (DOPC), dioleoil fosfatidil glicerol (DOPG) (60).

C. ESTEROIDES

El colesterol y sus derivados son incluidos como componentes de las membranas de los liposomas por aumentar la estabilidad de los mismos (39). El colesterol es abundante en tejidos animales y se localiza principalmente en las membranas celulares.

La introducción de este esteroide tiene tres efectos reconocidos: Incrementa la fluidez de las bicapas, reduce la permeabilidad de las membranas a moléculas solubles en agua y estabiliza la membrana en presencia de fluidos biológicos como el plasma.

En los liposomas sin colesterol es conocida la rápida interacción con proteínas plasmáticas, produciendo inestabilidad física (26).

D. OTRAS SUSTANCIAS

Diacilglicerol, estearilamina y dicetilfosfato son incorporadas en los liposomas para impartir carga superficial negativa y positiva.

Sin embargo, un número de compuestos con cadena larga simple hidrocarbonada y con cadena con un grupo iónico son sintetizadas y son capaces de formar vesículas, incluyen sales cuaternarias de amonio y fosfatos dialquílicos (60).

1.3.3. Formación de liposomas

Los lípidos capaces de formar liposomas exhiben una doble naturaleza química anfipática. Estudios usando resonancia magnética nuclear muestran que los grupos polares de la fosfatidilcolina tiene unidas de 15 a 25 moléculas de agua. En la figura 9 se representan las propiedades anfipáticas de los fosfolípidos (21).

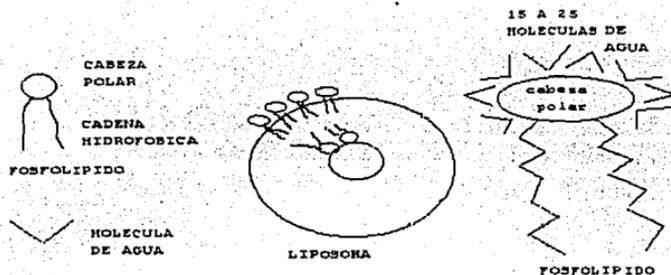


Figura 9. Propiedades anfipáticas de los fosfolípidos (21).

Este fenómeno puede ser entendido en términos cuantitativos considerando la concentración micelar crítica (c.m.c.) de la fosfatidilcolina en agua.

La c.m.c. es definida como la concentración de lípidos en agua (generalmente expresados en moles/litro) en la cual los lípidos forman micelas o estructuras bilaminares manteniéndose en solución como monómeros.

La carga de energía libre entre el agua y un grupo hidrofóbico explica la preferencia de lípidos a ensamblarse en estructuras bilaminares excluyendo al agua tanto como sea posible de los grupos hidrofóbicos en orden para bajar el nivel de energía libre y aumentar la estabilidad de la estructura agregada.

Un alto contenido de actividad superficial de las moléculas no garantizan la habilidad de formar bicapas en presencia de agua. El tipo de estructura física de los fosfolípidos en solución depende del equilibrio de las regiones polar y no polar de las moléculas individuales (37).

1.3.4. Factores que afectan al encapsulado

La localización del fármaco o agente cosmético en el liposoma depende de un gran número de factores (solubilidad, coeficiente de partición, naturaleza del activo -polar o no polar-, etc).

La eficiencia de la captura dependerá del uso de concentraciones de sustancia o activo que no exceda la saturación en el compartimiento acuoso (sustancia polar) o en las bicapas (sustancia no polar). El método de preparación puede afectar la localización y eficiencia de captura.

La incorporación de agentes cosméticos con solubilidad significativa en ambas fases puede ser indeseable ya que la membrana lipídica no puede ser una barrera para el pasaje de un lado a otro del liposoma (33, 60).

Las sustancias liposolubles pueden unirse a la doble membrana y las sustancias hidrosolubles atraparse en el interior acuoso como se muestra en la figura 10 (13).

MEMBRANA BIMOLECULAR LIPIDICA



● SUSTANCIA HIDRÓSOLUBLE



● SUSTANCIA LIPOSOLUBLE

Figura 10. Diagrama esquemático de la incorporación de sustancias solubles e insolubles en agua (48).

Algunos agentes cosméticos a encapsular pueden ser; activos de origen vegetal (extractos de romero, hiedra, cola de caballo, etc), vitamina E (alfa tocoferol), vitamina C y vitamina A, aloe vera, elastina, colágeno, sacáridos neutrales, factores humectantes naturales como aminoácidos y azúcares, retinoides, esteroides, fragancias y antisépticos, etc (35, 37, 46).

1.3.5. Efecto cosmético

Los liposomas han sido empleados en cosméticos y productos para el cuidado de la piel por varios años con gran éxito.

En la figura 11 se muestran los factores que pueden modular la permeación percutánea (43).

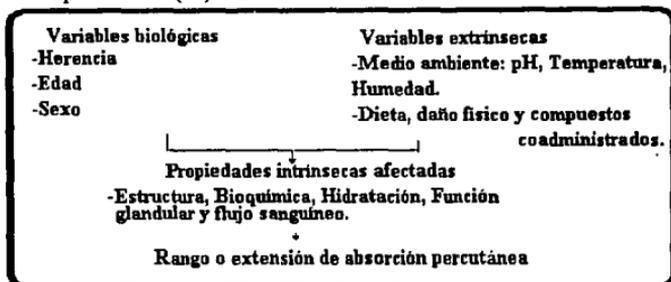


Figura 11. Factores biológicos en la absorción y permeación (43).

Los liposomas en preparaciones cosméticas tienen como característica reducir la pérdida transepidermal de agua e incrementar el reemplazo de los lípidos perdidos en la piel.

Pueden contener sustancias de diferente solubilidad, tienen alta afinidad a las membranas celulares y son promotores de la función de humectación natural de la piel (43).

La figura 12 muestra el efecto potencial cosmético de los liposomas sobre la piel, en la primera fase los fosfolípidos cubren la queratina del estrato córneo, este proceso es el responsable de las sensaciones sobre la piel entre la capa o película después de la aplicación.

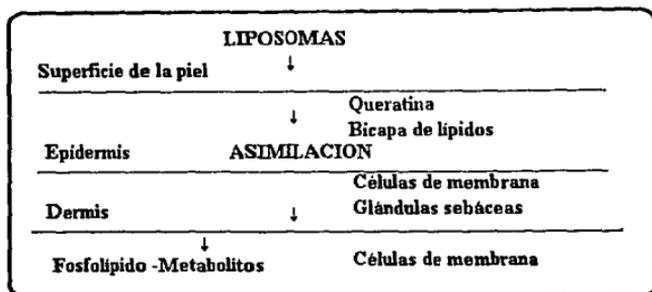


Figura 12. Efecto potencial de los liposomas en la piel (29, 30).

Esta película lipofílica la superficie de la piel y no puede ser removida con agua, y sólo ligeramente con detergentes.

Como resultado se tiene un efecto oclusivo ligero y la película reduce la pérdida de agua transepidermal, lo que tiene una ventaja sobre la piel seca (30, 31).

Las sustancias lipofílicas son integradas dentro de la membrana del liposoma. En contacto con la célula, los liposomas son absorbidos y pueden interactuar por intercambio de lípidos sobre la membrana del liposoma y la membrana celular, absorción, endocitosis, liberación del contenido de liposomas al contacto o dentro de la membrana celular, fusión del liposoma y la membrana celular (17).

1.3.6. Preparación de liposomas

Se han reportado varios métodos de preparación de liposomas. Algunos de los métodos más conocidos son: vortexación (8), sonicación (8, 61), prevesícula (8), infusión con éter (8), evaporación de fase reversa (8, 18, 34), inyección de etanol (60), fusión inducida con calcio (8), remoción de colatos (8, 61), evaporación rotatoria bajo presión reducida (rotavapor) (12, 18, 23, 40, 46, 60), prensa francesa (40), etc.

El método de infusión con éter consiste en disolver los fosfolípidos con éter, se inyecta lentamente esta disolución en una solución acuosa a

temperaturas entre 55 y 65°C. El éter se evapora y se forman vesículas grandes unilaminares (LUV).

La evaporación rotatoria a presión reducida es un método por el cual se obtienen vesículas grandes multilaminares (MLV), se disuelven los fosfolípidos en un solvente volátil, se coloca en el rotavapor a presión reducida. Se forma la película de fosfolípidos y se agrega una solución acuosa con agitación moderada.

La sonicación consiste en dos etapas, en la primera es la acción del ultrasonido y en la segunda se utiliza la cromatografía en gel o ultracentrifugación para formar vesículas pequeñas unilaminares (SUV).

La fusión inducida con calcio consiste en adicionar calcio en una mezcla de fosfolípidos ácidos, la infusión de induce y la formación de estructuras laminares.

El método de evaporación en fase reversa se divide en dos etapas, la primera es la disolución de los fosfolípidos en un solvente orgánico volátil y la adición de una solución acuosa con agitación hasta obtener una emulsión. La segunda etapa es la eliminación del solvente por evaporación a presión reducida.

La inyección con etanol consiste en disolver los fosfolípidos en etanol y son inyectados dentro de una solución buffer formando vesículas pequeñas unilaminares.

La remoción de colatos se lleva a cabo con una dispersión acuosa de detergente y fosfolípidos formando micelas. El detergente es removido y las micelas se enriquecen de fosfolípidos hasta formar vesículas bilaminares.

1.3.7. Caracterización de los liposomas

VOLUMEN INTERNO Y EFICIENCIA DE ENCAPSULACION.

Estos parámetros son utilizados para describir el fármaco o agente cosmético soluble en agua atrapado en el compartimento acuoso del liposoma (48).

La eficiencia de la encapsulación describe el porcentaje de fase acuosa atrapada durante la preparación del liposoma; expresado como porcentaje atrapado/mg de lípido.

El volumen interno atrapado y la eficiencia de encapsulación depende enormemente del contenido del liposoma, concentración del lípido, método de preparación y activo usado (60). Se puede utilizar también la cuantificación del activo, lisando el liposoma con un detergente y utilizar HPLC normal o en fase reversa. El volumen atrapado es calculado en base del diámetro asumido de las vesículas (56).

El número de bicapas presentes en el liposoma pueden ser determinados por microscopía electrónica de criofractura y resonancia magnética nuclear (2, 49, 60).

También se puede emplear la difracción de rayos X (49, 60).

DISTRIBUCION DEL TAMAÑO DE PARTICULA.

Existe un gran número de métodos para determinar estos parámetros, los usados comúnmente son:

1. Barrido de luz. Los nuevos instrumentos tienen un rango entre 10nm y 1 μ m). Muchas preparaciones requieren de una estimación aproximada de su distribución de frecuencias. La dificultad de la interpretación de los datos del tamaño de partícula se debe a que partículas grandes en una dispersión con pequeñas partículas pueden tener un impacto dramático en el diámetro aproximado reportado.

Esta técnica se utiliza durante el proceso de preparación de liposomas (control de proceso) y/o durante el almacenamiento (49, 55, 60).

El coeficiente de difusión es estimado utilizando la ecuación de Stokes-Einstein para obtener los radios aproximados de las vesículas y por lo tanto del diámetro de los liposomas (2, 16, 45, 49).

2. Microscopía de luz. Este método es utilizado para examinar la distribución de tamaño de partícula de preparaciones MLV. La inclusión de una sustancia fluorescente como la 6-carboxifluoresceína (6-CF) en la bicapa permite examinar los liposomas bajo microscopía fluorescente (1, 47, 51, 60).

3. Microscopía electrónica con tinción negativa. En este método se utiliza molibdato o fosfotungsteno como revelador, es el método de elección para el análisis de distribución de tamaño de cualquier preparado de 5 μ m (60).

La muestra se coloca en buffer u otra solución, y se coloca en una plancha de cobre cubierta de una película de carbono, agregando ácido fosfotungsténico o molibdato de amonio (2, 16, 45, 47).

