



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

"INFLUENCIA DEL PESO MOLECULAR Y LA SOLUBILIDAD
EN LA EFICIENCIA DE ATRAPAMIENTO DE TRES PRINCIPIOS
ACTIVOS HIDROSOLUBLES EN VESICULAS LIPIDICAS
ULTRAFLEXIBLES (TRANSFERSOMAS)"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

ERIKA MAGALI GAMBOA ALVAREZ

ASESORES: DRA. ADRIANA GANEM RONDERO
DR. ENRIQUE ANGELES ANGUIANO



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Erika Magali

Gamba Alvarez

FECHA: 10- Noviembre - 2005

FIRMA: 



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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

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

Influencia del peso molecular y la solubilidad en la eficiencia
de atrapamiento de tres principios activos hidrosolubles en
vesículas lipídicas ultraflexibles (Transfersomas)

que presenta la pasante: Erika Nagali Gamboa Alvarez
con número de cuenta: 09617041-8 para obtener el título de :
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 30 de Agosto de 2005

- | | |
|------------------|--|
| PRESIDENTE | <u>DESS. Rodolfo Cruz Rodríguez</u> |
| VOCAL | <u>OC. Marina L. Morales Galicia</u> |
| SECRETARIO | <u>Dra. Adriana Ganem Gondero</u> |
| PRIMER SUPLENTE | <u>OPR. Guadalupe Rebollar Barrera</u> |
| SEGUNDO SUPLENTE | <u>OPR. Roberto Díez Torres</u> |

Dedicado a la memoria de dos grandes hombres, a quienes nunca dejaré de admirar y querer, porque siempre estarán en mi corazón:

Victor Manuel Gamboa Sánchez (PAPI).

No tengo palabras para agradecerte TODO lo que me enseñaste, tu tiempo, tu amor y tus consejos; porque tu ausencia física nunca te ha impedido acompañarme cuando más te necesito. Gracias por ser EL MEJOR PADRE DEL MUNDO.

Q.F.B. Carlos Gamboa Sánchez (TÍO).

Te agradezco infinitamente que me hayas dejado conocer un poco de lo maravilloso que siempre fuiste. Gracias por preocuparte por mí y por el gran detalle de despedirme.

Would you know my name if I saw you in heaven?

Would it be the same if I saw you in heaven?

Would you take my hand if I saw you in heaven?

Would you help me stand if I saw you in heaven?

Would you feel the same if I saw you in heaven?

I must be strong and carry on

'Cause I know I don't belong, here in heaven

AGRADECIMIENTOS

Al T. Rodolfo Robles (laboratorio de microscopía electrónica) y al T. Draucin Jiménez (taller soplado de vidrio) por su valioso apoyo para la realización de este trabajo.

Al Prof. Juan R. Garibay por la asesoría brindada para realizar el análisis estadístico de datos.

Al Q.F.B Victor H. Ábrego por todo el apoyo para poder concluir este trabajo, por compartir tu conocimiento y experiencia en Electroforesis Capilar. Gracias por el tiempo, la paciencia y la amistad.

DEDICATORIAS

A la UNAM, por abrirme sus puertas, por brindarme la oportunidad de recibir la mejor formación académica y por haber sido mi segunda casa.

A mis asesores:

Dra. Adriana Ganem R. por la oportunidad de formar parte de su equipo, por la confianza que depositó en mí y por compartir conmigo un poquito de su gran conocimiento.

Dr. Enrique Ángeles A. por el apoyo otorgado para realizar este proyecto, por su tiempo y su valiosa asesoría.

Al DESS Rodolfo Cruz porque sus enseñanzas han hecho crecer cada vez más el amor que tengo por mi profesión. Gracias por su apoyo, por ser un gran profesor y amigo.

A mis abuelitos: Teresa Sánchez, Sixto Gamboa, Julia Ochoa, Lizardo Álvarez y José Nava, por el GRAN ejemplo de fortaleza, trabajo y amor, pero sobre todo, por regalarme a los mejores padres del mundo.

A mi mamá Jose: por amarme mucho antes de nacer, por enseñarme a trabajar muy fuerte para lograr mis metas. Por tu esfuerzo, por echarme porras, por crecer conmigo y entenderme a pesar de todo.

A mi hermanito: Ing. Victor Gamboa, por ser ahora quien me consiente, por el apoyo y las risas, por ayudarme a aguantar los golpes duros de la vida. A Marce, Israel y Berenice por ser mis verdaderos hermanos. A mis niños, Uri Maruri, María José, Carlitos, Sergio y Laura, esto sólo pretende ser un pequeño ejemplo de que cuando se quiere, se puede; siempre los voy a apoyar para que alcancen sus sueños.

A mi tíos Roberto Gamboa y Lourdes Sánchez por quererme y cuidarme mucho, por lo mucho que los admiro. A mis tíos Lizardo Álvarez, Carmen Nava y Gloria Nava, por el amor, apoyo y consejos que me brindan.

A mis compañeros de generación, mi segunda familia: César, Adriana, Gemma, Vladimir, Agustín, Norma, Ruth, Chucho, Abraham, Olga, Liliana, Yesenia, Claudia M, Kenia, Chío, Manolo, Charly, Lisbeth, Ezequiel, Israel, Ángel, por compartir conmigo los buenos, los malos y los peores momentos, por la confianza y por hacerme sonreír siempre.

Al grupo de choque: Roberto Díaz, Mónica, Alberto, Marlene, Briza, Luis, David, Miguel, Lupita por todos los momentos agradables, las risas, los consejos y el apoyo.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| Índice de figuras | 1 |
| Índice de tablas | 3 |
| I. Introducción | 5 |
| II. Objetivos | 9 |
| III. Marco teórico | 10 |
| 3.1. Piel (Generalidades) | 10 |
| 3.2. Transfersomas | 11 |
| 3.3. Electroforesis Capilar | 17 |
| 3.3.1. Principios de la separación electroforética | 20 |
| 3.3.1.1. Movilidad Electroforética | 20 |
| 3.3.1.2. Flujo Electroosmótico | 21 |
| 3.3.1.3. Movilidad aparente y tiempo de migración | 24 |
| 3.3.2. Modos de separación | 25 |
| 3.3.3. Electroforesis Capilar de Zona | 26 |
| 3.4. Espectrofotometría UV-Visible | 27 |
| 3.4.1. Propiedades de la luz | 27 |
| 3.4.2. Absorción de luz | 28 |
| 3.4.3. El espectrofotómetro | 31 |
| 3.4.4. La ley de Beer en análisis químico | 32 |
| 3.4.5. Desviaciones a la ley de Beer | 32 |
| 3.5. Propiedades Químicas de los principios activos a estudiar | 33 |
| 3.5.1. Glicina | 33 |
| 3.5.2. Fenilalanina | 33 |
| 3.5.3. Triglicina | 33 |

| | |
|--------------------------|----|
| IV. Parte Experimental | |
| 4.1. Reactivos y Equipos | 35 |
| 4.2. Metodología | 36 |
| V. Resultados | 45 |
| VI. Discusión | 62 |
| VII. Conclusiones | 74 |
| VIII. Anexo | 75 |
| IX. Referencias | 78 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------------------|--|
| A | Absorbancia |
| °C | Grados Centígrados |
| CLAR | Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución |
| cm ² | Centímetros cuadrados |
| Da | Daltons |
| EC | Electroforesis Capilar |
| FEO | Flujo Electroosmótico |
| G.R | Grado Reactivo |
| h | Horas |
| HSD | Siglas en inglés de la prueba estadística de Tukey de comparaciones múltiples, para determinar diferencias verdaderamente significativas (highly significant difference). |
| kV | kiloVolt |
| K _{o/w} | Coefficiente de partición octanol-agua |
| L _{eff} | Longitud efectiva |
| L _{total} | Longitud total |
| µg | Microgramos |
| mA | MiliAmpere |
| mg | Miligramos |
| min | Minutos |
| µl | Microlitros |
| ml | Mililitros |
| µm | Micrómetros |
| µM | Micromolar |
| M | Molar |
| nm | Nanómetros |

| | |
|----------------|----------------------------------|
| PC | Fosfatidilcolina |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| r _v | Radio de la vesícula |
| s | Segundos |
| SI | Sistema Internacional de Medidas |
| v/v | Concentración volumen-volumen |
| p/v | Concentración peso-volumen |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| 1. Representación de la bicapa lipídica radiomarcada de un Transfersoma | 6 |
| 2. Representación de la piel | 10 |
| 3. Proceso de Separación Electroforética | 17 |
| 4. Componentes básicos del equipo de Electroforesis Capilar | 19 |
| 5. Espectro electromagnético | 29 |
| 6. Gráfico de Tiempo de Sonicación vs. Agente Tensoactivo | 48 |
| 7. Gráfico de Tiempo de Sonicación vs. Tipo de membrana | 49 |
| 8. Gráfico de Tiempo de Sonicación vs. Número de Filtraciones | 50 |
| 9. Gráfico de Agente tensoactivo vs. Tipo de membrana | 51 |
| 10. Tamaño de partícula de las vesículas cargadas con los principios activos | 55 |
| 11. Representación de un Transfersoma acercándose y pasando a través de un poro | 62 |
| 12. Transfersomas visualizados por microscopía de Transmisión electrónica | 65 |
| 13. Tamaño de partícula de las vesículas lipídicas con respecto al peso molecular de los principios activos empleados | 68 |
| 14. Porcentaje de activo encapsulado en las vesículas con respecto a su peso molecular | 69 |
| 15. Representación de una vesícula lipídica de tres bicapas | 71 |

| | |
|---|----|
| 16. Tamaño de partícula de las vesículas con respecto a la solubilidad de los principios activos estudiados | 72 |
| 17. Porcentaje de activo encapsulado con respecto a su solubilidad en agua | 73 |
| 18. Curva de Calibración de Glicina en Propanol al 50% | 75 |
| 19. Curva de Calibración de Fenilalanina en Propanol al 50% | 76 |
| 20. Curva de Calibración de Triglicina en Propanol al 50% | 77 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| 1. Colores de la luz visible | 31 |
| 2. Propiedades fisicoquímicas de los tres principios activos estudiados | 34 |
| 3. Tamaño de Partícula de las vesículas vacías variando el tiempo de sonicación, agente tensoactivo, tipo de membrana y número de filtraciones | 45 |
| 4. Análisis de Varianza para el experimento $5 \times 2 \times 2 \times 3$ | 46 |
| 5. Comparación de tamaño de partícula para las vesículas preparadas con dos tipos de tensoactivos: Colato de Sodio y Tween 80 | 47 |
| 6. Comparación de tamaño de partícula para las vesículas filtradas a través de dos tipos de membrana: Policarbonato y Ésteres mixtos de celulosa | 49 |
| 7. Prueba de Tukey de comparación múltiple para los diferentes tiempos de sonicación | 52 |
| 8. Prueba de Tukey de comparación entre pares individuales de medias (tiempo de sonicación) | 53 |
| 9. Prueba de Tukey de comparación múltiple para diferente número de filtraciones | 53 |
| 10. Prueba de Tukey de comparación entre pares individuales de medias (número de filtraciones) | 54 |
| 11. Tamaño de partícula promedio de las vesículas cargadas con los activos | 55 |
| 12. Análisis de varianza para el tamaño de partícula de las vesículas cargadas | 56 |
| 13. Prueba de Tukey para comparar las medias de tamaño de partícula | 56 |
| 14. Análisis de varianza para la eficiencia de atrapamiento de los activos | 60 |

| | |
|--|----|
| 15. Prueba de Tukey para comparar las medias de eficiencia de atrapamiento | 61 |
| 16. Características de los Transfersomas con los principios activos encapsulados | 67 |
| 17. Curva de Calibración de Glicina en propanol al 50% | 75 |
| 18. Curva de Calibración de Fenilalanina en propanol al 50% | 76 |
| 19. Curva de Calibración de Triglicina en propanol al 50% | 77 |

I. INTRODUCCIÓN

La piel es el órgano más grande del cuerpo, realiza funciones protectoras, homeostáticas, sensoriales e inmunológicas. Dadas sus dimensiones, es uno de los mejores sitios para la liberación no invasiva de agentes terapéuticos en el organismo [1, 2]. La ruta transdérmica utiliza a dicho órgano como puerta de entrada para cumplir con este objetivo.

Los sistemas terapéuticos que emplean esta ruta evitan los problemas ocasionados por el metabolismo del "primer paso" hepático y disminuyen la toxicidad sistémica; pueden emplearse para el tratamiento de tejidos locales que se encuentran inmediatamente por debajo del sitio de aplicación en la piel (músculos y articulaciones, por ejemplo), o con el fin de llegar a circulación sistémica. Esto último representa un gran reto debido a que los activos tienen que cruzar muchas barreras para lograr su permeación y absorción [1, 2, 3, 4, 5].

El estrato córneo proporciona la mayor protección contra los agentes externos, únicamente moléculas muy pequeñas pueden atravesarlo, haciéndolo a velocidades muy bajas ($0.4 \text{ mg h}^{-1} \text{ cm}^2$ para el agua). Esta región contiene de 15 a 20 capas de células muertas queratinizadas (corneocitos), que se acomodan formando una estructura similar a la de una pared: los corneocitos están separados por intersticios estrechos, rellenos con lípidos en estado cristalino que son impermeables (excepto para los compuestos de bajo peso molecular). Esta arquitectura de "ladrillo y mezcla" previene la permeación transdérmica de los fármacos, por lo que la mayoría de las moléculas administradas en forma epicutánea permanecen en la superficie de la piel a menos que sean transportadas a través de ella por algún acarreador u organismo invasor [6].

En respuesta al interés que despertó la posibilidad de emplear vesículas lipídicas para promover la liberación no invasiva de fármacos a través de la piel, Gregor Cevc y Gabriele Blume [7] diseñaron los **Transfersomas**, una clase especial de acarreadores de este tipo.