4. *Microscopía electrónica de criofractura.* Este método es útil para observar las estructuras morfológicas de los liposomas. Desde planos fracturados a través de las vesículas. Este método provee datos sobre el diámetro, tamaño, distribución del tamaño de partícula y número de capas.

Otros métodos para la caracterización de los liposomas son la turbidez, viscosidad y fluidez (47, 60).

1.3.8. Comportamiento de fase de los liposomas

Un carácter importante de los fosfolípidos de membrana es la existencia de una dependencia reversible de la temperatura de transición de fase, donde la cadena hidrocarbonada de los fosfolípidos sufren una transformación de un estado ordenado (gel) a un estado fluido desordenado (líquido cristalino).

Estos cambios han sido documentados por microscopía electrónica de criofractura, pero es más fielmente demostrado por Calorimetría de Barrido Diferencial (DSC).

En la figura 13 se representa la transición de fase de fosfolípidos de gel a líquido cristalino (21, 37, 46, 48, 60)

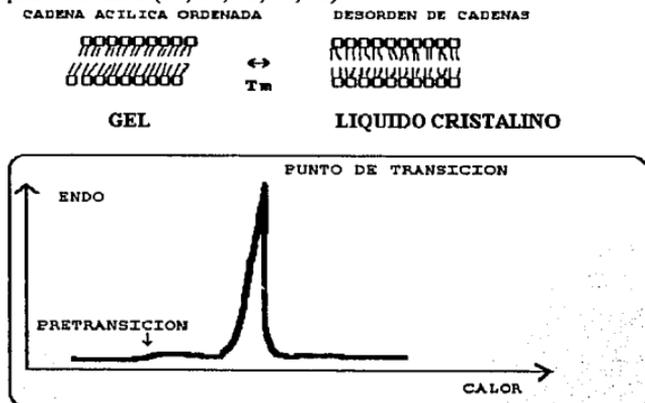


Figura 13. Transición de fase de fosfolípidos de gel a líquido cristalino (60).

El estado físico de la bicapa afecta profundamente la permeabilidad de los liposomas.

Cada uno de los fosfolípidos puros seleccionados regularmente para los liposomas tiene una T_m (Temperatura de transición de fase) característica para la transición de gel a líquido cristalino.

La temperatura de transición depende de la naturaleza del fosfolípido y puede variar entre -20 y $+90^\circ\text{C}$. Mezclando diferentes componentes en la bicapa puede causar un cambio en la T_m y/o una completa desaparición de la transición de la fase (48).

En la tabla 2 se muestran las temperaturas de transición de fase de algunos fosfolípidos usados en la preparación de liposomas.

FOSFOLIPIDOS	CARGA	T_m ($^\circ\text{C}$)
Dilauril fosfatidil colina	0	-2
Dimiristol fosfatidil colina	0	23
Dipalmitol fosfatidil colina	0	41
Dioleoil fosfatidil colina	0	-22
Diestearoil fosfatidil fosfatídico	0	58
Acido dimiristol fosfatídico	-	57
Acido dipalmitoil fosfatídico	-	67
Dimiristoil fosfatidil glicerol	-	28
Dioleoil fosfatidil glicerol	-1	-18
Dilauril fosfatidil glicerol	-1	4
Diestearoil fosfatidil glicerol	-1	55
Dipalmitoil fosfatidil glicerol	-1	41
Dipalmitoil fosfatidil etanolamina	-	60
Dimiristol fosfatidil etanolamina	0	48
Fosfatidil colina de huevo	0	-10
Fosfatidil glicerina cerebral	-	67
Esfingomielina cerebral	-	32

Tabla 2. Temperaturas de transición de fase de algunos fosfolípidos usados en la preparación de liposomas (38, 48, 60).

1.3.9. Estabilidad de los liposomas

La estabilidad de cualquier producto farmacéutico o cosmético se define como la capacidad de la formulación de mantenerse dentro de los límites definidos por un período de tiempo predeterminado (60).

Los liposomas son termodinámicamente metaestables, debido a la alta curvatura de sus estructuras vesiculares en solución acuosa.

La mayor degradación química que sufren es la autooxidación, resultando la formación de peróxidos y aldehídos parcialmente tóxicos. La hidrólisis da la formación de lisolecitinas y ácidos grasos libres, debido a elevadas temperaturas y rangos extremos de pH (el rango mínimo de hidrólisis es de pH 5 a 8) (3).

ESTABILIDAD QUIMICA.

La estructura química de los fosfolípidos es susceptible a la degradación por proceso hidrolítico y oxidativo.

La autooxidación de las lecitinas genera productos intermediarios que incluyen oxi-, peroxi- y epoxilípidos, que son degradados a compuestos carbonílicos, hidrocarburos y furanos. La hidrólisis de lecitinas forma lisofosfolípidos y ácidos grasos libres.

Los productos de degradación de la autooxidación son tóxicos y los de la hidrólisis incrementan enormemente la permeabilidad de los liposomas y por ésto puede perderse el fármaco o agente cosmético encapsulado.

El colesterol usado en combinación con los fosfolípidos es oxidado y sus productos de oxidación también afectan las propiedades de membrana del liposoma (3, 50, 60).

También puede afectar la luz en los liposomas que contienen sustancias fotooxidables (debido a los rayos UV) (13, 60).

Para evitar la autooxidación se pueden adicionar agentes antioxidantes sintéticos como el butilhidroxianisol (BHA) y el butilhidroxitolueno (BHT); o naturales como la vitamina E, vitamina C y vitamina A, que además de tener propiedades cosméticas ayudan a la estabilización. También se utilizan fosfolípidos hidrógenados, uso de atmósfera de argón o nitrógeno para minimizar la exposición al oxígeno, uso de contenedores resistentes a la luz,

remoción de metales pesados por el uso de EDTA. La hidrólisis puede ser eliminada por el uso de otros fosfolípidos sintéticos.

Otros métodos de estabilización son la polimerización, microencapsulación de los liposomas y el uso de surfactantes no iónicos (8, 16, 21, 24).

ESTABILIDAD FISICA

Los liposomas son termodinámicamente metaestables intrínsecamente con un gran contenido de energía libre en los extremos de su curvatura, en especial en pequeñas vesículas.

Esta energía libre es reducida a través de la fusión de formas grandes multilaminares, que son favorablemente energéticas. El proceso de fusión va acompañado por la pérdida del fármaco o agente cosmético encapsulado.

Las técnicas de protección física involucran el congelamiento y la liofilización de los liposomas, además de equilibrar las cargas de los componentes.

Se han utilizado la estabilización de los liposomas con crioprotectores. Estos agentes se adicionan y las vesículas pueden resistir las temperaturas de congelación y liofilización.

Algunos agentes crioprotectores son disacáridos (trialosa, sucrosa, maltosa y lactosa), aminoácidos (alanina, prolina, betaina, y betaina glicinal), glicerol, butanodiolos, trioles y propanodiolos (3).

PRUEBAS DE ESTABILIDAD

Las pruebas a altas temperaturas son las más utilizadas ($>25^{\circ}\text{C}$) para productos heterogéneos. Varios laboratorios almacenan sus productos a temperaturas entre 4°C (refrigeración) a 50°C . Las temperaturas usadas en los ciclos de calor-congelación pueden ser variadas.

Para los liposomas las altas temperaturas pueden alterar la naturaleza de la capa interfacial dramáticamente, especialmente si la temperatura de transición de fase es rebasada. Si se espera que el producto sea expuesto a temperaturas de 45°C por un período extenso de tiempo o períodos cortos (transporte y almacenamiento) se justifican estudios a $45-50^{\circ}\text{C}$ (ciclos de calentamiento-congelación y a largo tiempo).

Un estudio de un producto a estas temperaturas determina el aumento de temperatura que puede resistir y además si existe daño determinar si es reversible o irreversible a temperatura ambiente (60).

1.3.10. Toxicidad de los liposomas

Los liposomas tópicamente son muy bien tolerados.

La administración de liposomas que contienen una alta proporción de fosfolípidos cargados negativamente, como es el fosfatidilinositol causa que la piel se reseque cuando se aplica en humanos. El potencial tóxico de los liposomas aumenta considerablemente por la inclusión de componentes no fosfolipídicos.

La aplicación tópica de los liposomas en la piel es raramente asociado con intolerancia local. Las formulaciones con liposomas tienden a proteger los tejidos de los efectos tóxicos de componentes encapsulados y son mejor tolerados que la sustancia libre (39).

1.3.11. Propiedades de los agentes cosméticos utilizados en la preparación de los liposomas tipo MLV.

1. COLAGENO.

El colágeno es una proteína fibrosa insoluble del tejido conectivo, tendones y huesos. Constituye cerca del 60% de la proteína en los vertebrados. Se desnaturaliza arriba de los 37°C.

El colágeno es sintetizado por células llamadas fibroblastos. Se produce primero un monómero, el tropocolágeno, conocido también como colágeno soluble. El tropocolágeno existe en forma monomérica por un día después de su síntesis por los fibroblastos, así que un porcentaje del colágeno corporal esta presente como tropocolágeno, esta presencia en la dermis es parcialmente responsable de mantener la piel firme y suave.

El colágeno es rico en prolina e hidroxiprolina, presenta una estructura triple helicoidal (figura 14), la cual le confiere propiedades de retención de humedad, imprime elasticidad, combate resequeidad y la

escamación de la piel. La propiedades anteriores permiten que el colágeno sea utilizado ampliamente en los cosméticos.

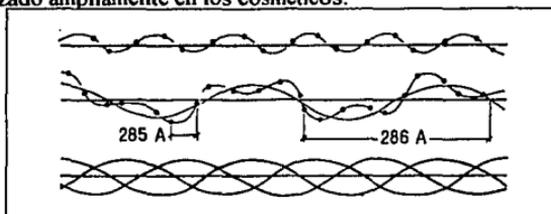


Figura 14. Estructura básica del colágeno (7).

El tropocolágeno extraído del tejido conectivo usando ácidos diluidos, para el uso en cosméticos como Clearcol®, de Laboratorios Croda, presenta una moderada solubilidad en agua y tiene excelentes propiedades para la retención de humedad, formando una película en la piel que da la sensación de suavidad (7).

El colágeno se ha utilizado para secuestrar liposomas en una matriz-gel, induciendo su gelación por temperatura o pH (61).

2. VITAMINA E.

La vitamina E o acetato de alfa-tocoferol es un líquido oleoso claro, ligeramente amarillo y viscoso. Es soluble en grasas, solventes orgánicos como etanol, cloroformo y acetona, insoluble en agua.

La vitamina E tiene propiedades antioxidantes y puede conferir mayor estabilidad a los lípidos que forman los liposomas. Además posee propiedades emolientes en la piel.

La estructura del acetato de alfa tocoferol (vitamina E) se muestra en la figura 15 (25, 27, 54).

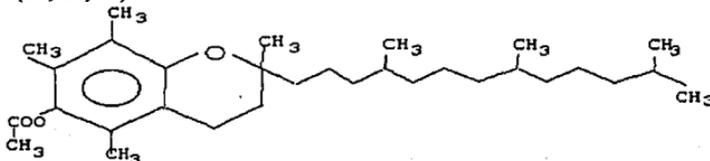


Figura 15. Estructura química de la vitamina E (25, 54).

En el caso de la vitamina E por ser un compuesto lipofílico las concentraciones para la preparación de los liposomas no debe superar al 10%, debido a que pueden ocurrir entre la vitamina E y los componentes de la membrana una interacción que puede ser perjudicial (33).

3. GLICERINA.

La glicerina es un líquido claro, incoloro, inodoro e higroscópico de sabor dulce. Es soluble en agua y alcohol, insoluble en éter, benceno, cloroformo y aceites fijos y volátiles.

La glicerina o glicerol tiene propiedades humectantes a concentraciones menores del 30%, a mayores concentraciones se produce el efecto contrario debido a su alta higroscopicidad.

En la figura 16 se muestra su estructura química (20, 27, 54).

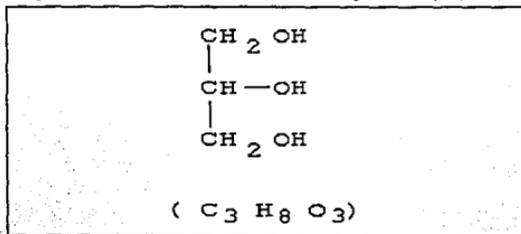


Figura 16. Estructura química de la glicerina (27).

II. METODO

2.1. REACTIVOS

Fosfo 97® Fancor (fosfolípidos), **Clearcol® Croda** (colágena al 1%), Vitamina E GR, Metanol GR, Cloroformo GR, Glicerina GR, Tripsina *Sigma*, Potasio dihidrogenofosfato GR *Merck*, Potasio hidrogenofosfato trihidrato GR *Merck*, Acido fosfotungsténico GR, Rojo de rutenio GR, glutaraldehído GR; isopropanol, ácido tricloroacético, acetonitrilo, ácido acético, hidróxido de tetrabutilamonio y ácido sulfúrico grado HPLC *Baker*.

2.2. EQUIPO

Microscópio electrónico de transmisión Jeol-100, Microscópio óptico Olympus, Rotavapor R-100 Brinkmann, Balanza analítica Sauter TYP414/10, Estufa Kinet, Cámara fotográfica Minolta X-9, Tensiómetro Du NÖUY CENCO, Vernier, HPLC LDC Analytical, Detectores Spectro Monitor 3100 (UV), Refracto Monitor IV (Índice de refracción), Detector electroquímico, centrifuga Eppendorf 5415C. Columnas cromatográficas: Rezex ROA-organic acid 300x7.8 mm con tamaño de partícula de 5µm en el caso de glicerina, columna C₁₈ Perkin Elmer para la vitamina E y Supelco 304 para colágena.

2.3. MATERIAL BIOLÓGICO

Ratones albinos de ambos sexos de aproximadamente 6 meses de edad y de 30g aproximadamente de peso libres de dieta.

2.4. PROCEDIMIENTO

2.4.1. PREPARACION DE LIPOSOMAS TIPO MLV.

(18, 23, 40, 46, 60)

Se implementó este método, por ser el que se adapta a las condiciones y al material disponible en el Laboratorio de Investigación de Farmacia en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

Se elaboraron liposomas multilaminares cargados con los agentes cosméticos : Colágena, glicerina, vitamina E y agua, (éste último también fué considerado excipiente dentro de la formulación). Las proporciones de las formulaciones fueron establecidas en estudios preliminares realizados en este laboratorio.

La formulación de las preparaciones de liposomas fué siempre de fosfolípidos:agente cosmético:agua,(porcentaje en peso). Se preparó una formulación diferente para cada agente cosmético de acuerdo a su solubilidad en agua; manteniendo en las cuatro formulaciones un porcentaje de fosfolípido constante (2.5%), el % de agente cosmético es diferente para cada uno de ellas, completando el 100% de la formulación con agua, como se muestra enseguida:

COMPONENTE	FORMULACIONES(% EN PESO)			
	COLAGENA	GLICERINA	VITAMINA E	AGUA
Fosfolípidos	2.5	2.5	2.5	2.5
Agente cosmético	2.5	1.0	0.1	—
Agua	95	96.5	97.4	97.5

El procedimiento de preparación de las formulaciones es es siguiente: Los fosfolípidos fueron disueltos en una mezcla de solventes orgánicos (cloroformo-metanol, 3:1) a temperatura ambiente. Esta mezcla se colocó en el rotavapor a una temperatura de 40°C, se agitó moderadamente hasta la evaporación del solvente, posteriormente se adicionó agua con el agente cosmético en las proporciones correspondientes.

2.4.2. CICLO DE ESTABILIDAD (36).

Se colocaron las muestras de las diferentes formulaciones en tubos de rosca resguardados de la luz por tres meses. El ciclo fue de 7 días a 45°C, 1 día a 25°C, 7 días a 5°C y 1 día a 25°C. La evaluación se realizó de manera visual inspeccionando si ocurría separación de fases, cambio de color o precipitación.

2.4.3. EVALUACIONES FISICAS

Se realizó la prueba de gota (dejando caer en agua una gota de cada formulación, que indica la presencia de vesículas). Por otro lado, las formulaciones preparadas se observaron con microscopio óptico inmediatamente y después de dos meses de su elaboración, así mismo, se analizaron por microscopía electrónica de transmisión con tinción negativa y rojo de rutenio (2, 16, 45, 47).

TINCION NEGATIVA: Una gota de las formulaciones se colocan en una rejilla de cobre con una película Formvar® por 10 minutos y el exceso se remueve con papel filtro. Se coloca una gota de ácido fosfotungsténico al 1% pH 7 por 15 minutos, se remueve el exceso y se deja secar. Las muestras teñidas se observan en el microscopio electrónico de transmisión Jeol-100.

TINCION NEGATIVA CON ROJO DE RUTENIO: Se coloca la muestra, (aproximadamente 5 ml), en una solución de glutaraldehído-rojo de rutenio por 15 minutos, posteriormente se sigue el procedimiento antes mencionado para la tinción negativa.

Las fotografías fueron tomadas en la UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán en la sección de Microscopía Electrónica.

2.4.4. ESTUDIO DE HUMECTACION (1, 3, 5, 44, 57).

Se midió, con la ayuda de un tensiómetro Du NÖUY modificado y previamente validado (Apendice B), la capacidad de elongación de muestras de piel de ratón tratadas con los liposomas preparados, utilizando como control muestras de piel tratadas con una mezcla de los materiales empleados en las formulaciones anteriores. Se utilizó como referencia muestras de piel

tratadas con agua, considerado como un agente humectante natural. El estudio se realizó a diferentes fuerzas y tiempos de exposición. Las pruebas se realizaron a 37°C.

OBTENCION DE ESTRATO CORNEO DEL DORSO DEL RATON POR DIGESTION ENZIMATICA: Se descerebra al ratón y se obtiene la piel del dorso, se elimina el pelo y la grasa subcutánea colocando la muestra en una bolsa y sumergiéndola por 3 minutos en un baño de agua a 60°C. Se coloca la muestra por el lado de la dermis en papel filtro impregnado de una solución de tripsina al 1% en buffer de fosfatos a pH 8 por 30 minutos a 37°C. Lavar con agua destilada y cortar en tiras de 0.5cm de ancho por 3cm de longitud.

INCUBACION DE LAS MUESTRAS: Las muestras de estrato córneo son incubadas con un volumen de 70 μ l de las diferentes formulaciones de liposomas y mezcla de los materiales utilizados, además de agua. Las muestras se exponen a diferentes tiempos (20, 60, 90, 120 y 180 minutos) a una temperatura de 37°C.

ESTUDIO DE ELONGACION: Este estudio se realizó utilizando un tensiómetro de Du NOUY modificado y previamente validado.

Se utilizaron adaptadores para fijar la piel, después se hizo girar el dial del tensiómetro y se midió la capacidad de elongación de la muestra.

La elongación se mide con un vernier y la fuerza aplicada en dinas se determina mediante la curva de calibración hasta un valor dado por la misma.

2.4.5. CUANTIFICACION POR CLAR (CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION) (62)

Se prepararon las formulaciones de liposomas encapsulando glicerina a concentración de 15.1656 mg/ml, de colágeno a 27.9783 mg/ml, y de vitamina E a una concentración de 1.0266 mg/ml.

Se centrifugaron las muestras a 14000 rpm durante 30 Horas. Se tomó el sobrenadante de la parte superior para su cuantificación por CLAR. La cuantificación se realizó a temperatura ambiente.

La colágena fué cuantificado utilizando como fase móvil una mezcla de ácido sulfúrico 0.005mM/Agua a una velocidad de flujo de 1 ml/min con un detector de índice de refracción.

Para la cuantificación de glicerina la fase móvil fué una mezcla de isopropanol: agua (50:50)/ ácido tricloro acético al 1% a una velocidad de flujo de 2 ml/min con detección ultravioleta a 220 nm.

La vitamina E se cuantificó utilizando como fase móvil una mezcla de isopropanol, acetonitrilo, agua, ácido acético, hidróxido de tetrabutilamonio (600:200:200:4:5). La velocidad de flujo fué de 0.9 ml/min, el detector electroquímico es a 5100; el detector 1 es a 0.07V y el detector 2 a 0.5V, la celda guardia a 0.55V.

En todos los casos se realizó la cuantificación por triplicado utilizando curvas de calibración.

La cuantificación por CLAR se realizó en la UNAM Campus Iztacala, en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales.

III. RESULTADOS

Preparación de liposomas tipo MLV

Se obtuvieron liposomas con diferentes agentes cosméticos por el método de rotavapor, como puede observarse en las fotografías tomadas en el microscopio óptico, figuras 17A, 18A, 19A y 20A en las que se observan las vesículas formadas.

En las fotografías tomadas con el microscopio electrónico utilizando la técnica de tinción negativa, se observan las vesículas apreciándose también forma y tamaño, figuras 21A, 22A, 22B, 22C y 22D.

Ciclo de estabilidad

En todas las muestras de las diferentes formulaciones se observa una estabilidad de por lo menos dos meses. Se evaluó la estabilidad de forma visual buscando separación de fases y por medio de la observación al microscopio óptico y electrónico.

Se observa la diferencia entre las muestras recién preparadas con gran población de vesículas, y después de dos meses de almacenamiento sometidas a el ciclo de estabilidad con protección a la luz presentan fusión y aglomeración de vesículas disminuyendo su población.

Lo anterior se aprecia en las figuras 17A y B; 18A y B; 19A y B; 20A y B, fotografías tomadas en el microscopio óptico de las formulaciones liposomadas recientemente (A) y después de almacenamiento por dos meses (B); agua, glicerina, colágena y vitamina E respectivamente.

La fusión de las vesículas se observa más claramente en las fotografías obtenidas en el microscopio electrónico por tinción negativa, figuras 21A y 21B.

Evaluaciones físicas

La prueba de gota se realizó a las muestras de las diferentes formulaciones liposomales, encontrándose en todas la formación de hilos que indican la presencia de vesículas.

Las fotografías obtenidas en el microscopio óptico de las diferentes formulaciones recién preparadas y con dos meses de almacenamiento se observan en las figuras 17A y B; 18A y B; 19A y B; 20A y B.

Las fotografías del microscopio electrónico utilizando la tinción negativa se observan en la figura 21A y 21B. También se obtuvieron fotografías en el microscopio electrónico utilizando la tinción negativa-rojo de rutenio (colorante que tiñe las membranas), apreciándose mucho mejor la forma casi esférica y tamaño de las vesículas. El tamaño, de aproximadamente un 80 % de la población de liposomas, ésta en un rango de 100 a 300 nm, aunque se observan liposomas del orden de los 1000 nm. Las figuras 22A, 22B, 22C y 22D muestran los liposomas de las formulaciones de agua, glicerina, colágena y vitamina E respectivamente.

El tamaño de las vesículas se evaluó considerando la población que se observa en los negativos de las fotografías tomadas por el microscopio electrónico y se realizó el tratamiento utilizado por Doane (64) en el cual se utiliza un nomograma para determinar el tamaño de un objeto a partir de las fotografías tomadas por microscopía.

Estudio de Humectación

Se midió con ayuda de un tensiómetro Du NÖUY modificado y validado la capacidad de elongación de las muestras de piel de ratón (estrato córneo) tratadas con las formulaciones de liposomas, mezclas de los

materiales y agua como agente humectante natural. El estudio se realizó a diferentes fuerzas y tiempos de exposición.

En la tabla 3 se muestran los datos de elongación del estrato córneo sometida a una fuerza constante de 7137.97 dinas tratado con los diferentes formulaciones a diferentes tiempos de exposición, éstos datos se representan en la gráfica 1.