Estas vesículas están formadas por compuestos naturales y anfipáticos suspendidos en una solución acuosa (figura 1). Al igual que los liposomas, contienen una bicapa lipídica que rodea a un núcleo acuoso [7]. Debido a la incorporación de un agente activo de superficie en su membrana, los Transfersomas son altamente flexibles, propiedad que les facilita una rápida penetración a través de los espacios lipídicos intercelulares del estrato córneo (cuyo tamaño es apreciablemente menor al de las vesículas) [5, 8, 9, 10, 11, 12].

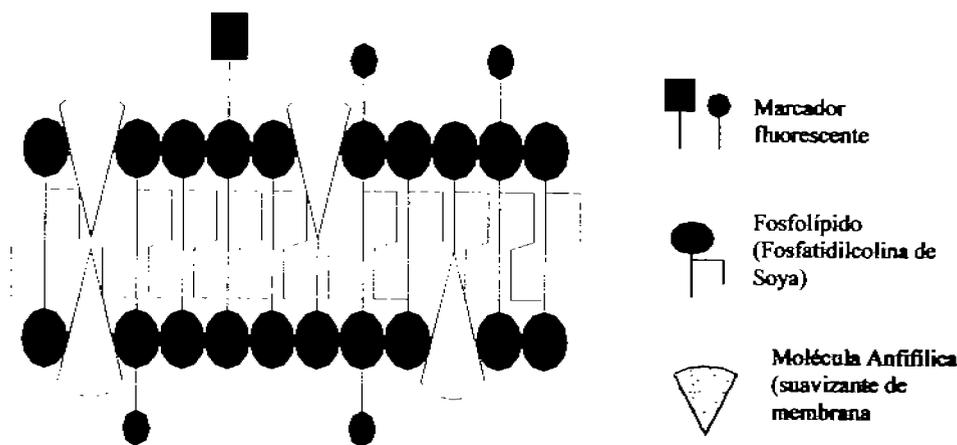


FIGURA 1.
Representación de la bicapa lipídica de un Transfersoma marcada con dos diferentes colorantes lipofílicos fluorescentes (rodamina y fluoresceína) [13].

Lo anterior se refleja en el flujo característico de las suspensiones Transfersómicas a través de barreras cuyos poros son considerablemente más estrechos. Al incrementar la fuerza, incrementa la velocidad de transporte de una

suspensión Transfersómica, hasta que se alcanza un flujo máximo (muy similar al del líquido suspensor). En contraste, la velocidad de transporte para una suspensión liposómica es baja en rangos de fuerza muy amplios, hasta que el tamaño de las vesículas se acerca al tamaño de poro [7].

Según los estudios realizados por G. Cevc et. al., los Transfersomas cumplen con todos los requerimientos para penetrar eficientemente las barreras de permeabilidad, incluyendo la piel intacta de los mamíferos, con una eficacia cercana al 100 % y una eficiencia de liberación mayor al 50 %; dichos autores sugieren que esto depende de la diferencia de presión osmótica transdérmica [6, 14].

Además, el paso de los Transfersomas a través de la piel es función de su flexibilidad, hidrofilia y capacidad de conservar su integridad mientras experimentan cambios drásticos de forma; dichas propiedades contribuyen también a evitar la agregación y fusión de las vesículas [7].

Para convertir un liposoma en Transfersoma se debe incorporar un agente activo de superficie. Otra diferencia entre los liposomas y los Transfersomas es la gran hidrofilia de éstos últimos, lo cual le permite a su membrana hincharse más que las membranas convencionales [5,15].

Actualmente, se ha logrado exitosamente la liberación local y sistémica de diversos esteroides, proteínas y macromoléculas hidrofílicas (estradiol, diclofenaco e insulina, por ejemplo) a través de sistemas Transfersómicos. Lee et. al. [16] encontraron que al aplicar vesículas Transfersómicas en piel se logra la liberación transdérmica de material genético, por lo que pueden ser usados potencialmente para la liberación no invasiva de DNA plásmido hacia varios órganos del cuerpo.

Por esto y en base a sus propiedades, se considera a los Transfersomas como un tipo innovador y versátil de vesículas lipídicas que prometen ser una herramienta útil para lograr la absorción eficiente de los fármacos tras su aplicación en piel, venciendo (de forma no invasiva) el obstáculo que ésta representa [6, 8, 10, 11, 16, 17].

La mayoría de los estudios realizados para determinar la eficiencia de atrapamiento de los fármacos en este tipo de vesículas están basados en el empleo de moléculas lipofílicas o macromoléculas hidrofílicas. En el presente trabajo de investigación se pretende encapsular tres principios activos hidrofílicos de bajo peso molecular: glicina, fenilalanina y triglicina, como modelo para determinar la influencia del peso molecular en la eficiencia de atrapamiento.

OBJETIVO GENERAL

- ⊗ Encapsular tres principios activos de diferente peso molecular y solubilidad en vesículas Transfersómicas a través del método de hidratación de la película lipídica para determinar la influencia de estas dos variables en la eficiencia de encapsulamiento de los activos en dichas vesículas.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ⊗ Estandarizar la técnica de preparación de Transfersomas variando tiempo de sonicación, tipo de agente tensoactivo, número de filtraciones así como el tipo de membrana a emplear.
- ⊗ Caracterizar los sistemas preparados midiendo su tamaño de partícula mediante la técnica de dispersión dinámica de luz y observando su morfología por microscopía de transmisión electrónica con tinción negativa.
- ⊗ Encapsular en las vesículas Transfersómicas tres principios activos hidrosolubles modelo (glicina, fenilalanina y triglicina) con diferente peso molecular y diferente solubilidad, empleando la técnica estandarizada de preparación.
- ⊗ Determinar la influencia del peso molecular y la solubilidad en la eficiencia de atrapamiento en las vesículas lipídicas, cuantificando los principios activos por Electroforesis Capilar y Espectrofotometría Visible.

III. MARCO TEÓRICO

3.1 PIEL (Generalidades)

La epidermis, zona externa de la piel, tiene un grosor que puede variar de 0.04 a 0.2 mm. Está integrada por capas de células epiteliales escamosas estratificadas. En la siguiente región de la piel, la dermis (10 a 20 veces más gruesa que la epidermis), se alojan capilares sanguíneos, ciertas glándulas, células inmunológicamente activas, terminaciones nerviosas, etc. El grosor total de la piel es de entre 0.5 y 2 mm. La figura 2 ilustra esquemáticamente la estructura de la piel [18].

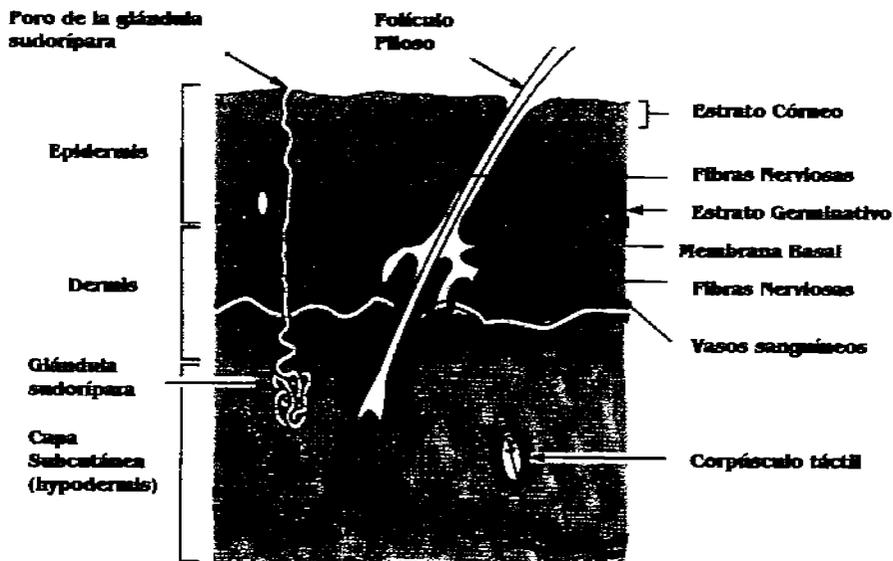


FIGURA 2.

Representación de la piel. La epidermis es la capa externa delgada de la piel integrada por el estrato escamoso, estrato germinativo y estrato basal. La dermis es la capa media de la piel; contiene terminaciones nerviosas, vasos sanguíneos, pequeños vasos linfáticos, folículos pilosos, glándulas sudoríparas, etc. En esta capa se encuentran los receptores del dolor y del tacto. La capa subcutánea es la capa más profunda de la piel; está compuesta por una red de células de colágeno y grasa, que ayuda a conservar el calor corporal y protege el cuerpo contra lesiones [18]

La epidermis es resistente a los ácidos y representa la primer barrera mecánica entre el interior y exterior de la piel. Previene la pérdida de agua y fluidos corporales, evita la captación de agentes nocivos desde el medio ambiente y obstaculiza la penetración de fármacos aplicados en la superficie de la piel.

Para alcanzar regiones más profundas en la piel o tener efecto sistémico, los principios activos aplicados por vía dérmica pueden ser transportados a través de los corneocitos (localizados en el estrato córneo). Alternativamente, pueden difundir a través de los intersticios que existen entre los corneocitos. Dichos intersticios son como laberintos estrechos, cuya amplitud es de aproximadamente 0.1 μm y están llenos de lípidos en estado cristalino y de redes biopoliméricas.

Esta arquitectura es la que dificulta la penetración de la mayoría de los principios activos en la piel intacta, de tal forma que la pequeña cantidad que logra penetrar es insuficiente para lograr una terapia exitosa. Las capas más profundas de la piel normalmente no representan un obstáculo para la permeación.

3.2 TRANSFERSOMAS

Son vesículas lipídicas complejas optimizadas, cuya membrana es autorregulable, extremadamente flexible y deformable. Se ha demostrado que estos acarreadores lipídicos penetran en la piel sin comprometer sus propiedades protectoras. Atraviesan espontáneamente las barreras impuestas por el estrato córneo, transportando materiales desde el sitio de aplicación hasta un determinado sitio blanco. Son vesículas especialmente diseñadas que pueden responder al estrés externo mediante una rápida deformación, con un bajo costo energético [2, 5, 7].

Para explicar la penetración de los Transfersomas a través de la piel es necesario conocer los gradientes que existen a través de las capas externas, los cuales pueden generar fuerzas conductoras que permitan el flujo de lípidos en y a través de la superficie de la piel intacta, siempre que se apliquen en forma de vesículas especiales. Después de la aplicación dérmica de cualquier fármaco o acarreador lipídico se crea un gradiente de concentración entre el sitio de aplicación y el interior de la piel.

La magnitud de dicho gradiente en términos molares disminuye al aumentar el peso molecular de la sustancia aplicada. Esto significa que el valor del gradiente después de una aplicación estará limitado por la mínima concentración requerida para lograr el efecto terapéutico y la máxima concentración de fármaco que se pueda obtener en la formulación o solución aplicada.

Las moléculas de masa pequeña (≤ 1000 Da) requieren ser aplicadas con una densidad superficial de 1mmol/cm^2 para generar, apenas, un flujo transdérmico picomolar (10^{-12} mol/l) por hora y unidad de área. En el caso de los lípidos, es difícil aplicar dicha densidad superficial. Además, obtener concentraciones lipídicas mayores a 0.3 mol/l es muy difícil debido a lo problemático que resulta preparar suspensiones lipídicas muy concentradas que sean estables y homogéneas. Los agregados lipídicos tienen masas moleculares del orden de megadaltons, por lo que la concentración de los mismos que se logrará aplicar en la superficie de la piel será menor comparada con la que se lograría con los fármacos o lípidos libres. En este caso, se espera que la permeación debida al gradiente de concentración de las vesículas sea del orden de femtomoles (10^{-15} moles) tan pequeña que prácticamente se considera despreciable.

Por lo mencionado anteriormente los gradientes transdérmicos de concentración lipídica no pueden explicar la penetración de las vesículas lipídicas a través de la piel intacta [15].

Existe otro gradiente transdérmico que se encuentra presente virtualmente bajo cualquier condición: el gradiente osmótico creado por la diferencia en la concentración total de agua entre la superficie y el interior de la piel.

La superficie de la piel contiene normalmente menos del 15% de agua (5 veces menos que las capas basales de la piel). El gradiente transdérmico de concentración de agua se extiende únicamente por las regiones externas de la piel (epidermis) y es lo suficientemente fuerte para transportar al menos 0.5 mg de lípidos por hora y por cm^2 a través del estrato córneo [9, 13, 15].

La diferencia de presión entre la superficie y el interior de la piel, provocada por el gradiente osmótico, puede crear una fuerza del orden de 10^{-11} N por vesícula con un radio de $r_v = 60$ nm, o bien de 10^{12} N por mol de vesículas, la cual es suficiente para transportar un gran número de vesículas lipídicas a través del estrato córneo intacto. Para que dicha fuerza sea capaz de transportar a las vesículas lipídicas más allá del estrato córneo es necesario que el tamaño y número de los acarreadores sean suficientemente grandes para atravesar la superficie de la piel y las capas profundas de la misma.

Los gradientes químicos creados después de la aplicación tópica de alguna sustancia, entonces, no bastan para crear una fuerza impulsora lo suficientemente grande para transportar macromoléculas a través de la barrera de la piel. La insignificancia de dichos gradientes se justifica mediante las siguientes consideraciones:

- ❖ Si el gradiente transdérmico de fármaco o de acarreador (Δc) fuera importante se esperaría que el flujo de cualquiera de estos materiales en la piel (j) fuera proporcional a la masa total aplicada, puesto que $j \propto \Delta c$. Cevc et al, en su estudio encontraron que una vez que inicia la penetración lipídica en la piel, su velocidad depende sólo un poco de la concentración inicial en la superficie ya que se obtienen velocidades de penetración similares para Transfersomas con dos diferentes concentraciones lipídicas.
- ❖ La eliminación del gradiente transdérmico de hidratación afecta en gran medida el transporte lipídico a través de la piel. De hecho, la aplicación de vesículas lipídicas en forma oclusiva les evita por completo penetrar en la piel.
- ❖ Por el contrario, las vesículas lipídicas aplicadas en forma no-oclusiva penetran en y a través de las capas externas de la piel. Dependiendo de la composición de las vesículas y de la dosis aplicada se pueden encontrar en capas profundas de la piel o hasta el compartimiento sanguíneo.

Esto confirma la conclusión de que la capacidad lipídica para penetrar la piel en forma espontánea resulta principalmente de los gradientes de hidratación y de la alta energía de hidratación lipídica [15].

De acuerdo a lo anterior, el mecanismo de penetración de la piel por los Transfersomas puede explicarse de la siguiente forma:

Cuando se coloca una suspensión Transfersómica en la superficie de la piel, el agua se evapora y las vesículas comienzan a secarse. Los fosfolípidos son xerofóbicos, es decir, evitan los alrededores secos. Por lo tanto, las vesículas se mueven a lo largo de la zona donde existe el gradiente osmótico, siendo atraídas hacia las áreas con mayor contenido de agua en los espacios estrechos entre células adyacentes. Este fenómeno, junto con la gran capacidad de los Transfersomas para deformarse, origina una fuerza provocada por las vesículas que obliga al ensanchamiento de las uniones intercelulares en la piel y crea canales transcutáneos de 20 a 30 nm de amplitud. Estos nuevos canales intercelulares permiten el paso a las entidades lo suficientemente deformables para adaptarse a ellos. A lo largo de dichos canales en el estrato córneo, los Transfersomas alcanzan regiones con alto contenido de agua en las capas profundas de la piel. Posteriormente, las vesículas se distribuyen entre las células. Debido a que son muy grandes para penetrar los vasos sanguíneos cutáneos, los Transfersomas se desvían de ellos y llegan al tejido subcutáneo. Por último, las vesículas llegan a circulación sistémica vía el sistema linfático fenestrado, que tiene aperturas con amplitud suficiente [7, 14, 15].

Sólo se presenta una alta capacidad de penetración cuando el estrés impuesto a los Transfersomas es suficientemente alto; el pasaje de dichas vesículas a través de poros muy estrechos es casi perfecto aún cuando su tamaño excede el diámetro del poro por un factor de 4 a 10.

Por el contrario, los liposomas no son deformables, siendo incapaces de atravesar barreras con poros de diámetro menor al suyo, llevándose a cabo el tamizado de las vesículas en los poros.

Al aplicar liposomas en la superficie de la piel, sólo se muestra una capacidad de penetración limitada. En consecuencia, se logra un transporte intradérmico limitado, menor al 2% (en ratones). La profundidad que alcanzan los acarreadores liposómicos se limita a las capas externas del estrato córneo. En contraste con esto, los Transfersomas pueden transportar un porcentaje mayor o igual al 95% de la masa lipídica aplicada en o a través del estrato córneo de piel de murino cuando se aplican en forma no oclusiva [14, 15].

Sin importar el hecho de que la oclusión de la piel incrementa la velocidad de permeación molecular concentración-dependiente, el rol de la hidrotaxis en el transporte transcutáneo de las vesículas explica porqué la oclusión disminuye la velocidad de transporte.

Ni aún las vesículas más deformables pueden entrar en un poro significativamente estrecho sin experimentar un cambio de volumen; si la expansividad/compresibilidad de la bicapa lipídica es muy pequeña, es imposible atravesar el poro. Cualquier vesícula puede perder algo de su contenido durante la deformación en el poro. Esto compensa la diferencia de volumen entre la esfera y cualquier otra forma no esférica adaptada a la forma del poro. Dicho cambio de volumen no afecta el transporte trans-barrera de los agentes asociados a las vesículas.

La alta deformabilidad de las vesículas permite que aún los agregados más grandes mantengan su tamaño después de atravesar los poros. G. Cevc y colaboradores encontraron que la composición química de las vesículas Transfersómicas no cambia significativamente durante su pasaje a través de los poros estrechos [13].

En base a la información obtenida hasta la fecha, se piensa que las vesículas Transfersómicas conservan su estabilidad física, siendo transportadas a través de la piel en forma de entidades dinámicas intactas [13, 15].

En primer lugar se tiene que, en un estudio realizado por G. Cevc y G. Blume[15] encontraron pequeñas concentraciones lipídicas (1 y 10%) en sangre después de 8 horas de la aplicación dérmica de formulaciones Transfersómicas. De acuerdo a lo anterior, es poco probable que durante un periodo de 8 horas se degrade una proporción apreciable de lípidos por las células que se encuentran en la piel. El tiempo aproximado de degradación de los lípidos por los fagocitos es de aproximadamente 6 horas, por lo que en un experimento que dura 8 horas se dispone de muy poco tiempo para la degradación masiva de los liposomas por los corneocitos (mucho menos activos metabólicamente que los fagocitos) y la subsecuente permeación de los monómeros resultantes. En segundo lugar, se tiene que la efectividad de permeación de las micelas mixtas lípido-detergente es menor que en el caso de los Transfersomas. Por último, parte de la radioactividad lípido-asociada recuperada después de la aplicación de las formulaciones Transfersómicas se recupera en el hígado, el cual acumula partículas y vesículas, pero no moléculas lipídicas sencillas.

Si lo anterior es cierto, se propone que una vez llegando a circulación sistémica, los lípidos que componen las vesículas se distribuyen en las lipoproteínas del suero y posteriormente circulan en el organismo.

Para que el transporte de los acarreadores a través de la piel sea exitoso es importante que la fuerza impulsora sea mayor que la resistencia a la penetración de la piel de los acarreadores. El alcance de los agentes que se transportan a través de la piel por medio de los acarreadores ultradeformables se ve afectado por: las características de la piel, las características del acarreador, las interacciones fármaco-acarreador, las interacciones fármaco-piel, la dosis aplicada y la forma de aplicación [14. 15].

3.3 ELECTROFORESIS CAPILAR (EC)

La técnica de separación electroforética se basa en el principio de que al aplicar un campo eléctrico externo a una solución de especies cargadas, cada ion se mueve hacia el electrodo de carga opuesta a una velocidad determinada por el campo eléctrico aplicado, la forma de las especies migrantes y el ambiente que las rodea (figura 3) [19].

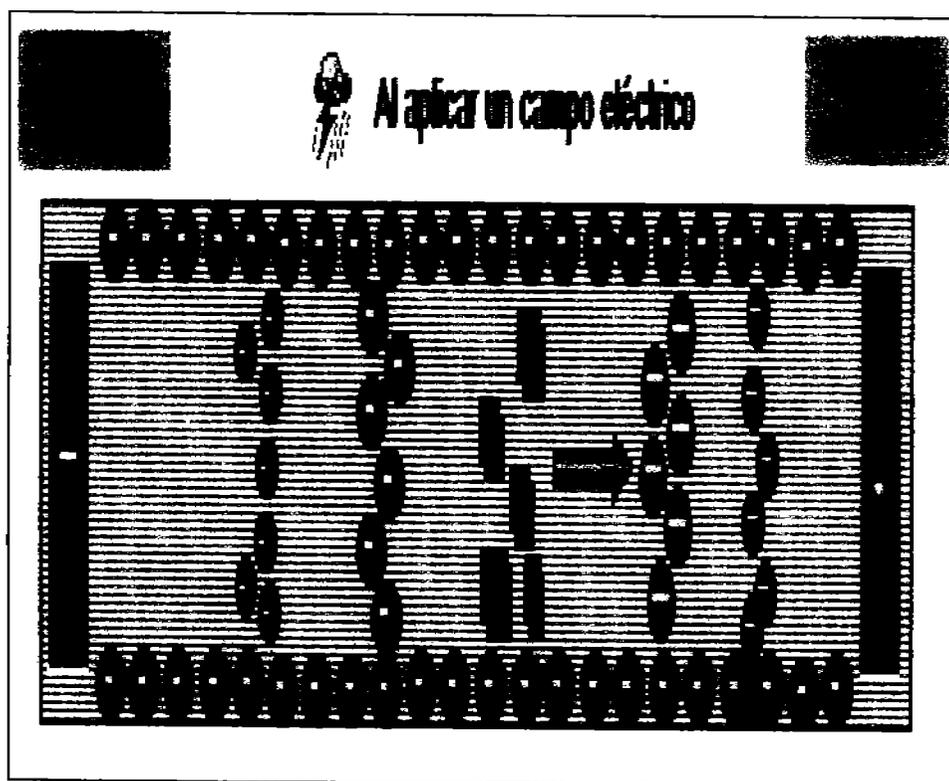


FIGURA 3. Proceso de Separación Electroforética [18]

En Electroforesis Capilar (EC) la pared del capilar proporciona soporte físico y estabilidad mecánica al electrolito, las separaciones se basan en las diferencias entre las relaciones carga/masa de los analitos.

Electroforesis Capilar es un término colectivo que incorpora a todos los modos electroforéticos que se llevan a cabo dentro de un capilar, donde los componentes de una mezcla se transportan a través de un tubo capilar dispuesto horizontalmente (parcialmente enrollado) por efecto de una elevada diferencia de potencial eléctrico que se aplica a lo largo del tubo y entre dos electrodos [20].

Los componentes básicos de un sistema de Electroforesis Capilar, ejemplificados en la figura 4, son (19, 20, 21, 22, 23):

- Fuente de poder
- Electroodos (ánodo y cátodo)
- Depósitos (viales) donde se colocan los electrodos
- Capilar (Medio de Soporte)
- Sistema de enfriamiento del capilar
- Sistema de inyección de la muestra
- Detector

El capilar de separación se llena con electrolito soporte (usualmente buffer) y se coloca entre dos depósitos que también lo contienen; los electrodos son conectados a una fuente de poder y se sumergen en los depósitos por separado.

La introducción de una muestra se realiza substituyendo un depósito de buffer por el contenedor con la muestra durante este proceso. Un volumen de muestra definido es introducido en el tubo capilar, ya sea por presión o por la aplicación de un pequeño voltaje durante algunos segundos. Después se aplica una diferencia de potencial (o de corriente) para realizar la separación. Las especies iónicas en la muestra migran con dirección y velocidad determinadas por su carga y masa; eventualmente pasan por un detector y la señal obtenida entonces se conoce como electroferograma (figura 4) [19, 20].

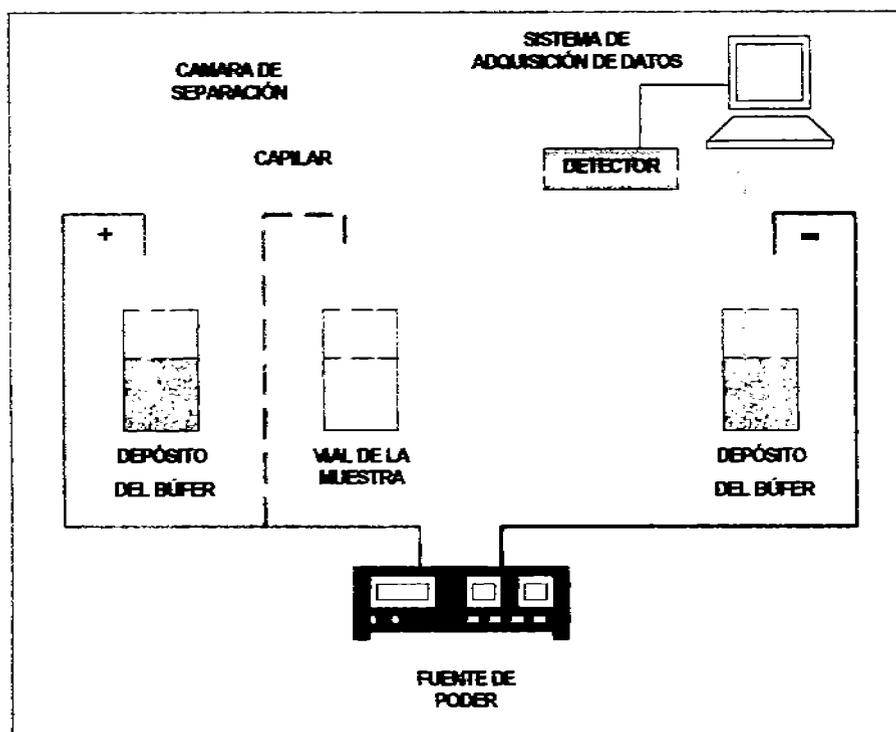


FIGURA 4. Componentes básicos del equipo de Electroforesis Capilar [19]

Muchas biomoléculas, tales como aminoácidos, péptidos, proteínas y ácidos nucleicos, poseen grupos ionizables y pueden tenerse en disolución en forma de especies con carga eléctrica, tanto como **cationes** (+) o como **aniones** (-).

Además, las moléculas que tienen cargas similares poseen distintas relaciones **carga/masa**, debido a diferencias en su peso molecular. En conjunto, éstos aspectos constituyen la base para una migración diferencial cuando los iones en disolución se someten a un campo eléctrico por la imposición de una diferencia de potencial eléctrico entre dos electrodos.

Los cationes se trasladan hacia el **cátodo** (-) y los aniones hacia el **ánodo** (+) a velocidades que dependen del equilibrio entre la fuerza impulsora del campo eléctrico sobre los iones cargados de la muestra y las fuerzas de fricción electrostáticas. El material de la muestra debe estar en solución, puede ser en agua o en un disolvente miscible en agua. La corriente se mantiene por todo el circuito ya que los electrodos están sumergidos en viales que contienen buffer. Durante la separación, en los electrodos se producen iones hidroxilo e hidrógeno en el cátodo, mientras que en el ánodo se forman iones hidronio y oxígeno.

En disolución libre, hay una resistencia de fricción mínima entre los iones y la disolución, teniendo lugar una rápida migración de los iones. La versatilidad de la electroforesis para separar sustancias con carga eléctrica, desde pequeños iones inorgánicos hasta grandes moléculas, depende en gran parte de que se lleve a cabo en un medio de soporte adecuado y relativamente homogéneo. Algunas veces puede idearse un medio que interactúe específicamente con los iones que hay que separar, para explotar así las diferencias de la relación carga/masa e introducir fuerzas de retardo especiales que convengan al análisis.