En las tablas 4, 5, 6 y 7 se representan los datos de elongación a 60 minutos sometidos a diferentes fuerzas con las diferentes formulaciones liposomadas y sus mezclas; así como también la aplicación de agua. Los gráficos 2, 3, 4 y 5 muestran estos resultados.

Además en la tabla 8 se recopilan los datos de elongación obtenida de todas las preparaciones liposomadas a diferentes fuerzas de elongación a un tiempo de 60 minutos en la gráfica 6 se representan estos resultados.

Cuantificación por CLAR

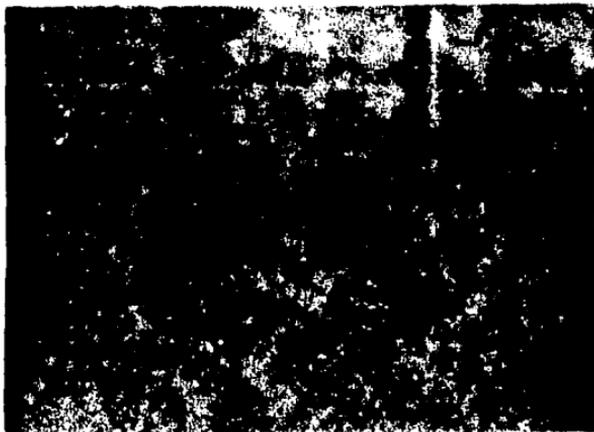
Se prepararon formulaciones de liposomas de glicerina, colágena y vitamina E a concentraciones de 15.1656mg/ml, 27.9283mg/ml y 1.0266mg/ml respectivamente. Se cuantificaron por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución obteniéndose concentraciones de 10.22 mg/ml, 0.4946 mg/ml y 0.136mg/ml en el sobrenadante (62, 63).

Por lo tanto la eficiencia de encapsulación es de 32.61 % de glicerina, 98.23 % de colágeno y 98.66% de vitamina E en los liposomas.

El cálculo de la eficiencia de la encapsulación se realizó considerando la concentración inicial de la formulación menos la concentración del sobrenadante, el resultado es la concentración que se encapsuló en las vesículas. Después se realizó la relación en la cual la concentración inicial es el cien por ciento para obtener la eficiencia de la encapsulación.

Figura 17. Liposomas cargados de agua (A) recientemente preparados y (B) con dos meses de almacenamiento. Microscópio óptico 40X.

A



B

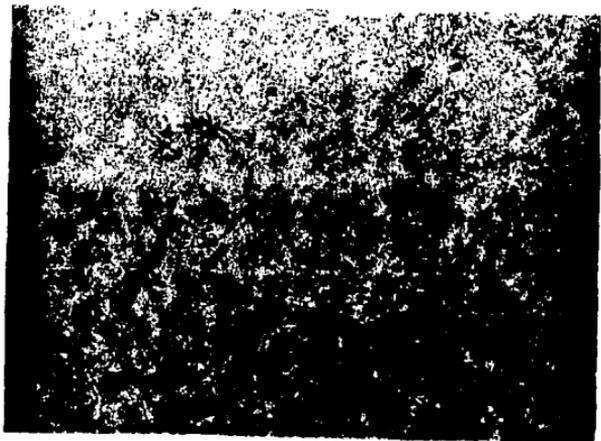
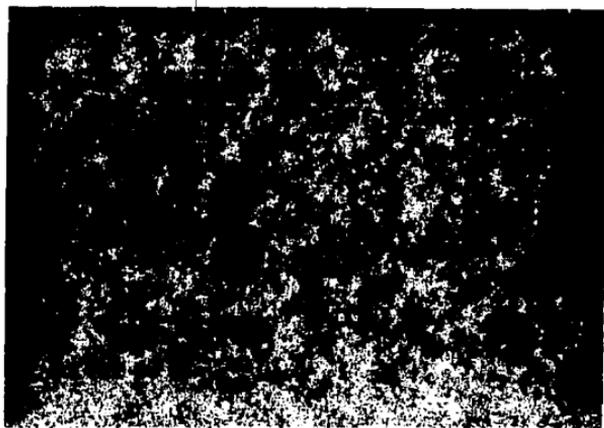


Figura 18. Liposomas cargados con glicerina (A) recientemente preparados y (B) con dos meses de almacenamiento. Microscópio óptico 40X.

A



B

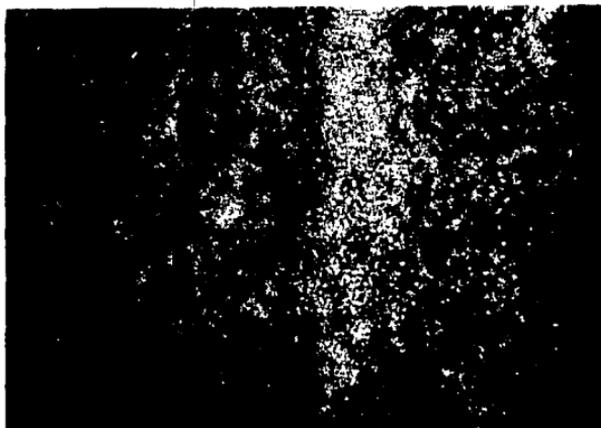


Figura 19. Liposomas cargados de colágeno (A) recientemente preparados y (B) con dos meses de almacenamiento. Microscópio óptico 40X.

A



B

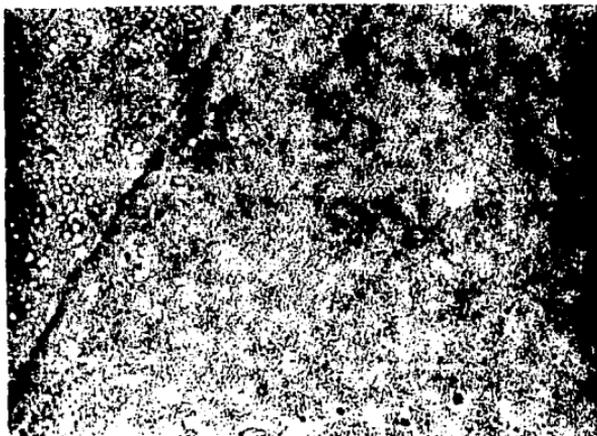
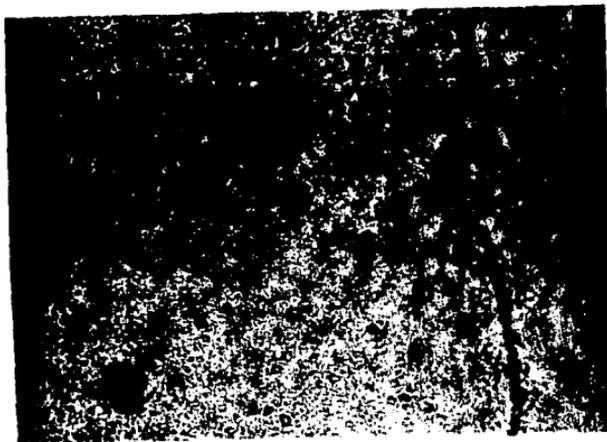


Figura 20. Liposomas cargados de vitamina E (A) recientemente preparados y (B) con dos meses de almacenamiento. Microscópio óptico 40X.

A



B

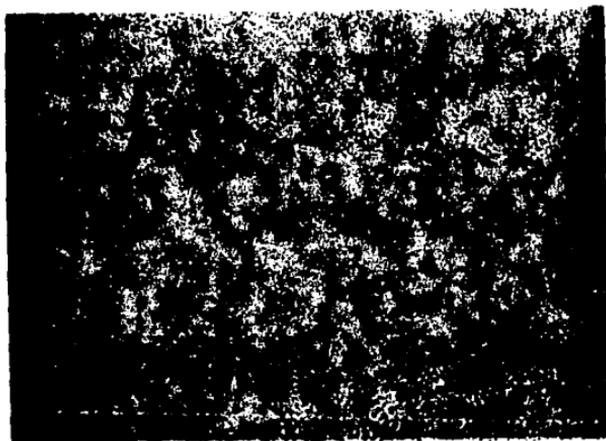
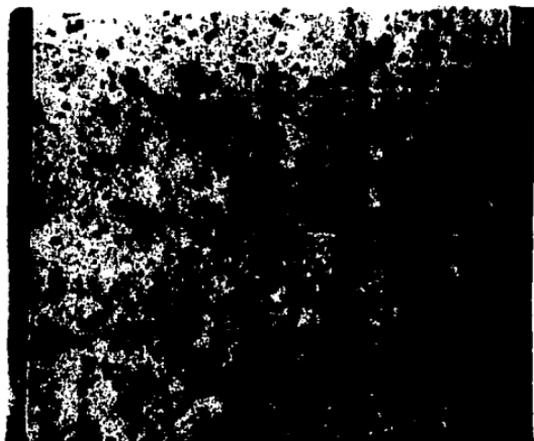


Figura 21. Liposomas cargados de agua (A) recientemente preparados y (B) con dos meses de almacenamiento. Microscópio electrónico. Tinción negativa 10000X.

A



B

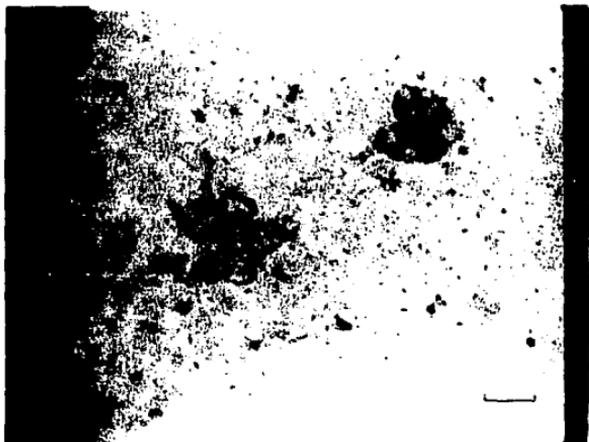
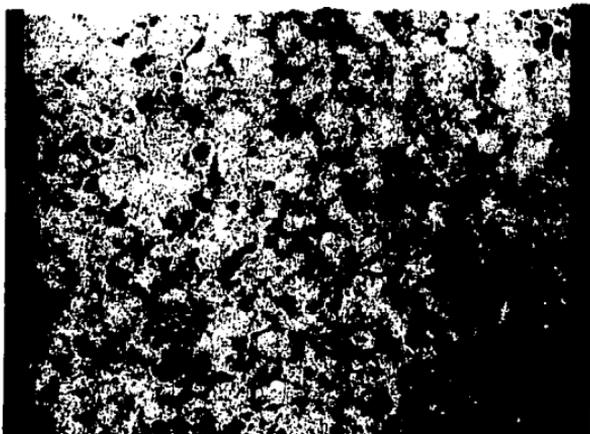


Figura 22. Liposomas recientemente preparados cargados de (A) agua; (B) glicerina; (C) colágeno y (D) vitamina E. Microscópio electrónico Tinción negatica-rojo de rutenio 10000X.