La movilidad electroforética se ve afectada por la carga, la forma y tamaño del analito así como de la viscosidad del medio. Las propiedades del disolvente tales como la fuerza iónica, pH y la constante dieléctrica, también son importantes porque influyen sobre la carga efectiva del analito [19].

3.3.1 PRINCIPIOS DE LA SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA

3.3.1.1 MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA

La separación electroforética está basada en las diferencias de velocidad de los analitos en presencia de un campo eléctrico [20, 21]. La velocidad de un analito en ausencia del flujo electroosmótico está dada por la ecuación 1:

$$v = \mu E \quad (1)$$

Donde: v = velocidad del analito
 μ = movilidad electroforética
 E = campo eléctrico

El campo eléctrico es una función del voltaje aplicado y de la longitud del capilar (voltios/cm). La movilidad electroforética depende de: especie iónica, tamaño, carga, temperatura, concentración y naturaleza del analito.

A partir de la ecuación 2 es evidente que especies o analitos cargados y pequeños tienen alta movilidad, mientras que especies cargadas con gran peso molecular muestran baja movilidad.

$$\mu = \frac{q}{6 \pi r \eta} \quad (2)$$

Donde: μ = la movilidad electroforética del analito
 q = carga del analito
 η = viscosidad de la solución
 r = radio molecular

3.3.1.2 FLUJO ELECTROSMÓTICO

Un constituyente fundamental de la Electroforesis Capilar es el llamado Flujo Electrosmótico (FEO). Este flujo se origina por la presencia del campo eléctrico en una solución iónica cuando entra en contacto con una superficie sólida cargada. Por ejemplo, en un capilar de sílice fundida, la interfase se pone en contacto con la solución que contiene el electrolito soporte.

La superficie del sólido presenta carga negativa debido al aumento en la ionización de los grupos silanol (a pH mayor de 5-6) y conjuntamente con sus contraiones forman una doble capa eléctrica [22, 24, 25, 26].

Los iones presentes en el sistema (incluyendo a los contraiones de los grupos silanol, H⁺) bajo la influencia del voltaje aplicado son desplazados hacia el cátodo de acuerdo a su carga y arrastran disolvente con ellos dada su solvatación, originando así el denominado flujo electroosmótico.

Para mantener el balance de la carga, los contraiones (en la mayoría de los casos cationes), que se localizan cerca de la superficie del capilar, forman una doble capa y crean un potencial muy cercano a la pared. Este potencial que se origina entre la pared del capilar (grupos silanol ionizados) y los contraiones del electrolito soporte es denominado potencial zeta (ζ) el cual está dado por la ecuación 3:

$$\zeta = \frac{4\pi\eta\mu_{eo}}{\epsilon} \quad (3)$$

Donde: η = viscosidad de la solución
 ϵ = constante dieléctrica del medio
 μ_{eo} = movilidad del flujo electroosmótico

Mientras tanto la velocidad lineal del flujo electroosmótico está dada por la ecuación:

$$v_{eo} = \frac{\epsilon E \zeta}{4\pi\eta} \quad (4)$$

Donde: ϵ = constante dieléctrica del medio
 E = campo eléctrico
 ζ = potencial zeta
 η = viscosidad de la solución
 v_{eo} = velocidad del flujo electroosmótico

El potencial zeta es determinado esencialmente por la carga de la superficie de la pared del capilar. Esta carga depende fuertemente del pH por lo que la magnitud del FEO varía con el pH. A valores altos de pH hay más grupos silanol ionizados y por consecuencia un potencial zeta más alto; a valores bajos de pH hay una menor superficie ionizada y un potencial zeta menor [22].

El potencial zeta también depende de la fuerza iónica del buffer, de tal forma que el incremento de la fuerza iónica comprime la doble capa, originando disminución del potencial zeta, y del FEO.

Un beneficio del FEO es que provoca movimiento en todas las especies, aún prescindiendo de carga, hacia la misma dirección. Bajo condiciones normales cuando la superficie del capilar está cargada negativamente, el flujo va del ánodo al cátodo.

Los cationes fluirán rápidamente hacia el cátodo dependiendo de la magnitud del flujo y puede ser en un orden mayor a sus movilidades electroforéticas. Por otro lado, los aniones tratarán de migrar hacia el ánodo pero si el FEO es mayor que su movilidad electroforética pueden ser arrastrados hacia el cátodo.

Así idealmente, los cationes y aniones, pueden ser separados en una sola corrida individual, ya que todos tendrán una migración neta en la misma dirección, aún los neutros. Si, por otra parte la especie se mueve en contra del FEO su velocidad disminuye. Una especie no cargada se moverá a la velocidad del flujo electroosmótico.

El FEO afecta la cantidad de tiempo que los analitos permanecen en el capilar debido a su influencia sobre la movilidad del analito. Esto puede alterar la longitud requerida del capilar para lograr una separación, pero aún así no afecta la selectividad. Se han propuesto procedimientos instrumentales para el control directo del flujo electroosmótico, pudiendo ser alterado por cualquiera de los siguientes métodos:

- Modificación química de la pared capilar, como una alternativa para limitar la adsorción del analito.
- Ajuste del pH del electrolito soporte.
- Concentración del buffer.

-
- Adición de tensoactivos (a concentraciones por debajo de la concentración micelar crítica), que pueden actuar como agentes de solubilización para analitos hidrófobos, como reactivos apareadores de iones, o como modificadores de pared.
 - Adición de disolventes orgánicos, los cuales disminuyen la velocidad del flujo electroosmótico.
 - Adición de selectores quirales, principalmente ciclodextrinas

Fundamentalmente el control del FEO requiere de la alteración de la carga de la superficie del capilar o de la viscosidad del buffer. Las condiciones que afectan la carga de la superficie de la pared del capilar pueden afectar también al analito (así como al pH del buffer).

El FEO puede ser afectado también ajustando la concentración y la fuerza iónica del buffer. Altas concentraciones de buffer son útiles pues limitan las interacciones Coulómbicas del analito con las paredes del capilar por decaimiento de la carga efectiva en la pared. Sin embargo, el calentamiento del capilar restringe el uso de buffer a altas concentraciones. Las concentraciones típicas de buffer están entre 10-50 mM, pero 100-500 mM y aún más altas se han utilizado en casos aislados [19].

3.3.1.3 MOVILIDAD APARENTE Y TIEMPO DE MIGRACIÓN

El tiempo requerido por un analito para migrar desde el punto de introducción de la muestra hasta el punto de detección es llamado "tiempo de migración" y está dado por el cociente de la distancia y la velocidad de migración [27].

El tiempo de migración y otros parámetros experimentales pueden utilizarse para calcular la movilidad aparente (μ_a) del analito, mediante la siguiente ecuación:

$$\mu_a = \frac{l}{tE} = \frac{lL}{tV} \quad (5)$$

Donde: μ_a = movilidad aparente ($\text{cm}^2 \text{seg}^{-1} \text{V}^{-1}$)

V = voltaje aplicado (V)

l = longitud efectiva del capilar (al detector) (cm)

L = longitud total del capilar (cm)

t = tiempo de migración (seg)

E = campo eléctrico (V/cm)

En presencia del FEO la movilidad medida es llamada movilidad aparente, μ_a . La movilidad efectiva, μ_e , es la movilidad del analito independiente de las condiciones experimentales y puede ser calculada a partir de la movilidad aparente. Para esto es necesario medir el FEO por separado, usando un marcador neutral que se mueva a una velocidad igual a la del FEO [19].

3.3.2 MODOS DE SEPARACIÓN

La versatilidad de la técnica ha permitido la existencia de diferentes modalidades de trabajo como: la Electroforesis Capilar de Zona (ECZ), Cromatografía Capilar Electrocinética Micelar (CCEM), Enfoque Isoeléctrico Capilar (EIC), Isotacoforesis Capilar (ITPC), Electroforesis Capilar en Gel (ECG) y Electro cromatografía Capilar (ECC) [28].

Existen tres mecanismos de separación en Electroforesis Capilar:

- a) Separación basada en diferentes velocidades bajo un campo eléctrico.
- b) Separación basada en diferentes puntos isoelectricos.
- c) Separación basada en diferentes movilidades en un sistema en estado estacionario.

Los modos de separación electroforética están basados en modificaciones a los tres mecanismos [29].

3.3.3 ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA (ECZ)

La ECZ es el modo más simple y ampliamente usado. Las separaciones se llevan a cabo en un capilar de sílice fundida bajo la influencia de un campo eléctrico. La velocidad de los analitos se modifica controlando el pH, viscosidad o concentración del buffer, o cambiando el voltaje de separación. El flujo electroosmótico se emplea frecuentemente en este modo de separación para mejorar la resolución o para acortar los tiempos de análisis.

Mecanismo de Separación

En Electroforesis Capilar de Zona la composición del electrolito es constante a lo largo del capilar y en los depósitos en que se encuentran los electrodos. El electrolito es un medio buffer y conductor eléctrico. Cuando se introduce la muestra, cada especie iónica migra en el buffer en una zona discreta a diferente velocidad con respecto a las demás especies. Las moléculas neutras son transportadas con el flujo electroosmótico en un pico sin resolución.

Debido a la presencia del flujo electroosmótico, tanto aniones como cationes pueden observarse en una sola corrida; sin embargo, las separaciones pueden optimizarse para alguna de las especies en particular.

Sistemas Buffer

El buffer se elige de acuerdo al pH requerido; algunos buffers son particularmente útiles para aplicaciones específicas. El buffer de fosfatos, por ejemplo, se usa para separaciones de proteínas a bajos pH's, mientras que el buffer de boratos se usa para la separación de carbohidratos y catecolaminas.

Es importante mantener un sistema bien amortiguado, cuya absorción a la longitud de onda de detección sea pequeña o nula.

Una vez que se ha seleccionado el buffer, la velocidad de los analitos se modifica controlando el pH, viscosidad o concentración del mismo, o cambiando el voltaje de separación [29].

En este trabajo se utilizó éste modo de separación (ECZ), con flujo electroosmótico normal (de ánodo a cátodo).

3.4 ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE

La espectrofotometría es el conjunto de procedimientos que utilizan la luz para medir concentraciones químicas [20].

3.4.1 Propiedades de la Luz

Es conveniente describir a la luz a la vez en términos de partículas y de ondas. Las ondas de la luz constan de campos eléctricos y magnéticos, que oscilan en planos perpendiculares entre sí. La longitud de onda, λ , es la distancia entre las crestas de dos ondas. La frecuencia, ν , es el número de oscilaciones completas de una onda en un segundo. La unidad de frecuencia es el inverso de los segundos, s^{-1} . Una oscilación por segundo también se llama hertzio (Hz). Una frecuencia de $10^6 s^{-1}$ es, por tanto, de 10^6 Hz, o 1 *megahertzio*, MHz.

La relación entre frecuencia y longitud de onda es:

$$\nu\lambda = c \quad (6)$$

donde c es la velocidad de la luz ($2,998 \times 10^8$ m/s en el vacío). En un medio distinto del vacío, la velocidad de la luz es c/n , donde n es el índice de refracción de ese medio.

Para longitudes de onda en el visible la mayoría de las sustancias tienen $n > 1$, de modo que la luz visible se propaga más lentamente a través de la materia que en el vacío. Cuando la luz atraviesa dos medios con diferentes índices de refracción, la frecuencia permanece constante, pero varía la longitud de onda.

Desde el punto de vista de la energía, se concibe a la luz como partículas llamadas fotones. Cada fotón transporta la energía, E , dada por

$$E = h \nu \quad (7)$$

Donde h es la constante de Planck ($6,62618 \times 10^{-34}$ J s). ν es la frecuencia

La ecuación 7 afirma que la energía es proporcional a la frecuencia. Combinando las ecuaciones 6 y 7, se puede escribir

$$E = \frac{hc}{\lambda} = h c \tilde{\nu} \quad (8)$$

donde $\tilde{\nu}$ se llama número de onda. La energía es inversamente proporcional a la longitud de onda, pero directamente proporcional al número de onda. La luz roja, con una longitud de onda mayor que la luz azul es menos energética que la luz azul. La unidad en el Sistema Internacional (SI) del número de onda es el inverso del metro, m^{-1} . Sin embargo, la unidad más corriente del número de onda es el inverso del centímetro cm^{-1} [20].

3.4.2 Absorción de Luz

Cuando una molécula absorbe un fotón, su energía aumenta. Se dice que la molécula ha pasado a un estado excitado. Si una molécula emite un fotón, su energía disminuye. El estado de mínima energía de una molécula se llama estado fundamental. La radiación de microondas estimula el movimiento rotacional de las moléculas cuando absorben esa radiación. La radiación de IR estimula el movimiento vibracional de las moléculas cuando la absorben, y la radiación visible y UV hacen que los electrones pasen a orbitales de mayor energía. Los rayos X y la radiación UV lejano rompen enlaces químicos y ionizan moléculas (figura 5) [20, 30].

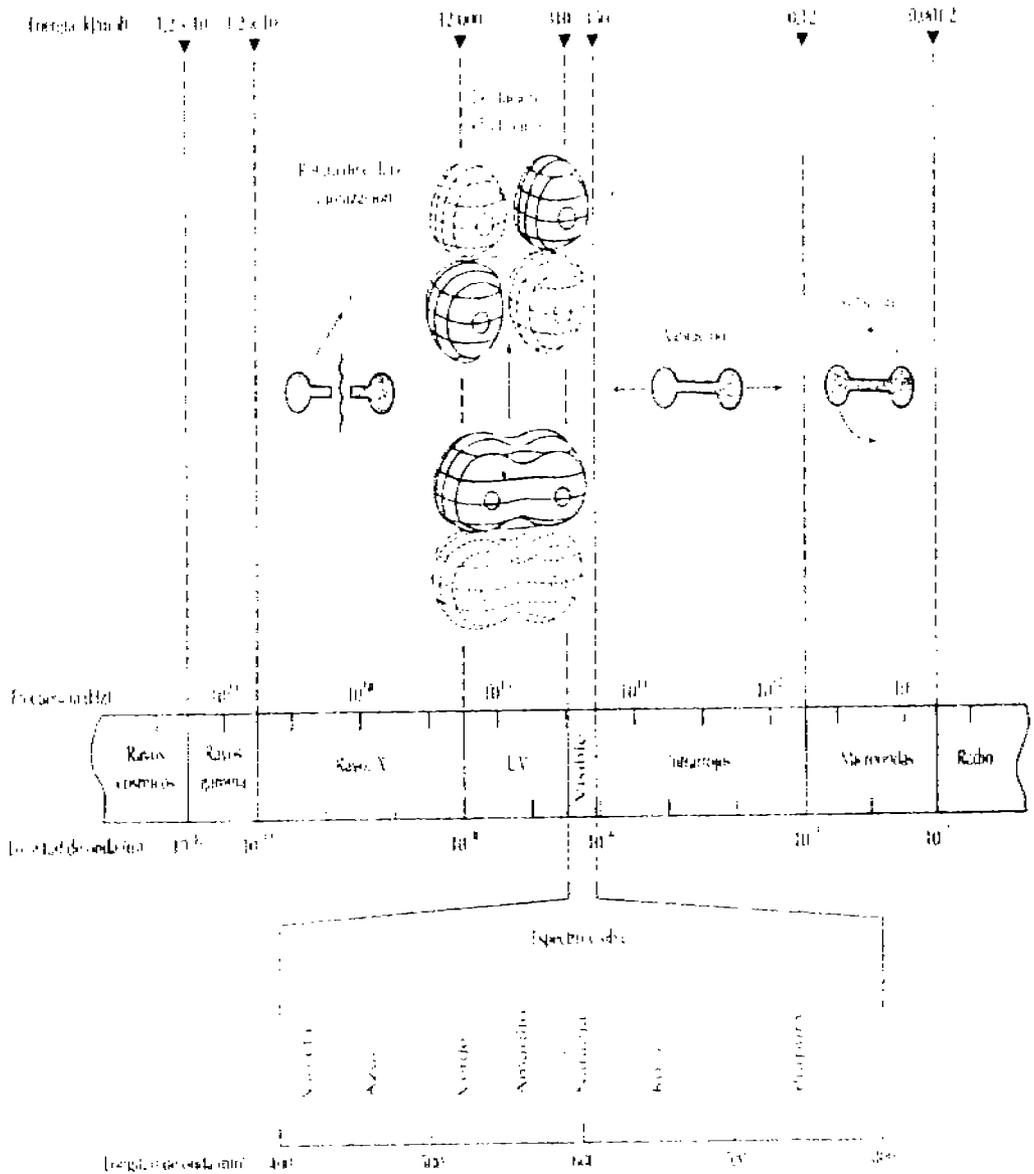


FIGURA 5. Espectro electromagnético, donde se indican los procesos moleculares representativos que ocurren cuando se absorbe luz en cada una de sus regiones [30].

Cuando una muestra absorbe luz, la potencia radiante del haz de luz disminuye. La potencia radiante, P , es la energía por segundo y por unidad de área del haz de luz. La luz se hace pasar a través de un monocromador (prisma, red de difracción o incluso un filtro) para seleccionar una longitud de onda.

La luz de una sola longitud de onda se llama monocromática, o sea, de "un color". La luz monocromática tiene una potencia radiante P del haz que emerge por el lado opuesto de la muestra. Como la muestra puede haber absorbido algo de luz, $P < P_0$ (éste último término representa a la potencia radiante inicial).

La transmitancia, T , se define como la fracción de luz incidente que pasa a través de la muestra.

$$T = \frac{P}{P_0} \quad (9)$$

Donde P_0 es la potencia radiante incidente y P es la potencia radiante emergente.

Por tanto, T puede valer de 0 a 1. El porcentaje de transmitancia es simplemente $100T$ y puede valer desde 0 hasta 100%. La absorbancia se define como:

$$A = \log_{10} \left[\frac{P_0}{P} \right] = -\log T \quad (10)$$

Cuando no se absorbe luz, $P = P_0$ y $A = 0$. Si se absorbe el 90% de luz, se transmite el 10%, y $P = P_0/10$. Este cociente vale $A = 1$.

La absorbancia es importante porque es directamente proporcional a la concentración, c , de la especie que absorbe la luz en la muestra, según la ley de Beer:

$$A = \epsilon bc \quad (11)$$

La ecuación 11, que es el fundamento de la espectrofotometría, tal como se aplica en química analítica, se llama ley de Lambert-Beer o simplemente ley de Beer. La absorbancia es adimensional. La longitud del paso óptico, b , normalmente se expresa en centímetros. La cantidad ϵ se llama absorptividad molar (o coeficiente de extinción) y tiene como unidades $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (si la concentración está expresada

en moles por litro). La absorptividad molar es la característica de una sustancia que nos dice cuánta luz absorbe a una longitud de onda determinada [30].

En la tabla 1 se presentan los colores de la luz visible, su longitud de onda de máxima absorbancia y el color absorbido de acuerdo al color que observamos.

Tabla 1. Colores de la luz visible [30].

| Colores de la luz visible | | |
|--|-------------------|------------------|
| Longitud de onda de máxima absorbancia | Color absorbido | Color observado |
| 380 - 420 | Violeta | Amarillo verdoso |
| 420 - 440 | Azul violáceo | Amarillo |
| 440 - 470 | Azul | Naranja |
| 470 - 500 | Verde azulado | Rojo |
| 500 - 520 | Verde | Púrpura |
| 520 - 550 | Verde amarillento | Violeta |
| 550 - 580 | Amarillo | Azul violáceo |
| 580 - 620 | Naranja | Azul |
| 620 - 680 | Rojo | Verde azulado |
| 680 - 780 | Púrpura | Verde |

3.4.3 El Espectrofotómetro

En un espectrofotómetro (aparato para medir la absorbancia de la luz), la luz procedente de una fuente continua pasa a través de un monocromador, que selecciona una banda estrecha de longitudes de onda del haz incidente. Esta luz "monocromática" atraviesa una muestra de paso óptico b , y el equipo mide la potencia radiante de la luz que emerge.

En espectroscopía visible y UV se coloca normalmente una muestra líquida en una celda llamada cubeta, que tiene paredes planas de sílice fundida. El vidrio es adecuado para espectroscopía visible pero no para UV, porque absorbe radiación UV. Las cubetas más utilizadas tienen una longitud de paso 1 cm.

En un instrumento de haz simple no se mide directamente la potencia radiante incidente P_0 . En realidad, se mide la potencia radiante de la luz que pasa a través de una cubeta de referencia que contiene el disolvente puro, y que se define como P_0 . Luego se retira esta cubeta y se reemplaza por otra idéntica que contiene la muestra. La potencia radiante de la luz que llega al detector después de pasar por

la muestra es la cantidad P . Conociendo P y P_0 se puede determinar T o A . La cubeta de referencia, que contiene el disolvente puro (o el blanco), compensa la reflexión, dispersión y absorción debida a la cubeta y al disolvente [20].

3.4.4 La ley de Beer en análisis químico

Para determinar un compuesto por espectrofotometría debe absorber luz, y la absorción debe poder distinguirse de la debida a otras sustancias que pueda haber en la muestra. Dado que la mayoría de los compuestos absorben radiación ultravioleta, la absorbancia en el ultravioleta, de ordinario, es de poca utilidad, y en análisis se utiliza normalmente el espectro visible. Sin embargo, si no hay especies interferentes, puede utilizarse la absorbancia ultravioleta.

3.4.5 Desviaciones a la ley de Beer

La ley de Beer afirma que la absorbancia es proporcional a la concentración de la especie absorbente. Esta ley aplica a la radiación monocromática y es válida exactamente para disoluciones diluidas (≤ 0.01 M) de la mayoría de las sustancias.

En disoluciones concentradas, las moléculas de soluto interaccionan entre sí debido a su proximidad. Cuando las moléculas del soluto se acercan unas a otras, sus propiedades (entre las que se encuentra la absorptividad molar) cambian.

A concentraciones muy altas, los solutos se convierten prácticamente en disolvente. Las propiedades de una molécula no son exactamente las mismas en diferentes disolventes. Los solutos de una disolución que no absorben pueden interaccionar con las especies absorbentes y alterar la absorptividad.

Si la molécula absorbente participa en un equilibrio químico que depende de la concentración, la absorptividad cambia con la concentración [30].

3.5. PROPIEDADES QUÍMICAS DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS A ESTUDIAR.

En este trabajo se empleará glicina, fenilalanina y triglicina como principios activos modelo. Es importante mencionar que se eligieron en base a su pequeño peso molecular y a su hidrofiliya más no en base a su actividad farmacológica.

3.5.1 GLICINA

Descripción: Polvo cristalino blanco inodoro, con sabor dulce. Las soluciones de glicina son ácidas frente al tornasol.

Solubilidad: Un gramo se disuelve en 4 ml de agua y en 1254 ml de alcohol. Poco soluble en éter.

Usos: En terapia de niastenia gravis (muchos investigadores dudan de su eficiencia en esta enfermedad). Como líquido para irrigación en la resección transuretral de la próstata. El ácido también ha sido empleado en varias preparaciones antiácidas, a veces como una sal compleja; sin embargo, su limitada capacidad reguladora del pH no justifica el costo de la mayoría de tales preparaciones.

3.5.2 FENILALANINA

Descripción: placas monoclinicas. Agujas hidratadas a partir de soluciones diluidas.

Solubilidad: 1 g se disuelve en 33.8 ml de agua. Muy ligeramente soluble en metanol y etanol.

Usos: Componente del saborizante artificial aspartame. Nutriente [30].

3.5.3 TRIGLICINA

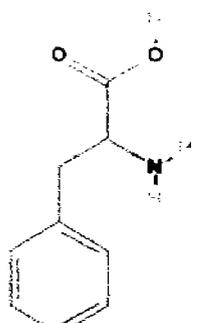
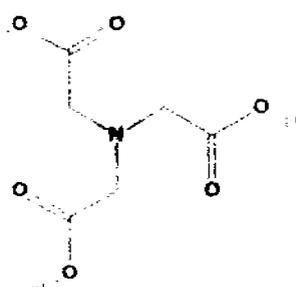
Descripción: Polvo blanco cristalino y fotosensible.

Solubilidad: 1.8 g en 100 ml de agua. Poco soluble en solventes orgánicos.

Usos: Fuente de glicina y diglicina [31, 32].

En la tabla 2 se resumen las características generales de glicina, fenilalanina y triglicina.

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de los activos estudiados.

| PROPIEDAD | GLICINA | FENILALANINA | TRIGLICINA |
|----------------------------|---|---|--|
| Estructura química |  <p>[33]</p> |  <p>[33]</p> |  <p>[33]</p> |
| Punto Isoeléctrico | 6.20 | 5.48 | 5.6 |
| pKa's | pKa1 = 2.34 pKa2 = 9.60 | pKa1 = 2.58 pKa2 = 9.24 | pKa1 = 3.03 pKa2 = 3.07 pKa3 = 10.07 |
| Peso Molecular (g/mol) | 75 | 165.19 | 191.14 |
| K _{o/w} | 0.0186 [33] | 2.2909 [33] | 6.4714 x 10 ⁻⁴ [33] |
| Solubilidad en agua (g/ml) | 0.25 | 0.0296 | 0.00128 |

IV. PARTE EXPERIMENTAL

REACTIVOS

- ❖ Fosfatidilcolina de frijol de soya (Epikuron 200), pureza = 95.0% (Lucas Meyer, Hamburg, FRG; Alemania).
- ❖ Monooleato de polioxietilen sorbitán (Tween 80) (ICI Surfactants, Wilmington, DE).
- ❖ Alcohol etílico, pureza: 99.92% (Fermont, Monterrey, N.L).
- ❖ Glicina (Riedel-de Haën, Alemania).
- ❖ Fenilalanina (SIGMA, EE. UU).
- ❖ Triglicina (SIGMA, EE. UU).
- ❖ Membranas de policarbonato, tamaño de poro = 100nm (Millipore Corp., Bedford, MA; EE.UU).
- ❖ Membranas de ésteres mixtos de celulosa, tamaño de poro = 100 nm (ADVANTEC MPS, Inc., Japón).
- ❖ Sephadex G10 (SIGMA, EE. UU).
- ❖ Ninhidrina monohidratada (J.T. Baker, México)
- ❖ Agua provista por el sistema de purificación Milli-Q (Millipore Corp., Bedford, MA; EE. UU).

EQUIPOS

- ❖ Balanza analítica (BOECO, modelo BBC 32, Alemania).
- ❖ COULTER® N4 Plus Submicron Particle Sizer (Coulter Corp., Miami, FL; EE. UU).
- ❖ Sonicador Branson® Ultrasonic Cleaner Modelo: 5210 (Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, CT).
- ❖ Rotavapor (Modelo Laborota 4000, Heidolph, Alemania).
- ❖ Vórtex (Mixer, modelo M16715, EE. UU).
- ❖ Centrifuga (Modelo EBA 12/ 12R, Hettich, Alemania).
- ❖ Sistema de Electroforesis Capilar P/ACE System MDQ (Beckman, EE. UU).
- ❖ Espectrofotómetro CARY 50 Conc UV-Visible (Varian Scientific Instruments, EE. UU).