A
AGUA



B
GLICERINA

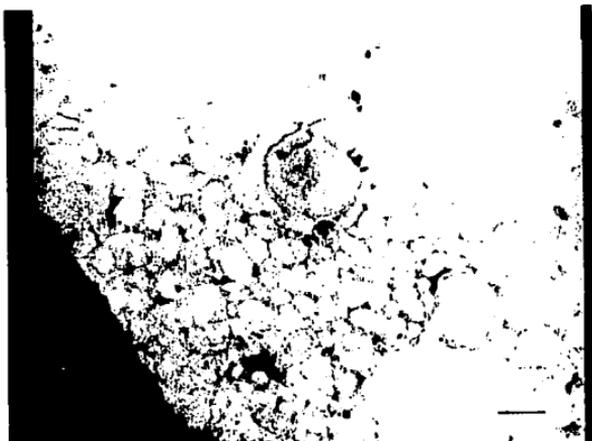
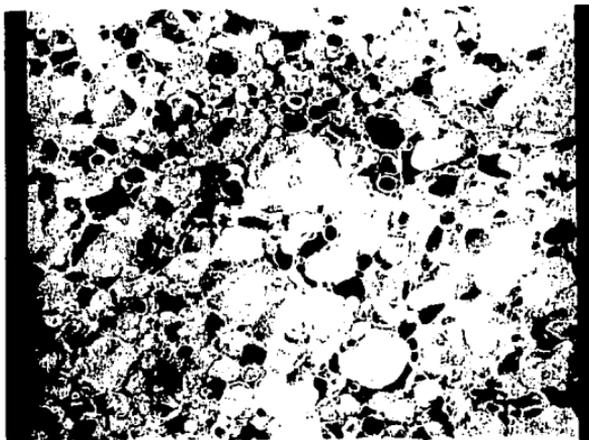
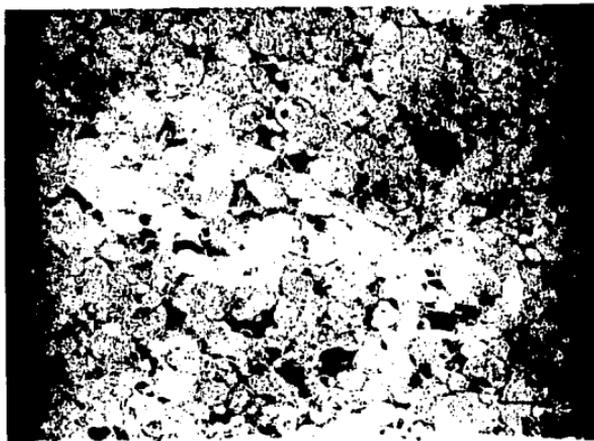


Figura 22. (continuación). Liposomas recientemente preparados cargados con (A) agua; (B) glicerina; (C) colágeno y (D) vitamina E. Microscópio electrónico, Tinción negativa-rojo de rutenio 10000X.

C
COLAGENO



D
VITAMINA E



TIEMPO (minutos)	ELONGACION (mm)			
	AGUA	GLICERINA	COLAGENO	VITAMINA E
0	0	0	0	0
20	2.9	3.7	2.8	2.8
60	3.1	2.5	3.0	2.9
90	3.0	2.7	1.9	2.1
120	3.1	1.5	2.1	2.9
180	1.4	1.0	1.0	1.2

Tabla 3. Elongación (Efecto de humectación) del estrato córneo sometido a una fuerza constante de 7137.97 dinas y tratado con liposomas cargados con agua, glicerina, colágeno y vitamina E a diferentes tiempos de exposición.

FUERZA (dinas)	ELONGACION (mm)		
	AGUA	MATERIAL	LIPOSOMAS C / AGUA
0	0	0	0
1774.31	0.3	0.5	0.9
3552.20	0.5	0.8	1.8
5350.38	0.55	0.9	2.5
7137.97	0.6	1.2	3.1

Tabla 4. Elongación (efecto de humectación) sobre estrato córneo a 60 minutos de aplicación de agua, mezcla de materiales y liposomas cargados de agua.

FUERZA (dinas)	ELONGACION (mm)		
	AGUA	MATERIAL	LIPOSOMAS C / GLICERINA
0	0	0	0
1774.31	0.3	0.5	0.6
3562.20	0.5	1.0	1.9
5350.38	0.55	1.1	2.0
7137.97	0.6	1.5	2.5

Tabla 5. Elongación (efecto de humectación) sobre estrato córneo a 60 minutos de aplicación de agua, mezcla de materiales y liposomas cargados de glicerina.

FUERZA (dinas)	ELONGACION (mm)		
	AGUA	MATERIAL	LIPOSOMAS C / COLAGENO
0	0	0	0
1774.31	0.3	0.5	1.0
3562.20	0.5	1.6	2.4
5350.38	0.55	1.8	2.6
7137.97	0.6	2.6	3.0

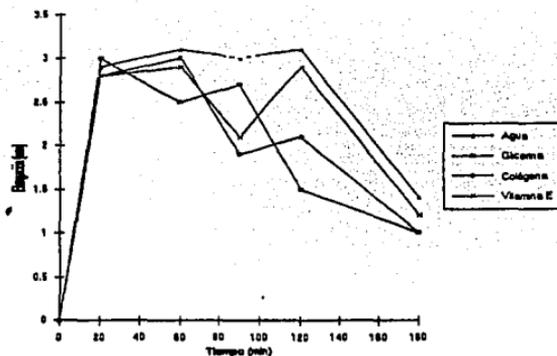
Tabla 6. Elongación (efecto de humectación) sobre estrato córneo a 60 minutos de aplicación de agua, mezcla de materiales y liposomas cargados de colágeno.

FUERZA (dinas)	ELONGACION (mm)			
	AGUA	GLICERINA	COLAGENO	VITAMINA E
0	0	0	0	0
1774.31	0.9	0.8	1.0	0.9
3562.20	1.6	1.9	2.4	1.9
5350.38	2.5	2.0	2.6	2.2
7137.97	3.1	2.6	3.0	2.9

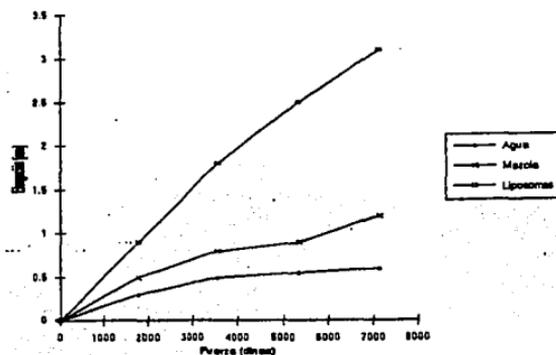
Tabla 7. Elongación (efecto de humectación) sobre estrato córneo a 60 minutos de aplicación de agua, mezcla de materiales y liposomas cargados de vitamina E.

FUERZA (dinas)	ELONGACION (mm)		
	AGUA	MATERIAL	LIPOSOMAS C / VITAMINA E
0	0	0	0
1774.31	0.3	0.8	0.9
3562.20	0.5	1.3	1.9
5350.38	0.55	2.0	2.2
7137.97	0.6	3.0	2.9

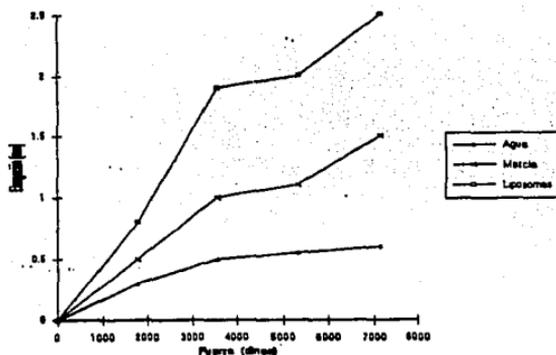
Tabla 8. Elongación (efecto de humectación) de estrato córneo tratado con liposomas cargados de agua, glicerina, colágeno y vitamina E durante 60 minutos.



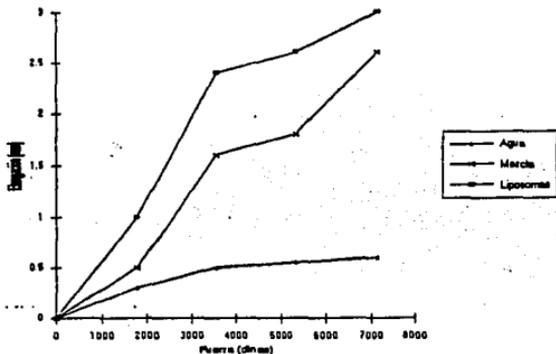
Gráfica 1. Elongación (Efecto de humectación) del estrato córneo sometido a una fuerza constante de 7137.97 dinas y tratado con liposomas cargados con agua, glicerina, colágeno y vitamina E a diferentes tiempos de exposición.



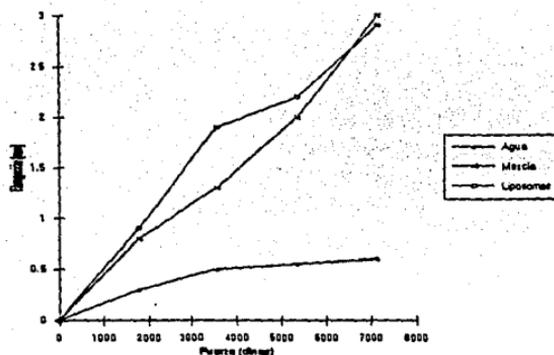
Gráfica 2. Elongación (efecto de humectación) sobre estrato córneo a 60 minutos de aplicación de agua, mezcla de materiales y liposomas cargados de agua.



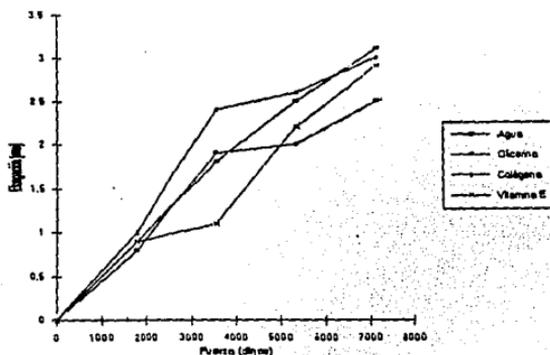
Gráfica 3. Elongación (efecto de humectación) sobre estrato córneo a 60 minutos de aplicación de agua, mezcla de materiales y liposomas cargados de glicerina.



Gráfica 4. Elongación (efecto de humectación) sobre estrato córneo a 60 minutos de aplicación de agua, mezcla de materiales y liposomas cargados de colágeno.



Gráfica 5. Elongación (efecto de humectación) sobre estrato córneo a 60 minutos de aplicación de agua, mezcla de materiales y liposomas cargados de vitamina E.



Gráfica 6. Elongación (efecto de humectación) de estrato córneo tratado con liposomas cargados de agua, glicerina, colágeno y vitamina E durante 60 minutos.

IV. DISCUSION

En las formulaciones de los liposomas se utilizó la proporción de fosfolípidos al 2.5 % (P/P). La colágena, que es un agente cosmético medianamente hidrosoluble, se empleó al 2.5%. La vitamina E, material altamente lipofílico, presentó problemas de separación de fases por lo que se construyó un diagrama ternario para determinar la zona de máxima estabilidad, empleándose a una concentración del 0.1% (apéndice A). Inicialmente la glicerina -muy hidrosoluble- se utilizó al 2.5%, pero debido a su capacidad para solubilizar fosfolípidos se disminuyó la concentración al 1%.

Los lotes preparados se sometieron a la prueba de gota y, aunque está no es una prueba confirmatoria, se detectó la formación de vesículas.

La prueba de estabilidad demostró que los liposomas mantienen sus propiedades durante un periodo de por lo menos 2 meses iniciándose, después de este tiempo, la fusión de las vesículas.

En las fotografías obtenidas en el microscopio óptico se observa que en todos los lotes recién preparados (Figuras 17A, 18A, 19A y 20A) existe una mayor densidad de vesículas que en los lotes almacenados durante 2 meses (Figuras 17B, 18B, 19B y 20B).

El estudio de microscopía electrónica de transmisión con tinción negativa-rojo de rutenio (colorante que tiñe las membranas celulares). Se realizó para confirmar la formación de los liposomas en los diferentes lotes, y se encontró la presencia de vesículas como muestran las figuras 22A, 22B, 22C y 22D. Por otra parte, se analizaron también lotes recién preparados y lotes con dos meses de almacenamiento y se observó que en los primeros las vesículas eran más numerosas, regulares y definidas (Figura 21A) que en los lotes con almacenamiento (Figura 21B) en donde incluso, se detectan aglomerados de liposomas.

Con las observaciones anteriores se demuestra que las diferentes formulaciones sí contienen liposomas, por lo que se procedió a evaluar el efecto de humectación y emoliencia de cada formulación sobre el estrato córneo de ratón. En esta prueba se valoró la elongación de las muestras de estrato córneo sometidas a una fuerza constante de 7,137.97 dinas con

respecto al tiempo de aplicación de cada formulación, se obtuvo la gráfica 1, en el que se observa que a un tiempo de 60 minutos todas las formulaciones presentan un comportamiento similar. Las muestras tratadas con los liposomas conteniendo agua presentaron a este tiempo la mayor elongación, seguidos de la preparación con colágena, después con vitamina E y por último la formulación de glicerina. A partir de los 60 minutos la elongación de todas las muestras a excepción de las tratadas con vesículas cargadas con agua disminuyó.

Se evaluó también la elongación de muestras de piel sometidas a diferentes fuerzas, para lo que se eligió la aplicación a 60 minutos por presentarse en éste tiempo la mayor uniformidad con una respuesta alta.

El efecto sobre la piel de cada uno de los lotes de liposomas fué comparado con el efecto obtenido por la aplicación de la mezcla de sus componentes, así como también con el efecto obtenido por la aplicación de agua (Gráficos 2, 3, 4 y 5). En todos los casos, con excepción de la vitamina E, las muestras tratadas con los liposomas presentaron una elongación mucho mayor que la presentada por las muestras tratadas con la mezcla de materiales y aún más que las tratadas con agua. En el caso de la piel con aplicación de la formulación con vitamina E, la elongación resultó similar con los liposomas y la mezcla.

Por otra parte, se observó también que al someter las muestras de piel a un tiempo constante de 60 minutos y a diferentes fuerzas la elongación obtenida con todas las preparaciones fué aproximadamente 3mm, exceptuando a la preparación con glicerina con la que se obtuvo una elongación de 2.5mm (Gráfico 6).

El tamaño, de aproximadamente el 80 % de la población de los liposomas, ésta en un rango de 100 a 300 nm, aunque se observan vesículas del rango de 1000 nm. El tamaño se encuentra dentro del rango establecido en la bibliografía para las vesículas grandes multilaminares.

La eficiencia de encapsulación para los liposomas de glicerina fué del 32.61%, de los liposomas de colágeno del 98.23% y de los liposomas de vitamina E del 98.66%, determinada por CLAR.

VI. CONCLUSIONES

Se obtuvieron liposomas tipo MLV (vesícula grande multilaminar) por el método del rotavapor.

Se consiguió encapsular agentes cosméticos con diferente grado de solubilidad en los liposomas; agua, glicerina, colágeno y vitamina E.

Aproximadamente un 80% de la población de liposomas tiene un tamaño de 100 a 300 nm y son de forma casi esférica.

La eficiencia de encapsulación de los liposomas de glicerina fué de 32.61 %, del colágeno de 98.23 % y de vitamina E de 98.66%.

La estabilidad de los liposomas es de aproximadamente dos meses en todas las formulaciones.

Se comprobó que las formulaciones de los liposomas presentan mayor efecto que las mezclas de los componentes. El efecto de los liposomas varía de acuerdo al material cargado, observándose el mayor efecto con la carga de agua, seguida por las cargas de colágena y de vitamina E y por último por la carga de glicerina.

La formulación de liposomas con agua son los que presentan mayor efecto humectante.

VII. APENDICES

APENDICE A

Diagrama Ternario agua:fosfolípido:vitamina E

Se realizó el diagrama ternario fosfolípido:agua:vitamina E para determinar las concentraciones donde la vitamina E se mantiene estable, sin existir globulación e inestabilidad.

Se elaboraron diferentes lotes con diferentes concentraciones de fosfolípido, agua y vitamina E.

Las muestras se mantuvieron en observación durante tres meses a temperatura ambiente (25°C) y a temperatura de refrigeración (4°C).

La evaluación se realizó de manera visual buscando la separación de las fases, cambio en la coloración y por medio del microscopio óptico para observar la presencia de las vesículas o globulos de vitamina E.

Las concentraciones utilizadas fueron las siguientes:

LOTE	% DE LÍPIDO	% DE AGUA	% DE VITAMINA E
I	2.5	97.4	0.1
II	2.0	97.7	0.3
III	2.0	97.4	0.6
IV	2.5	95.0	2.5
V	2.0	94.0	4.0
VI	7.0	92.5	0.5
VII	1.0	91.0	8.0
VIII	5.0	91.0	4.0
IX	1.0	98.0	1.0

Tabla 9. Proporciones de los componentes para el diagrama de predominio.

Las zonas de cada concentración están señaladas en la figura 23 donde se representa el diagrama ternario de vitamina E:agua:fosfolípido.

Las características de cada zona se muestran en la tabla 10.

ZONA	CARACTERÍSTICAS DE LAS SUSPENSIONES LIPOSOMALES
I	Suspensión opaca ambar homogénea estable.
II	Suspensión opaca ambar homogénea.
III	Suspensión lechosa con precipitado.
IV	Suspensión opaca con precipitado ambar.
V	Suspensión lechosa con espuma en la superficie.
VI	Suspensión ambar oscuro con precipitado.
VII	Suspensión lechosa con espuma y precipitado
VIII	Suspensión con bastante espuma y presenta precipitado.
IX	Suspensión opaca lechosa con espuma.

Tabla 10. Características de las zonas de predominio del diagrama ternario.

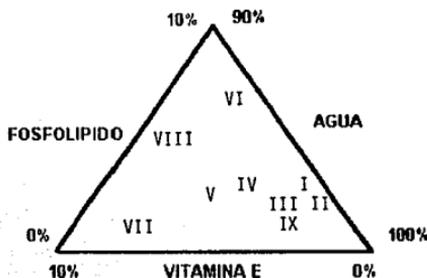


Figura 23. Diagrama Ternario Fosfolípido:agua;Vitamina E.

APENDICE B.

Validación del Tensiómetro Du NÖUY Modificado

El procedimiento de validación fué el mismo realizado por Villalobos y Albarrán (57), se utilizaron pesas de peso conocido, el tensiómetro Du Nöuy y adaptadores para colocar las pesas.

Con pesas de referencia se hicieron combinaciones y estas masas se convirtieron en dinas al multiplicarlos por la constante gravitacional (981cm/s^2).

PESAS		PESO REPORTADO (g)	
1		0.9850	
2		1.9945	
4		4.9953	
5		5.0048	

COMBINACIONES	PESOS (g)	FUERZA(dinas)
a 1	0.9850	966.29
b 2	1.9945	1956.60
c 1 y 2	2.9795	2922.39
e 4	4.9953	4900.39
f 1 y 5	5.9898	5875.99
g 2 y 5	6.9993	6866.31
h 1, 2 y 5	7.9843	7832.60

Se realizó la prueba con dos analistas y las muestras fueron evaluadas aleatoriamente.

A	B	dia 1				dia 2				Total	Y				
		e	f	g	h	a	b	c	e			f	g	h	
3	10.9	16.5	27.3	33	38.5	44.1	5.3	10.9	16.4	27.5	33	38.4	43.9	351.2	25.08
4	11	16.5	27.4	33	38.4	44.1	5.4	11.1	16.4	27.4	32.9	38.5	43.9	351.4	25.1
4	11	16.4	27.4	33.1	38.5	44.1	5.4	10.9	16.4	27.4	32.9	38.4	44	351.2	25.09
4	11	16.5	27.3	32.9	38.4	44	5.4	11	16.4	27.4	33	38.5	44	351.2	25.08
4	11	16.5	27.5	33	38.5	44.1	5.4	11	16.4	27.5	33	38.4	44	351.4	25.11
4	11	16.4	27.3	33	38.3	44	5.4	11	16.5	27.5	33	38.5	44	351.3	25.09
4	10.9	16.5	27.4	32.9	38.4	42.8	5.4	11	16.4	27.3	33.2	38.2	44	350.6	25.04
3	11	16.4	27.5	32.9	38.4	42.7	5.5	11	16.5	27.5	33.1	38.5	44	351.3	25.09
3	11	16.4	27.4	32.8	38.5	42.7	5.5	11	16.5	27.5	33.2	38.5	42.9	351	25.07
3	11	16.4	27.3	32.8	38.4	42.8	5.4	11.1	16.4	27.4	32.1	38.3	44	350.7	25.05
5	11	16.4	27.4	32.7	38.4	42.9	5.4	11	16.5	27.3	33.2	38.4	44	350.9	25.06
4	11	16.4	27.4	32.8	38.7	42.8	5.5	11	16.4	27.5	33.1	38.4	42.9	350.7	25.05
6	131.8	197.1	328.6	394.9	461	527.1	65	132	197	328.8	394.7	461	527.6	4213.2	Total
6	16.98	16.42	27.38	32.91	38.41	42.92	5.41	11	16.41	27.4	33.06	38.41	42.96	25.078	X
	28.42	T de	2105.					13.43	T de	2108.					
	28.59	X de	25.06					13.51	X de	25.09					

Tabla 11. Valores obtenidos en la validación de la balanza de torsión.

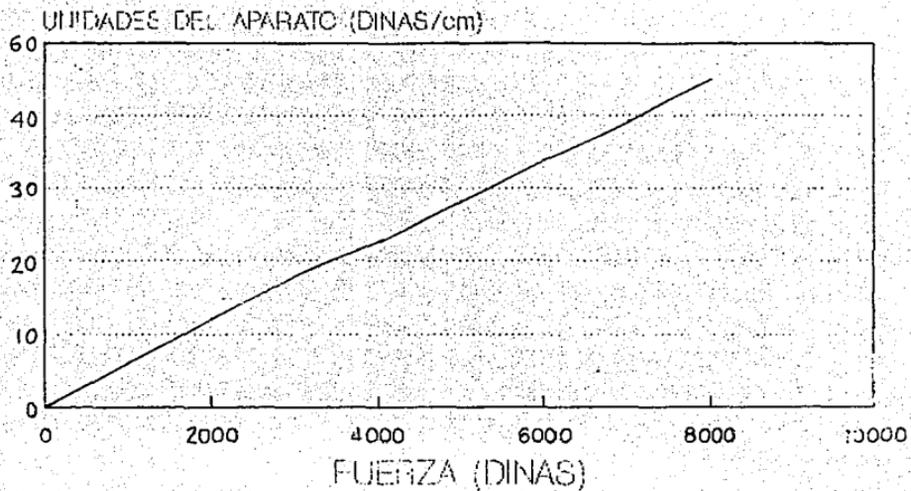


Gráfico 7. Gráfico de validación del Tensiómetro de Du Noüy.

En la Tabla 11 se muestran los valores obtenidos en la validación de la balanza de torsión.