4.2 METODOLOGÍA

Procedimiento No. 1

Preparación de vesículas Transfersómicas para determinar el tiempo óptimo de sonicación

1. Pesar la cantidad requerida de fosfatidilcolina (PC) y agente tensoactivo (Tween 80 o Colato de Sodio), de tal forma que se encuentren en la siguiente proporción: 15.5% de Tween 80 + 84.5% de PC o 14.0% de Colato de Sodio y 86.0% de PC.
2. Disolver (por separado) los componentes anteriores en la cantidad suficiente de etanol.
3. Incorporar las soluciones anteriores (tensoactivo + etanol y PC + etanol).
4. Evaporar el solvente mediante evaporación rotatoria a presión reducida (en Rotavapor).
5. Secar a vacío (durante toda la noche) la película formada en el punto anterior.
6. Suspender la película en solución de etanol al 7% (v/v), de tal forma que la concentración lipídica sea del 5 % p/v, agitando con vórtex durante 15 minutos.
7. Dejar hidratar la suspensión formada en el punto anterior durante 2h.
8. Someter la suspensión preparada a baño de sonicación durante 5 minutos a 4 °C
9. Filtrar a través de dos membranas de ésteres mixtos de celulosa o policarbonato (tamaño de poro 0.1 μm).
10. Caracterizar las vesículas formadas (Procedimiento No. 4).
11. Repetir el procedimiento 4 veces más, desde el punto 1 hasta el 7, sometiendo ahora las preparaciones a baño de sonicación durante 10, 15, 20 y 25 minutos a 4° C.
12. Filtrar a través de dos membranas de ésteres mixtos de celulosa o policarbonato (tamaño de poro 0.1 μm).
13. Caracterizar las vesículas formadas (Procedimiento No.3).

Procedimiento No. 2

Preparación de vesículas Transfersómicas para determinar el número óptimo de filtraciones

1. Pesar la cantidad requerida de fosfatidilcolina (PC) y agente tensoactivo (Tween 80), de tal forma que se encuentren en la siguiente proporción: 15.5% de Tween 80 + 84.5% de PC.
2. Disolver (por separado) los componentes anteriores en la cantidad suficiente de etanol.
3. Incorporar las soluciones anteriores (tensoactivo + etanol y PC + etanol).
4. Evaporar el solvente mediante evaporación rotatoria a presión reducida (en Rotavapor).
5. Secar a vacío (durante toda la noche) la película formada en el punto anterior.
6. Hidratar la película con solución etanol-agua al 7% v/v, de tal forma que la concentración lipídica sea del 5 % p/v, agitando con vórtex
7. Dejar reposar 2 h la suspensión formada en el punto anterior para permitir que las vesículas aumenten su volumen (se hinchen).
8. Someter la suspensión preparada a baño de sonicación durante 10 minutos a 4°C.
9. Filtrar a través de una membrana de ésteres mixtos de celulosa (tamaño de poro 0.1 μm).
10. Caracterizar las vesículas formadas (Procedimiento No.3).

Repetir 3 veces el punto No. 9, caracterizando las vesículas después de cada filtración.

Procedimiento No. 3

Caracterización de las vesículas lipídicas

Aparato: COULTER® N4 Plus Submicron Particle Sizer (Coulter Corp., Miami, FL)

1. Agregar aproximadamente 5 ml de diluyente (agua) limpio y filtrado a una celda de plástico limpia.
2. Agregar una gota de la suspensión Transfersómica preparada al diluyente.
3. Tapar la celda e invertirla varias veces para dispersar la muestra uniformemente. No se debe agitar.
4. Revisar que la celda no tenga marca de huellas digitales, si esto ocurre, se debe limpiar con papel libre de partículas.
5. Colocar la celda en el compartimiento para la muestra y cerrar la cubierta.
6. Seleccionar el ángulo al cual se quieren realizar las mediciones (90° para el presente estudio). Una vez hecho esto, el aparato despliega el rango establecido de intensidad con que debe cumplir la muestra ($5e+4 - 1e+6$ ct/seg).
7. Determinar la intensidad de la muestra. Si esta excede el límite superior, es necesario diluir la muestra; en caso contrario se debe concentrar la misma.
8. Si la intensidad entra en el rango establecido, se debe asegurar que dicha condición sea estable, ya que si hay fluctuaciones es posible la presencia de contaminantes en la muestra. Si la intensidad es estable y se encuentra en el rango establecido, la muestra está lista para la medición.

Procedimiento No. 4

Preparación de Transfersomas con principio activo* encapsulado

1. Pesar la cantidad requerida de fosfatidilcolina (PC) y agente tensoactivo (Tween 80), de tal forma que se encuentren en la siguiente proporción: 15.5% de Tween 80 + 84.5% de PC.
2. Disolver (por separado) los componentes anteriores en la cantidad suficiente de etanol.
3. Incorporar las soluciones anteriores (Tween 80 + etanol y PC + etanol).

-
4. Evaporar el solvente mediante evaporación rotatoria a presión reducida (en Rotavapor).
 5. Secar a vacío la película formada en el punto anterior durante toda la noche.
 6. Suspender la película con una solución de principio activo* en etanol al 7% (v/v), agitando con vórtex durante 15 minutos.
 7. Hidratar la suspensión formada en el punto anterior durante 24 h.
 8. Someter la suspensión preparada a baño de sonicación durante 10' a 4°C
 9. Filtrar a través de dos membranas de policarbonato (tamaño de poro 0.1 µm).
 10. Caracterizar las vesículas formadas (Procedimiento No. 3).

* Los principios activos pueden ser: Glicina, Fenilalanina ó Triglicina. La concentración de los mismos en etanol al 7% (v/v) para hidratar la película lipídica es de 2 mg/ml en todos los casos.

NOTA: Para preparar Transfersomas control (vacíos) se debe hidratar la película lipídica únicamente con solución etanólica al 7% (punto No. 6).

Procedimiento No. 5

Eliminación del principio activo libre con Sephadex G10

1. Pesar 0.8 g de Sephadex G10 en un tubo de ensaye.
2. Hidratar durante 5 horas el Sephadex del punto anterior con 6 ml de agua destilada. Agitar ocasionalmente.
3. Llenar una minicolumna con el gel preparado en el Punto No. 2.
4. Centrifugar el exceso de agua a 3000 rpm durante 5 min.
5. Agregar a la minicolumna del punto anterior el volumen de suspensión Transfersómica indicado por el procedimiento para cada principio activo.
6. Centrifugar a 3000 rpm por 5 min.

NOTA: Si no se emplea inmediatamente el Sephadex hidratado, el contenedor debe cerrarse herméticamente y almacenarse a 4 °C.

Procedimiento No. 6

Preparación del reactivo de ninhidrina [34]

1. Pesar 200 mg de hidrato de tricetohidrido $C_6H_4-1,2-(CO)_2 \cdot H_2O$ (Ninhidrina)
2. Disolver los 200 mg pesados en el punto anterior en 50 ml de etanol absoluto.
3. Añadir 50 ml de etilenglicol puro y 1 ml de ácido acético glacial puro.
4. Homogenizar.

NOTA. Es preferible preparar este reactivo inmediatamente antes del uso, pero es posible conservarlo toda la noche en el refrigerador.

Procedimiento No. 7

Preparación de la muestra analítica para cuantificación de glicina por espectrofotometría UV

1. Preparar Transfersomas cargados con principio activo según el Procedimiento No. 4.
2. Eliminar el principio activo libre haciendo pasar 500 μ l de suspensión Transfersómica a través de una columna de Sephadex G10 (Procedimiento No. 5).
3. Colectar los 500 μ l de suspensión transfersómica sin principio activo libre (obtenida en el punto No. 2).
4. Agregar 500 μ l de solución de Propanol al 50% (v/v) a la suspensión obtenida en el punto anterior, agitar hasta observar un color amarillo traslúcido.

NOTA. Para realizar la curva de calibración del principio activo se siguen los puntos que se indican a continuación:

- Preparar Transfersomas vacíos (según el Procedimiento No. 4)
- Seguir los puntos 2 y 3 de este procedimiento

-
- Agregar 500 μ l de solución del principio activo en Propanol al 50% (v/v) a las siguientes concentraciones: 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 y 0.6 mg/ml. Para preparar el blanco se agregan 500 μ l de Propanol al 50% (v/v).

Procedimiento No. 8

Cuantificación de glicina por espectrofotometría UV

1. Colocar en un vial 1 ml de muestra analítica, blanco o estándares para curva de calibración, preparados de acuerdo al procedimiento No. 7.
2. Agregar 4 ml de reactivo de ninhidrina (Procedimiento No. 6)
3. Calentar en baño maría el vial del punto No.1 durante 1.5 minutos.
4. Enfriar con agua el vial del punto anterior durante 30 segundos.
5. Colocar en la celda del espectrofotómetro la cantidad suficiente de la solución colorida obtenida en el punto No. 4.
6. Determinar la absorbancia a 575nm.

Procedimiento No. 9

Preparación de la muestra analítica para cuantificación de fenilalanina por espectrofotometría U.V

1. Preparar Transfersomas cargados con principio activo según el Procedimiento No. 4.
2. Eliminar el principio activo libre haciendo pasar 200 μ l de suspensión Transfersómica a través de una columna de Sephadex G10 (Procedimiento No. 5).
3. Colectar los 200 μ l de suspensión Transfersómica sin principio activo libre (obtenida en el punto No. 2) y transferirla a un tubo de ensayo.
4. Agregar al tubo de ensayo anterior 1 ml de Cloroformo G.R y 4 ml de agua destilada a la suspensión obtenida en el punto anterior, agitar la mezcla y permitir que las fases se separen durante 24 h.

-
5. Separar la fase acuosa y colocarla en un vaso de precipitado de capacidad adecuada.
 6. Colocar el vaso anterior en una parrilla magnética encendida a baja temperatura. Retirar el vaso hasta que desaparezca el olor a cloroformo.
 7. Tomar una alícuota de 2 ml de la fase acuosa del punto anterior y transferirla a un matraz volumétrico de 10 ml.
 8. Agregar al matraz anterior 2 ml de Propanol y llevar a volumen con Propanol al 50% (v/v).

NOTA. Para realizar la curva de calibración del principio activo se siguen los puntos que se indican a continuación:

- Preparar Transfersomas vacíos (Procedimiento No. 4).
- Seguir los puntos 2 y 3 de este procedimiento.
- Agregar 1 ml de Cloroformo G.R y 4 ml de solución de fenilalanina a las siguientes concentraciones: 10, 20, 30, 40, 50 y 100 mg/ml. Para preparar el blanco se agregan 4 ml de agua destilada.
- Continuar con los puntos No. 5 a 8 de este procedimiento.

Procedimiento No. 10

Cuantificación de fenilalanina por espectrofotometría U.V

1. Colocar en la celda del espectrofotómetro la cantidad suficiente de muestra analítica, blanco o estándares para curva de calibración de fenilalanina obtenidas según el Procedimiento No. 9.
2. Determinar la absorbancia a 220 nm.

Procedimiento No. 11

Preparación de la muestra analítica para cuantificación de triglicina por electroforesis capilar

1. Preparar Transfersomas cargados con principio activo según el procedimiento No. 4.
2. Eliminar el principio activo libre haciendo pasar 300 μl de suspensión Transfersómica a través de una columna de Sephadex G10 (Procedimiento No. 5).
3. Colectar los 300 μl de suspensión Transfersómica sin principio activo libre (obtenida en el punto No. 2).
4. Agregar 300 μl de solución de Propanol al 50% (v/v) a la suspensión obtenida en el punto anterior, agitar hasta observar un color amarillo traslúcido.

NOTA. Para realizar la curva de calibración del principio activo se siguen los puntos que se indican a continuación:

- Preparar Transfersomas vacíos (según el Procedimiento No. 4).
- Realizar los puntos 2 y 3 de este procedimiento a los Transfersomas del punto anterior.
- Agregar 300 μl de solución del principio activo en propanol al 50% a las siguientes concentraciones: 50, 100, 150, 200, 250 y 500 $\mu\text{g/ml}$; agitar hasta observar un color amarillo traslúcido. El blanco se prepara agregando 300 μl de propanol al 50%.

Procedimiento No. 12

Determinación cuantitativa de triglicina por electroforesis capilar con detección U.V directa [35, 36]

1. Colocar 100 μl del blanco, de los estándares para curva de calibración, o de la muestra en un vial del sistema de electroforesis capilar.

-
2. Agregar 300 μl de buffer de acetatos $\text{pH} = 2.17$ (0.5 M).
 3. Someter la muestra a análisis, programando el equipo de Electroforesis Capilar de la siguiente forma:
 - Enjuagar el capilar con Hidróxido de Sodio 1 M durante 8 minutos.
 - Enjuagar el capilar con Hidróxido de Sodio 0.1 M durante 3 minutos.
 - Enjuagar el capilar con agua desionizada durante 1 minuto.
 - Acondicionar el capilar durante 5 minutos con electrolito soporte (solución buffer de acetatos 0.5 M, $\text{pH} = 2.17$).
 - Inyectar la muestra durante 5 segundos a 0.5 psi de presión.
 - Aplicar 25 kV al sistema para separar los componentes de la muestra. Detectar la señal analítica a 205 nm.