CALIBRACION Y VALIDACION

$b = 0.075979101$	$m = 5.593229834 \exp -3$
$r = 0.999960981$	$r^2 = 0.999921965$
$\bar{y} = 25.07857143$	$y_{\sigma n} = 13.429242$
$y_{\sigma n-1} = 13.46938931$	$\bar{x} = 4470.152857$
$x_{\sigma n} = 2400.887934$	$x_{\sigma n-1} = 2408.065492$
$\Sigma y^2 = 135958.92$	$\Sigma y = 4213.2$
$\Sigma xy = 24250110.32$	$\Sigma x^2 = 4325416945$
$\Sigma x = 750985.68$	$n = 168$

ECUACION GENERAL DE UNA RECTA:

$$y = mx + b$$

$x = \text{dinas}$

$y = \text{unidades del aparato}$

$$y = 5.593229834 \exp -3 x + 0.075979101$$

Error estándar de la regresión

$$S_{y/x} = \frac{\Sigma y^2 - b \Sigma y - m \Sigma xy}{(n - 1)} = 0.119344091$$

Error estándar para la pendiente

$$SM = \frac{S_{y/x}}{\Sigma x^2 - (\Sigma x)^2/n} = 3.835079677 \exp -6$$

Error estándar para la ordenada al origen

$$SB = (S_{y/x}) \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\Sigma x^2 - (\Sigma x)^2/n}} = 9.211166047 \exp -3$$

Suma de cuadrados de la regresión

$$SCr = m(\Sigma xy) + b\Sigma y - [(\Sigma y)^2 / r.c]$$

r = réplicas por peso
c = # de pesos ensayados

$$SCr = 30295.51851$$

Suma de cuadrados del error de regresión

$$SCer = \Sigma y^2 - m \Sigma xy - b \Sigma y = 2.36434167$$

Suma de cuadrados del error puro

$$SCep = \Sigma \text{ toda } x [\Sigma y^2 - (\Sigma y)^2 / r] = 1.3$$

Suma de cuadrados de la falta de ajuste

$$SCfa = SCer - SCep = 1.06434167$$

# de mediciones realizadas	168
Error estándar de regresión	0.119344091
Coefficiente de determinación	0.999921965
Coefficiente de correlación	0.999960981
Suma de cuadrados de regresión	30295.51851
Suma de cuadrados del error de regresión	2.36434167
Suma de cuadrados del error puro	1.3
Suma de cuadrados de la falta de ajuste	1.06434167

Tabla 12. Análisis de varianza para la curva de calibración del Tensiómetro Du NOUY.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SC	MC	F
REGRESION	1	SCr 30295.51851	SCr 30295.51851	SCr/MCcr 2127042.878
ERROR DE REGRESION	n-2 166	SCer 2.36434167	SCer/gler 0.014243022	
FALTA DE AJUSTE	(n-2)-t(r-1) 131	SCfa 1.06434167	SCfa/glfa 0.008124795	MCfa/MCcr 0.218743134
ERROR PURO	t(r-1) 35	SCep 1.3	SCep/glep 1.037142857	

t = tratamientos (7), gler = grados de libertad del error puro, glfa = grados de libertad de la falta de ajuste, gler = grados de libertad del error de regresión, MC = media de cuadrados, MCcr = media de cuadrados del error de regresión, MCfa = media de cuadrados de la falta de ajuste.

Como el valor de F_{exp} para la regresión es mayor al valor de F de tablas con un grado de libertad para el numerador y 166 para el denominador y con un 99% de confianza ($F_{1,166,0.99} = 6.63$) y como además el F_{exp} para la falta de ajuste es menor al F de tablas con 131/35 grados de libertad al 95 % de confianza ($F_{131,35,0.95} = 1.51$) el modelo lineal es correcto para describir la relación entre la cantidad pesada y la lectura., tal relación la observamos en el Gráfico 7. Curva de calibración de la balanza de torsión .

A los datos de la tabla 11 se les realizó el análisis de varianza (diseño factorial $2 \times 2 \times 7$ completamente al azar) para evaluar REPRODUCIBILIDAD Y REPETIBILIDAD.

REPRODUCIBILIDAD Y REPETIBILIDAD

$$\text{Total } j\text{-ésimo día} \quad T_{.j..} = \sum_a \sum_p \sum_r X_{ijkl} = 4213.2$$

$$\text{Total } i\text{-ésimo día} \quad T_{i...} = \sum_d \sum_p \sum_r X_{ijkl} = 4213.2$$

X_{ijkl} = i -ésima observación
 i -ésimo analista
 j -ésimo día
 k -ésimo peso

Suma de cuadrados total

$$SCT = \sigma^2 n(n) = 30297.88284$$

Suma de cuadrados debido al factor analista

$$SCa = dpr \sum_{i=1}^a (\bar{X}_{i...} - \bar{X}_{....})^2 = 0.045738$$

Suma de cuadrados debido al factor día

$$SCd = apr \sum_{j=1}^d (\bar{X}_{.j...} - \bar{X}_{....})^2 = 0.053529$$

Suma de cuadrados debido a los factores

$$SCT = r \sum_a \sum_d \sum_p (\bar{X}_{ijk.} - \bar{X}....)^2 = 27319.29743$$

Suma de cuadrados del error experimental

$$SCe = SCT - SCA = 2968.585415$$

Tabla 13. Tabla condensada de ANADEVa para evaluar la reproducibilidad y repetibilidad de las mediciones del aparato.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SC	MC	Fcal
ANALISTA	a-1	SCa	SCa/gla	MCa/MCe
	1	0.045738	0.045738	0.002157027
DIA	d-1	SCd	SCd/gld	MCd/MCa
	1	0.053529	0.053529	0.0025244549
ERROR	adp(r-1) 140	SCe 2468.585415	Sce/gle 21.20418154	

El F de tablas tanto para el factor analista como para el factor día tiene un grado de libertad para el numerador y 140 grados de libertad para el denominador, con un nivel de confianza de 95%, y tiene un valor de $(F_{1,140,0.95} = 3.90)$.

Como el F anterior es mayor a los valores de F_{exp} tanto para el factor día como al factor analista se dice que hay reproducibilidad entre analistas y entre días.

LINEARIDAD

Analizar por triplicado 5 diferentes pesos

Tabla 14. Datos de linealidad.

	PESO ADICIONADO		UNIDADES DEL APARATO		
	PESO EN g	DINAS	1	2	3
a	0.9850	966.29	5.4	5.3	5.3
b	1.9945	1956.60	11.0	11.0	10.9
e	4.9953	4900.39	27.5	27.3	27.4
f	5.9898	5875.99	32.9	33.0	33.0
h	7.9843	7832.60	43.9	43.9	44.0

	PESO ADICIONADO (DINAS)	PESO DETERMINADO (DINAS)	X		
a	966.29	951.868	933.99	933.99	939.949
b	1956.60	1953.079	1953.079	1935.2	1947.119
e	4900.39	4903.074	4867.316	4885.195	4885.195
f	5875.99	5868.527	5886.406	5886.406	5880.446
h	7832.60	7835.19	7835.19	7853.069	7841.149

	CV(%)	σ_{n-1}	σ_n
a	0.89662	10.32187	8.42777
b	0.53014	10.32245	8.42825
e	0.36598	17.87898	14.59813
f	0.14332	10.32255	8.42832
h	0.107485	10.3223	8.42813

b = -26.265407	m = 1.004333887
r = 0.999988881	r ² = 0.999977763
\bar{y} = 4298.771933	y σ_n = 2537.970936
y σ_{n-1} = 2627.0495	\bar{x} = 4306.374
x σ_n = 2526.991024	x σ_{n-1} = 2615.684212
Σy^2 = 373811049.1	y = 64481.579
Σxy = 373882172.3	Σx^2 = 373958109.9
Σx = 64595.61	n = 15

b1 = pendiente experimental

β = pendiente teórica

grados de libertad = n-2 = 13

α = 0.95

$$SE^2 = \Sigma (y - \bar{y})^2 / n-2 = 9.6464825 \exp 12$$

$$\Sigma x^2 = \Sigma x^2 - (\Sigma x)^2 / n = 95785254.49$$

grados de libertad del error = 25

$$t = b_1 - \beta_2 / S_{b_1} \quad S_{b_1}^2 = SE^2 / \Sigma x^2$$

$$S_{b_1}^2 = 100709.473 \quad S_{b_1} = 317.34755$$

$$t_{\text{intercepto}} = b_1 - \beta_1 / S_{b_1} = -0.08276542$$

$$t_{\text{pendiente}} = m_1 - M_1 / S_{b_1} = 1.365659474 \text{ exp } -5$$

$$\text{Valor } t \text{ exp para la pendiente} = 1.365659474 \text{ exp } -5$$

$$\text{Valor } t \text{ exp para el intercepto} = -0.08276542$$

Valor teórico de la t de student con 13 grados de libertad y un nivel de significancia de 0.05 = 2.1604

Ya que el valor del coeficiente de correlación es muy cercano a uno y los valores de F exp son menores a los F teóricos (tablas) estadísticamente se dice que el método es lineal.

PRECISION Y EXACTITUD

Determinar 10 mediciones a un peso de (b) 1.9945g = 1956.5 dinas.

Tabla 15. Datos de precisión y exactitud.

	PESO ADICIONADO b (unidades del aparato)	PESO DETERMINADO (dinas)
1	10.9	1935.200451
2	10.9	1935.200451
3	11.0	1953.079209
4	11.0	1953.079209
5	10.9	1935.200451
6	11.0	1953.079209
7	10.9	1935.200451
8	11.0	1953.079209
9	11.0	1953.079209
10	11.0	1953.079209

$$\bar{X} = 1945.927706$$

$$\bar{X} \sigma_n = 8.758761328$$

$$\bar{X} \sigma_{n-1} = 9.232545093$$

$$\Sigma x^2 = 37867113.52$$

$$\Sigma x = 19459.27706$$

$$n = 10$$

Coefficiente de variación (CV) = 0.450107231 (%)

Prueba t de student

$$H_0 = \bar{x} = \mu$$

$$\mu = 1956.6$$

$$H_a = \bar{x} \neq \mu$$

$$t_{\text{exp}} = \bar{x} - \mu / S\bar{x} = -1.2185513$$

grados de libertad $n-1 = 9$ $\bar{x} \pm t (1-\alpha/2)S/n$
 $\alpha = 0.99$ $\alpha = 0.95$

$$\alpha = 0.95$$

$$\alpha = 0.99$$

$$t_{0.975,9} = 2.2622$$

$$t_{0.99,9} = 2.321$$

$$t_{\text{máx}} = 6.265759052$$

$$P \{ \bar{x} - t(s/n) < \mu < \bar{x} + t(s/n) \}$$

Valor experimental de t de student = -1.2185513

Como t experimental es menor al t teórico el método es exacto para esa determinación.

El coeficiente de variación es menor a uno por lo que se dice que el método es preciso.

SENSITIVIDAD

$$G = m / (Sx/y) = 0.046866416 \text{ dinas}$$

APENDICE C

LISTA DE FIGURAS

1. Estructura de la piel
2. Arreglos moleculares de los fosfolípidos en sistemas acuosos
3. Modelo molecular de membrana de Danielli y Davson (A), modelo de membrana de Robertson (B)
4. Modelo de membrana del mosaico fluido
5. Modelo de un liposoma
6. Representación esquemática de diferentes tipos de liposomas
7. Representación esquemática de la estructura de un fosfolípido
8. Estructuras químicas de fosfolípidos utilizados comúnmente en la preparación de liposomas.
9. Propiedades anfipáticas del agua
10. Diagrama esquemático de la incorporación de sustancias solubles e insolubles en agua
11. Factores biológicos en la absorción y permeación
12. Efecto potencial de los liposomas en la piel
13. Transición de fase de fosfolípidos de gel en estado líquido cristalino
14. Estructura básica del colágeno
15. Estructura básica de la vitamina E
16. Estructura química de la glicerina
17. Liposomas cargados de agua (A) recientemente preparados y (B) con dos meses de almacenamiento. Microscopio óptico 40X.
18. Liposomas cargados con glicerina (A) recientemente preparados y (B) con dos meses de almacenamiento. Microscopio óptico 40X.
19. Liposomas cargados con colágeno (A) recientemente preparados y (B) con dos meses de almacenamiento. Microscopio óptico 40X.
20. Liposomas cargados con vitamina E (A) recientemente preparados y (B) con dos meses de almacenamiento. Microscopio óptico 40 X.
21. Liposomas cargados con agua (A) recientemente preparados y (B) con dos meses de almacenamiento. Microscopio electrónico. Tinción negativa 10000X.

22. Liposomas recientemente preparados cargados con: (A) agua; (B) glicerina; (C) colágeno y (D) vitamina E. Microscopio electrónico. Tinción negativa-rojo de rutenio 10000X.
23. Diagrama ternario fosfolípido:agua:vitamina E.

LISTA DE TABLAS

1. Ejemplos de nomenclatura usados para liposomas de acuerdo al método de elaboración.
2. Temperaturas de transición de fase de algunos fosfolípidos usados en la preparación de liposomas.
3. Elongación (efecto de humectación) del estrato córneo sometido a una fuerza constante de 7137.97 dinas y tratado con liposomas cargados con agua, glicerina, colágena y vitamina E a diferentes tiempos de exposición.
4. Elongación (efecto de humectación) sobre estrato córneo a 60 minutos de aplicación de agua, liposomas cargados de agua y mezcla.
5. Elongación (efecto de humectación) sobre estrato córneo a 60 minutos de aplicación de agua, liposomas cargados de glicerina y mezcla.
6. Elongación (efecto de humectación) sobre estrato córneo a 60 minutos de aplicación de agua, liposomas cargados de colágeno y mezcla.
7. Elongación (efecto de humectación) sobre estrato córneo a 60 minutos de aplicación de agua, liposomas cargados de vitamina E y mezcla.
8. Elongación (efecto de humectación) de estrato córneo tratado con liposomas cargados con agua, glicerina, colágeno y vitamina E durante 60 minutos.
9. Proporciones de los componentes para el diagrama ternario.
10. Características de las zonas de predominio del diagrama ternario.
11. Valores obtenidos en la validación de la balanza de torsión.
12. Análisis de varianza para la curva de calibración del Tensiómetro Du NÓUY.
13. Tabla condensada de ANADEVA para evaluar la reproducibilidad y repetibilidad de las mediciones del aparato.
14. Datos de linealidad.
15. Datos de presión y exactitud.

LISTA DE GRAFICOS

1. Elongación (efecto de humectación) de estrato córneo sometido a una fuerza constante de 7137.97 dinas y tratado con liposomas cargados de agua, glicerina, colágeno y vitamina E a diferentes tiempos de exposición
2. Elongación (efecto de humectación) sobre estrato córneo a 60 minutos de aplicación de agua, liposomas cargados con agua y mezcla.
3. Elongación (efecto de humectación) sobre estrato córneo a 60 minutos de aplicación de agua, liposomas cargados de glicerina y mezcla.
4. Elongación (efecto de humectación) sobre estrato córneo a 60 minutos de aplicación de agua, liposomas cargados de colágeno y mezcla.
5. Elongación (efecto de humectación) sobre estrato córneo a 60 minutos de aplicación de agua, liposomas cargados de vitamina E y mezcla.
6. Elongación (efecto de humectación) de estrato córneo tratado con liposomas cargados de agua, glicerina, colágena y vitamina E durante 60 minutos.
7. Gráfico de validación del Tensiómetro Du NÓUY.

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. ABRAHAM, W. et al. *Interaction between corneocytes and stratum corneum lipid liposomes in vitro*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1021. 119-125. (1990).
2. ALMONG, S. et al. *Kinetic and structural aspects of reconstitution of phosphatidylcholine vesicles by dilution of phosphatidylcholine-sodium cholate mixed micelles*. *Biochemistry*. 25(9). 2597-2605. (1986).
3. AUSBORN, M. et al. *Stabilization of liposomes by freeze-thaw and lyophilization techniques problems and opportunities*. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 38(4). 133-139. (1992).
4. BOWSER, P.A. *Location and nature of the epidermal permeability barrier*. *Int. J. of Cosmetic Science*. 8. 125-134. (1986).
5. BRONAUGH, R.L. *In vitro methods for measuring skin permeation*. *Cosmetics and Toiletries*. 105. 86-93. Noviembre (1990).
6. BROOKS, G. et al. *Skin lipids*. *Int. J. of Cosmetic Science*. 13. 103-113. (1991).
7. BROOKS, G. *Collagen and its applications*. Croda, Inc. New York.
8. BURI, P. / PUISIEUX, F. Forms pharmaceutiques nouvelles Editorial Lavoisier Tec. and Doc. Francia, 1985. Capitulo XII.
9. Congreso de Cosmetología V. Congreso de Química Cosmética. Querétaro, Querétaro. México. Mayo de 1992.
10. COPENHAVER, W. M. Tratado de histología. 17a edición. Editorial Interamericana. México, 1981. pp. 412-418.
11. CROMMELIN, A. *Influence of lipid composition and ionic strength on the physical stability of liposomes*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 93(11). 1559-1562. Noviembre (1984).
12. CROMMELIN, J. A. et al. *Liposomes as carriers for drugs and antigens: approaches to preserve their long term stability*. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 20(4). 547-556. (1994).
13. CROWDHARY, R.K. et al. *Dye-sensitized destabilization of liposomes bearing photooxidizable lipid head groups*. *Photochemistry and Photobiology*. 58(3). 362-366. (1993).
14. DEASY, P.B. Drugs and the pharmaceutical sciences. Volumen 20. Microencapsulation and related drug processes. Editorial Marcel Dekker. Inc. USA. 1984. pp. 274-277.

15. DONALD, T.D. *Lipids, their role in epidermal structure and function*. Cosmetics and Toiletries. 106. 63-69. Diciembre. (1991).
16. DONG, C. et al. *Acacia-gelatin microencapsulated liposomes preparation, stability and release of acetylsalicylic acid*. Pharmaceutical Research. 10 (1). 141-146. (1993).
17. EGBARIA, K. et al. *Topical application of liposomal preparations*. Cosmetics and Toiletries. 105. 85-93. (1990).
18. FRESTA, M. et al. *Entrapment of fluoroquilonen in liposomes and effects on chemotherapeutic activity against different bacterial strains*.
19. WILKINSON, J.B./ MOORE, R.J. Cosmetología de Harry Editorial Díaz de Santos, S.A: Madrid. 1990.
20. HAWLEY, G.G. Diccionario de química y productos químicos. Ediciones Omega. España. 1988.
21. HAYWARD, J. et al. *Potential of liposomes in cosmetic science*. Cosmetics and Toiletries. 105. 47-54. (1990).
22. GHOSH, M.K. HPLC: Methods an drug analysis. Speinger-Verlog. USA. 1992.
23. GOLBACH, P. et al *Sterilization of carboxyfluorescein containig liposomes by filtration*. Laboratoire of Pharmacotechnie.
24. GRIT, M. *Chemical stability of liposomes implications for their physical stability*. Chemistry and Physics of Lipids. 64. 3-18. (1993).
25. JACKSON, J.V. Clarke's isolation and identification of drugs. 2a. edición. Editorial The Pharmaceutical Press. Londrés, Inglaterra. 1986.
26. JUNGINGER, H.E. et al. *Liposomes and niosomes: interactions with human skin*. Cosmetics and Toiletries. 106. 45-50. (1991).
27. KIRK-OTHEMER. Encyclopedia of Chemical Technology. Volumen 2,9,24. 3a. edición. Editorial Jonh Wiley and Sons. USA. 1987.
28. KOMPAURE, F. et al. *In vitro evaluation in man by two noninvasive methods of stratum corneum barrier function after physical and chemical modifications*. International Journal of Cosmetic Science. 13. 293-302. (1991).
29. LASIC, D.D. *Les liposomes*. La Recherche. 20(212). 904-913. (1989).
30. LAUTENSCHLAGER, H. *Liposomes in dermatological preparations. part I*. Cosmetics and Toiletries. 105. 89-96. Mayo (1990).
31. LAUTENSCHLAGER, H. *Liposomes in dermatological preparations. part II*. Cosmetics and Toiletries. 105. 63-72. Julio. (1990).
32. LEHNINGER. Bioquímica. Ediciones Omega. España. 1981. pp. 309-310.
33. Liposomes: a practical approach. Editado por RRC. New I.R.L. Press. Inglaterra. 1990. Capítulo I.

34. LIU, F. et al. *Pulmonary delivery of free and liposomal insulin*. *Pharmaceutical Research*. 10(2). 228-232. (1993).
35. MULLER, A. *Delivering the ingredient to the intended site*. D. and C. I. 38-42. Septiembre. (1988).
36. New products reporter. Número 1. México. Editorial The Sydney Ross. Co. S.A. 1974. *Ciclo de estabilidad*.
37. NUSIMOVICH, A.D. et al. *Complex liposomes*. DCI. 79. 37-42. Septiembre. (1989).
38. OZER, Y. et al. *Temperature and pH-sensitive liposomes*. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 39(3). 97-101. (1993).
39. PARNHAM, M.J./ WETZIG, H. *Toxicity screening of liposomes*. *Chemistry and Physics of lipids*. 64. 263-274. (1993).
40. PURMANN. et al. *Preparation of SUV-liposomes by High-Pressure homogenization*. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 39(2). 45-52. (1993).
41. RIBOSA, M.T. et al. *Physico-chemical modifications of liposomes structures through interaction with surfactants*. *International Journal of Cosmetic Science*. 14. 131-149. (1992).
42. RIEGER, M.M. *Skin lipids and their importance to cosmetic science*. *Cosmetics and Toiletries*. 102. 36-49. Julio. (1987).
43. RIVIERE, E. *Biological factors in absorption and permeation*. *Cosmetics and Toiletries*. 105. 85-93. Octubre. (1990).
44. ROCHERFORT, A. *A new technique for the evaluation of cosmetics effect on mechanical properties of stratum corneum and epidermis in vitro*. *International Journal of Cosmetic Science*. 8. 27-36. (1986).
45. SON, K. *Liposomes prepared dynamically by interactions between bile salt and phospholipid molecules*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 981. 288-294. (1989).
46. SUZUKI, K. *The application of liposomes to cosmetics*. *Cosmetics and Toiletries*. 105. 65-78. Mayo (1990).
47. SVEINSSON, S.J. *In vitro oral mucosal absorption of liposomal triamcinolone acetamide*. *Pharmaceutical Research*. 9(10). 1359-1361. (1992).
48. TALSMA, H. et al. *Liposomes as drug delivery systems, part I: preparation*. *Pharmaceutical Technology*. 97-106. Octubre (1992).
49. TALSMA, H. et al. *Liposomes as drug delivery systems, part II: characterization*. *Pharmaceutical Technology*. 52-58. Noviembre. (1992).
50. TALSMA, H. et al. *Liposomes as drug delivery systems, part III: stabilization*. *Pharmaceutical Technology*. 48-59. Enero. (1993).

51. TOMIZAWA, H. *Uptake of phosphatidylserine liposomes by rat Peyer's Patches following intraluminal administration*. *Pharmaceutical Research*. 10(4). 549-552. (1993).
52. TOPOREK, M. *Bioquímica*, 3a. edición. Editorial Interamericana, México. 1984. pp. 221.
53. TORTORA, G.J. *Principios de anatomía y fisiología*. Editorial Harla. México. 1977. pp. 81-83.
54. USP XXI.NF XVI, 1985. United States Pharmacopeial Convention. Inc. Rockville, M.D. USA.
55. VEMURI, S. et al. *Effect of sugars on freeze-thaw and lyophilization of liposomes*. *Drug development and industrial pharmacy*. 17(3). 327-348. (1991),
56. VEMURI, S. et al *Drug release rate method for a liposome preparation*. *Drug development and industrial pharmacy*. 17(2). 183-192. (1991).
57. VILLALOBOS, G.R./ LOPEZ, A.J."Desarrollo de un nuevo método para medir bioadhesión de polímeros, influencia del tamaño de partícula y tiempo de humectación sobre la fuerza de adhesión". UNAM. FESC. Cuautitlán Izcalli. México. Enero. 1992.
58. YARDLEY, H.J. et al *Epidermal lipids*. *International Journal of Cosmetic Science*. 9. 13-19. (1987).
59. WARD, A.J. et al. *Modeling the permeability properties of skin*. *Cosmetics and Toiletries*. 105. 53-59. Octubre. (1990).
60. WEINER, N. *Liposomes as a drug delivery system*. *Drug development and industrial pharmacy*. 15(10). 1523-1554. (1989).
61. WEINER, A.L. *Liposome-collagen gel matrix, a novel sustained drug delivery system*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 74(9). 922-925. Septiembre. (1985).
62. *Journal of Chromatography. Biomedical Application*. 308. 11-119. (1984).
63. De LEENHEER, et al. *Determination of serum tocopherol (Vitamin E) by HPLC*. *Clin. Chem*. 24(4), 585-590 (1978).
64. DOANE, F. W. / ANDERSON, N. Electron Microscopy in Diagnostic Virology. A practical guide and atlas. 1a. edición. Editorial Cambridge University Press. 1987. pp.34-36.