V. RESULTADOS

❖ ADECUACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE PREPARACIÓN DE TRANSFERSOMAS

En la tabla 3 se presentan los resultados de tamaño de partícula obtenido con las diferentes combinaciones de los factores estudiados (Tiempo de Sonicación, Agente Tensoactivo, Tipo de Membrana y Número de Filtraciones)

Tabla 3. Tamaño de Partícula de las vesículas vacías preparadas variando el tiempo de sonicación, agente tensoactivo, tipo de membrana y número de filtraciones.

| COLATO DE SODIO | | | | | | | | | | |
|------------------------|-----------|--------|------------|--------|------------|--------|------------|--------|------------|--------|
| Tiempo de Sonicación | 5 minutos | | 10 minutos | | 15 minutos | | 20 minutos | | 25 minutos | |
| Número de Filtraciones | E* | P** | E* | P** | E* | P** | E* | P** | E* | P** |
| 1 | 79.70 | 178.20 | 84.10 | 213.40 | 293.00 | 247.80 | 236.40 | 204.30 | 81.00 | 240.40 |
| | 74.20 | 177.70 | 80.80 | 211.30 | 276.80 | 242.10 | 234.90 | 205.40 | 81.20 | 231.70 |
| | 76.00 | 175.70 | 82.00 | 217.30 | 266.90 | 265.20 | 266.10 | 218.20 | 84.20 | 240.70 |
| 2 | 70.40 | 148.80 | 78.70 | 239.60 | 249.80 | 233.00 | 243.20 | 201.50 | 73.40 | 214.90 |
| | 68.60 | 150.70 | 80.60 | 183.50 | 226.90 | 240.10 | 242.50 | 201.20 | 71.90 | 224.30 |
| 3 | 70.60 | 151.70 | 80.50 | 191.20 | 239.80 | 220.60 | 239.30 | 208.60 | 78.90 | 223.20 |
| | 67.90 | 153.60 | 77.40 | 181.20 | 218.00 | 220.00 | 220.20 | 202.00 | 63.90 | 228.40 |
| | 69.70 | 150.70 | 75.00 | 180.30 | 208.20 | 224.60 | 223.40 | 201.00 | 64.60 | 197.70 |
| | 74.00 | 143.60 | 77.00 | 175.60 | 216.70 | 206.40 | 247.50 | 197.10 | 62.20 | 246.50 |

| TWEEN 80 | | | | | | | | | | |
|------------------------|-----------|--------|------------|--------|------------|--------|------------|--------|------------|--------|
| Tiempo de Sonicación | 5 minutos | | 10 minutos | | 15 minutos | | 20 minutos | | 25 minutos | |
| Número de Filtraciones | E* | P** | E* | P** | E* | P** | E* | P** | E* | P** |
| 1 | 439.40 | 295.80 | 266.10 | 303.30 | 288.50 | 361.30 | 376.60 | 326.30 | 299.60 | 379.70 |
| | 423.90 | 307.20 | 269.20 | 281.70 | 298.30 | 338.70 | 360.20 | 327.40 | 282.10 | 413.30 |
| | 416.90 | 301.10 | 253.90 | 310.50 | 301.10 | 348.20 | 359.00 | 333.50 | 295.30 | 418.30 |
| 2 | 354.70 | 288.80 | 214.30 | 289.20 | 241.20 | 321.60 | 318.70 | 307.50 | 297.10 | 389.30 |
| | 353.00 | 273.30 | 214.50 | 286.70 | 251.70 | 347.30 | 318.70 | 293.30 | 303.30 | 378.50 |
| 3 | 354.80 | 268.70 | 217.40 | 329.40 | 233.30 | 328.30 | 321.40 | 285.40 | 300.40 | 372.40 |
| | 328.40 | 254.50 | 193.30 | 263.60 | 207.20 | 315.00 | 324.10 | 255.30 | 279.40 | 355.40 |
| | 333.40 | 263.20 | 197.90 | 274.00 | 203.00 | 326.00 | 317.00 | 249.80 | 275.70 | 366.50 |
| | 326.00 | 258.40 | 192.50 | 272.00 | 207.50 | 305.20 | 336.50 | 262.10 | 270.80 | 348.60 |

* E = Membranas de Ésteres mixtos de celulosa

** P = Membranas de Policarbonato

ANÁLISIS DE VARIANZA

Con los datos de la tabla 3 se realizó un Análisis de Varianza Univariado 5 X 2 X 2 X 3 (Tiempo de Sonicación X Agente Tensoactivo X Tipo de Membrana X Número de Filtraciones) utilizando el Software MSSD.

TABLA 4. Análisis de Varianza para el experimento factorial 5 X 2 X 2 X 3.

Variable Dependiente: Tamaño de Partícula (nm)

| Fuente de Variación | Suma de Cuadrados | Grados de Libertad | Cuadrado de las medias | F calculada | Valor crítico de F |
|---------------------|-------------------|--------------------|------------------------|-------------|--------------------|
| T | 127532.388 | 4 | 31883.097 | 329.134 | 2.45 |
| S | 774053.858 | 1 | 774053.858 | 7990.673 | 3.92 |
| M | 79851.097 | 1 | 79851.097 | 824.315 | 3.92 |
| F | 44720.467 | 2 | 22360.233 | 230.828 | 3.07 |
| T*S | 151286.028 | 4 | 37821.507 | 390.437 | 2.45 |
| T*M | 158630.761 | 4 | 39657.690 | 409.392 | 2.45 |
| S*M | 19522.918 | 1 | 19522.918 | 201.538 | 3.92 |
| T*S*M | 87562.250 | 4 | 21890.562 | 225.980 | 2.45 |
| T*F | 4491.894 | 8 | 561.487 | 5.796 | 2.02 |
| S*F | 7101.124 | 2 | 3550.562 | 36.653 | 3.07 |
| T*S*F | 2527.201 | 8 | 315.900 | 3.261 | 2.02 |
| M*F | 802.601 | 2 | 401.301 | 4.143 | 3.07 |
| T*M*F | 4556.929 | 8 | 569.616 | 5.880 | 2.02 |
| S*M*F | 1441.762 | 2 | 720.881 | 7.442 | 3.07 |
| T*S*M*F | 5161.679 | 8 | 645.210 | 6.661 | 2.02 |
| Error | 11624.360 | 120 | 96.870 | | |
| Total | 11744491.300 | 180 | | | |
| Total Corregido | 1480867.318 | 179 | | | |

T = Tiempo de Sonicación

S = Agente Tensoactivo (Surfactante)

M = Tipo de Membrana

F = Número de filtraciones

Interacción entre Variables

En la tabla 4 se observa que existe interacción entre todas las variables, siendo menor la del Tipo de Membrana y el Número de Filtraciones.

Dicha interacción significa que un cambio en cualquiera de los factores estudiados (tiempo de sonicación, agente tensoactivo, tipo de membrana y/o

número de filtraciones) conduce a la obtención de resultados diferentes, que no siguen una tendencia definida [37].

La diferencia entre las medias para los diferentes tiempos de sonicación y número de filtraciones se determinó a través de la Prueba de Tukey HSD, de *diferencia verdaderamente significativa*, (Tablas No. 7, 8, 9 y 10). Los diferentes tipos de membrana y de agente tensoactivo se analizaron mediante la prueba t de "Student" (Tablas No. 5 y 6).

Interacción entre tiempo de sonicación y agente tensoactivo

Como se mencionó anteriormente, los resultados obtenidos con los dos agentes tensoactivos empleados se compararon a través de la prueba t de "Student", en la tabla 5 se resumen los resultados de dicha comparación:

TABLA 5. Comparación de tamaño de partícula para las vesículas preparadas con dos agentes tensoactivos: Colato de Sodio y Tween 80 (Prueba t de "Student").

| TENSOACTIVO | | Media | Varianza |
|-----------------|--|--------|----------|
| Colato de Sodio | | 173.58 | 2964.91 |
| Tween 80 | | 304.37 | 968.23 |

| Coefficiente de correlación Pearson | de de | Grados de libertad | Estadístico t | P(T<=t) dos colas | Valor crítica de t (dos colas) |
|-------------------------------------|-------|--------------------|---------------|-------------------|--------------------------------|
| -0.10 | | 4.00 | -4.47 | 0.01 | 2.78 |

Con base a este análisis, se encuentra que existe diferencia significativa en el tamaño de las vesículas cuando se preparan con Tween 80 o Colato de Sodio como tensoactivo.

En la figura 6 se observa que al emplear Tween 80 el tamaño de las vesículas es mayor que con Colato de Sodio. De acuerdo a la desviación estándar calculada para cada tensoactivo, se presenta menor variación en el tamaño de partícula al emplear Tween 80 como tensoactivo. No se encuentra una tendencia bien definida en el tamaño de partícula al aumentar el tiempo de sonicación.

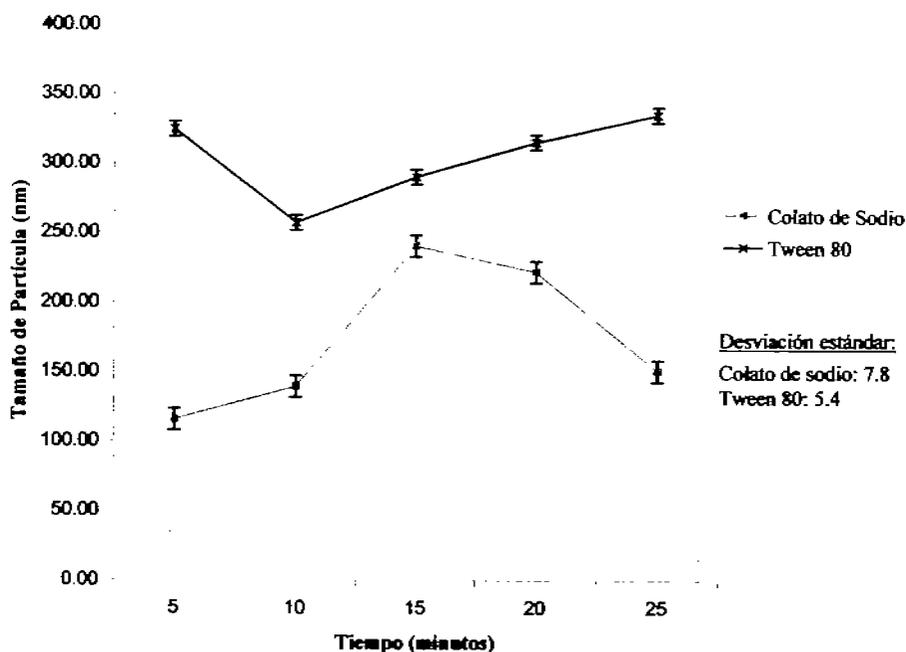


FIGURA 6.
 Gráfico de Tiempo de Sonicación vs. Agente Tensoactivo

Interacción entre tiempo de sonicación y tipo de membrana

En los resultados mostrados en la tabla 6 se encuentra que no existe diferencia significativa en el tamaño de partícula obtenido al filtrar las vesículas a través de membranas de policarbonato o a través de membranas de ésteres mixtos de celulosa. Sin embargo, en la figura No. 7 se puede observar que al filtrar las vesículas a través de membranas de policarbonato se obtiene menor variación de tamaño de partícula con respecto al tiempo de sonicación.

TABLA 6. Comparación de tamaño de partícula para las vesículas filtradas a través de dos tipos de membrana: Policarbonato y Ésteres mixtos de celulosa (Prueba t de "Student").

| MEMBRANA | Media | Varianza |
|---------------|--------|----------|
| Policarbonato | 259.92 | 1119.64 |
| Ésteres | 217.73 | 2852.26 |

| Coefficiente de correlación Pearson | de de | Grados de libertad | Estadístico t | P(T<=t) dos colas | Valor crítico de t (dos colas) |
|-------------------------------------|-------|--------------------|---------------|-------------------|--------------------------------|
| -0.12 | | 4.00 | 1.42 | 0.23 | 2.78 |

Al observar la figura 7, como se había mencionado, no se encuentra una tendencia bien definida en el tamaño de partícula al aumentar el tiempo de sonicación.

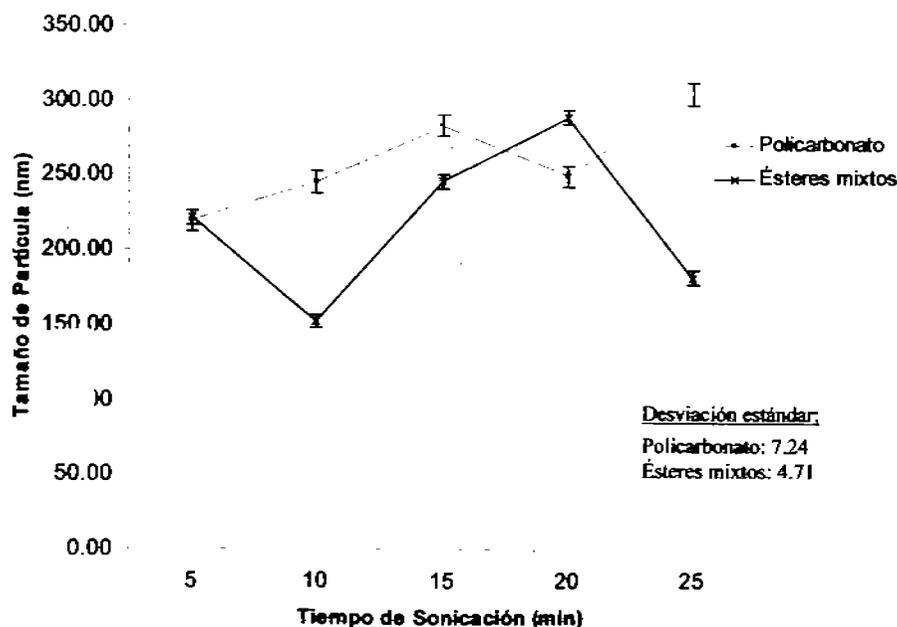


FIGURA 7.
Gráfico de Tiempo de Sonicación vs. Tipo de membrana

Interacción entre tiempo de sonicación y número de filtraciones

En el gráfico de la figura 8 se presenta una tendencia a disminuir el tamaño de partícula al aumentar el número de filtraciones.

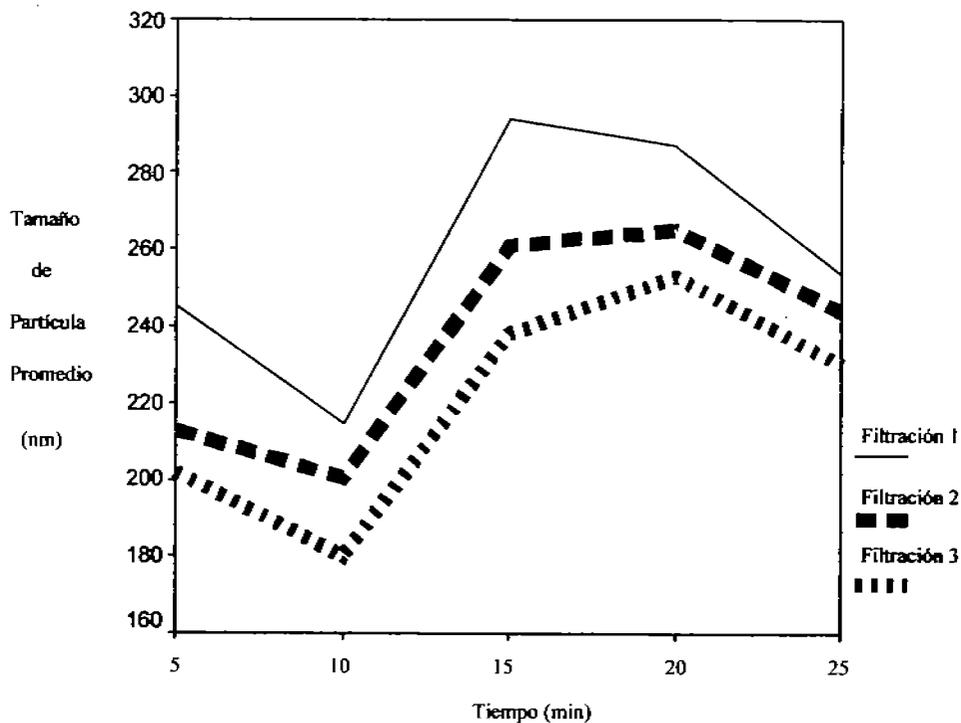


FIGURA 8.
Gráfico de Tiempo de Sonicación vs. Número de Filtraciones

Interacción entre agente tensoactivo y tipo de membrana

En la figura 9 se observa nuevamente que al emplear membranas de policarbonato y Tween 80 se obtienen vesículas de mayor tamaño de partícula.

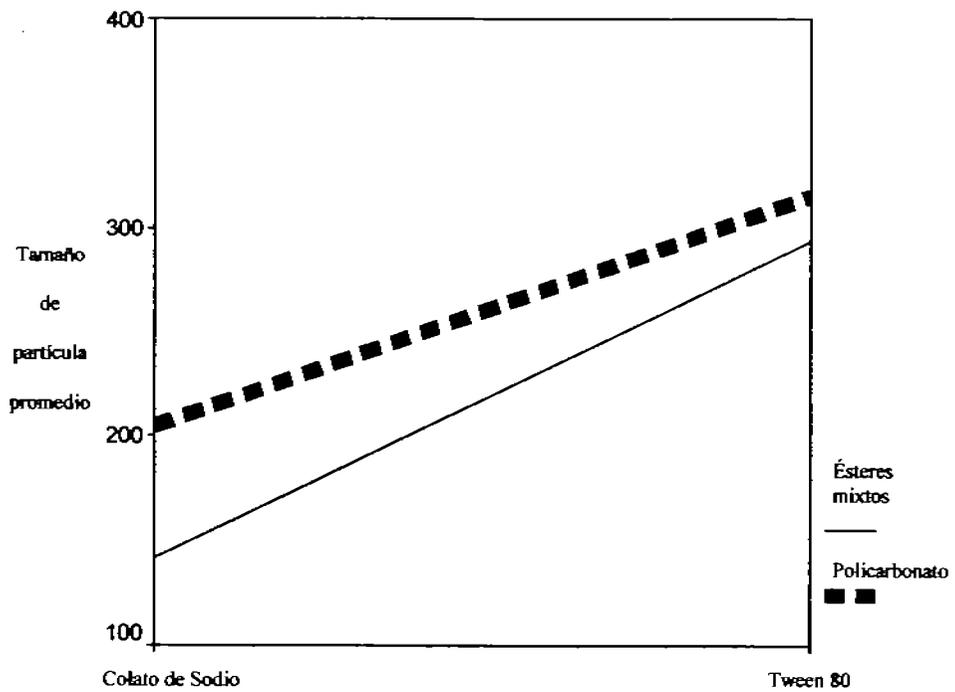


FIGURA 9.
Gráfico de Tensoactivo vs. Tipo de membrana

TIEMPO DE SONICACIÓN

Se estudiaron 5 tiempos de sonicación: 5, 10, 15, 20 y 25 minutos. Se realizó la comparación múltiple de medias a través de la prueba HSD de Tukey. A partir de ésta se encuentra que, con $\alpha = 0.05$, existen diferencias significativas al sonicar durante los diferentes tiempos estudiados, excepto entre los 15 y 20 minutos (Tabla 7). La prueba HSD de Tukey (Tabla 8) de comparación entre pares individuales de medias confirma lo anterior:

TABLA 7 Prueba HSD (*diferencia verdaderamente significativa*) de Tukey de comparaciones múltiples para los diferentes tiempos de sonicación estudiados.

Variable dependiente: Tamaño de Partícula
T = Tiempo de Sonicación

| Grupo de medias comparado | Diferencia de Medias | Error Estándar | Intervalo de Confianza al 95% | |
|---------------------------|----------------------|----------------|-------------------------------|-----------------|
| | | | Límite inferior | Límite superior |
| T1 T2 | 21.7861* | 2.3198 | 15.3608 | 28.2114 |
| | -44.3333* | 2.3198 | -50.7586 | -37.9080 |
| | -48.3972* | 2.3198 | -54.8225 | -41.9719 |
| | -22.5417* | 2.3198 | -28.9670 | -16.1164 |
| T2 T1 | -21.7861* | 2.3198 | -28.2114 | -15.3608 |
| | -66.1194* | 2.3198 | -72.5447 | -59.6942 |
| | -70.1833* | 2.3198 | -76.6086 | -63.7580 |
| | -44.3278* | 2.3198 | -50.7531 | -37.9025 |
| T3 T1 | 44.3333* | 2.3198 | 37.9080 | 50.7586 |
| | 66.1194* | 2.3198 | 59.6942 | 72.5447 |
| | -4.0639 | 2.3198 | -10.4892 | 2.3614 |
| | 21.7917* | 2.3198 | 15.3664 | 28.2170 |
| T4 T1 | 48.3972* | 2.3198 | 41.9719 | 54.8225 |
| | 70.1833* | 2.3198 | 63.7580 | 76.6086 |
| | 4.0639 | 2.3198 | -2.3614 | 10.4892 |
| | 25.8556* | 2.3198 | 19.4303 | 32.2808 |
| T5 T1 | 22.5417* | 2.3198 | 16.1164 | 28.9670 |
| | 44.3278* | 2.3198 | 37.9025 | 50.7531 |
| | -21.7917* | 2.3198 | -28.2170 | -15.3664 |
| | -25.8556* | 2.3198 | -32.2808 | -19.4303 |

T1 = 5 minutos

T2 = 10 minutos

T3 = 15 minutos

T4 = 20 minutos

T5 = 25 minutos

* NOTA: La diferencia de las medias es significativa a un nivel de 0.05.

TABLA 8 Prueba HSD de Tukey de comparación entre pares individuales de medias.

Subconjuntos Homogéneos

Prueba de Tukey HSD ($\alpha = 0.05$)

T = Tiempo de Sonicación

N = Número de datos

| T (min) | N | Subconjunto | | | |
|----------------------|----|-------------|----------|----------|----------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 10 | 36 | 198.3056 | | | |
| 5 | 36 | | 220.0917 | | |
| 25 | 36 | | | 242.6333 | |
| 15 | 36 | | | | 264.4250 |
| 20 | 36 | | | | 268.4889 |
| Significancia | | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 0.407 |

NOTA = La media armónica del tamaño de muestra es igual a 60.

Análisis basado en la Suma de Cuadrados de la tabla 4

El término error es el Cuadrado de las Medias del error = 96.870.

NÚMERO DE FILTRACIONES

Mediante la prueba HSD de Tukey de comparaciones múltiples (tabla 9) encontramos que existen diferencias significativas en el tamaño de partícula obtenido con diferente número de filtraciones. Como podemos observar en las tablas 9 y 10 a mayor número de filtraciones se obtuvo menor tamaño de partícula. A partir de la prueba HSD de Tukey de comparación entre pares individuales de medias (Tabla 10) encontramos que todas las medias obtenidas son significativamente diferentes.

TABLA 9 Prueba HSD (diferencia verdaderamente significativa) de Tukey de comparaciones múltiples para diferente número de filtraciones.

Variable dependiente: Tamaño de Partícula

F = Número de filtraciones

| Grupo de medias comparado | | Diferencia de Medias | Error Estándar | Intervalo de Confianza al 95% | |
|---------------------------|----|----------------------|----------------|-------------------------------|-----------------|
| | | | | Límite inferior | Límite superior |
| F1 | F2 | 22.3483* | 1.7969 | 18.0839 | 26.6128 |
| | F3 | 38.4400* | 1.7969 | 34.1756 | 42.7044 |
| F2 | F1 | -22.3483* | 1.7969 | -26.6128 | -18.0839 |
| | F3 | 16.0917* | 1.7969 | 11.8272 | 20.3561 |
| F3 | F1 | -38.4400* | 1.7969 | -42.7044 | -34.1756 |
| | F2 | -16.0917* | 1.7969 | -20.3561 | -11.8272 |

F1 = Primer filtración

F2 = Segunda filtración

F3 = Tercer filtración

* La diferencia de las medias es significativa a un nivel de 0.05.

Tabla 10. Prueba HSD de Tukey de comparación entre pares individuales de medias.

Subconjuntos Homogéneos

Prueba de Tukey HSD ($\alpha = 0.05$)

F = Número de Filtraciones

N = Número de datos

| F | N | Subconjunto | | |
|----------------------|----|-------------|----------|----------|
| | | 1 | 2 | 3 |
| 3 | 60 | 220.6117 | | |
| 2 | 60 | | 236.7033 | |
| 1 | 60 | | | 259.0517 |
| Significancia | | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

NOTA. La media armónica del tamaño de muestra es igual a 60.

Se muestran las medias por grupos en subconjuntos homogéneos.

Análisis basado en la Suma de Cuadrados de la tabla 4

El término error es el Cuadrado de las Medias del error = 96.870.

Resumiendo la información anterior, podemos decir que las condiciones óptimas de preparación para las vesículas Transfersómicas de este estudio fueron: Tween 80 como agente tensioactivo, 10 minutos de sonicación, membranas de policarbonato y 3 filtraciones.

❖ **INFLUENCIA DEL PESO MOLECULAR Y LA SOLUBILIDAD EN LA EFICIENCIA DE ATRAPAMIENTO DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS EN TRANSFERSOMAS**

Características de los Transfersomas cargados con glicina, fenilalanina y triglicina

En la tabla 11 y en la figura 10 se puede observar que, para los tres principios activos, las vesículas presentan menor tamaño cuando se filtran tres veces. Por otra parte, el menor tamaño de partícula se obtiene con las vesículas que contienen fenilalanina y el mayor tamaño con las vesículas que contienen triglicina.

Tabla 11. Tamaño de partícula promedio de las vesículas cargadas con los tres diferentes principios activos

| | GLICINA | FENILALANINA | TRIGLICINA |
|--------------|---------------|---------------|---------------|
| Filtración 1 | 638.40 ± 6.55 | 607.73 ± 5.90 | 701.27 ± 6.68 |
| Filtración 2 | 558.43 ± 6.55 | 519.40 ± 5.90 | 647.13 ± 6.68 |
| Filtración 3 | 523.87 ± 6.55 | 476.67 ± 5.90 | 597.67 ± 6.68 |

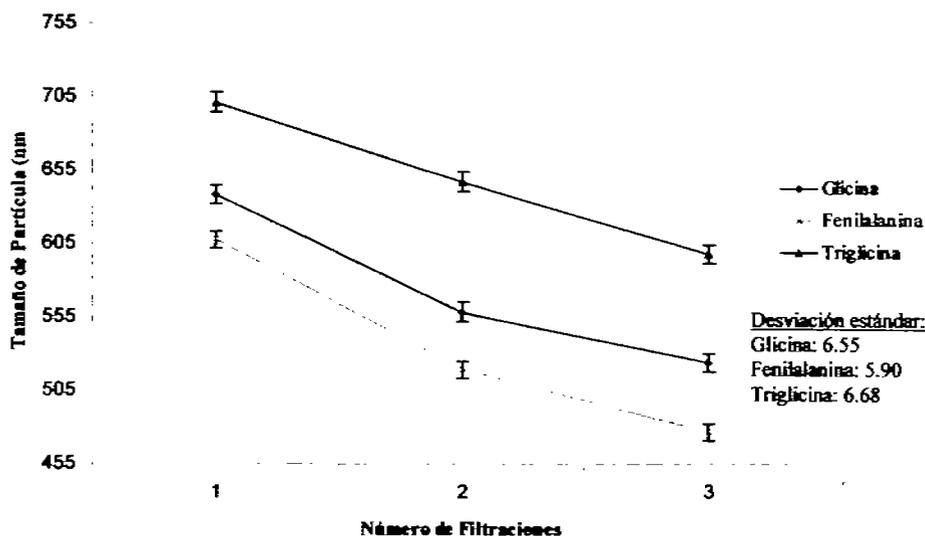


FIGURA 10.
Tamaño de partícula de las vesículas cargadas con los tres diferentes principios activos.

Se realizó un análisis de varianza a los datos de tamaño de partícula de las vesículas cargadas con los principios activos (Tabla 12). Los resultados indican que existe diferencia entre las medias. Mediante la Prueba de Tukey (Tabla 13), con $\alpha = 0.05$, se encontró que las tres medias son diferentes. Esto quiere decir que existe diferencia significativa en el tamaño de partícula obtenido al cargar los tres principios activos en las vesículas lipídicas.

TABLA 12. Análisis de varianza para el tamaño de partícula de las vesículas cargadas con los tres principios activos.

| GRUPOS | NÚMERO DE MUESTRAS | SUMA | PROMEDIO | VARIANZA |
|--------------|--------------------|--------|----------|----------|
| Glicina | 3 | 1571.6 | 523.87 | 38.83 |
| Fenilalanina | 3 | 1430 | 476.67 | 62.63 |
| Triglicina | 3 | 1793 | 597.67 | 142.49 |

Análisis de Varianza

| Fuente de variación | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Cuadrados Medios | F | Probabilidad | Valor crítico para F |
|----------------------|-------------------|--------------------|------------------|--------|--------------|----------------------|
| Entre grupos | 22315.28 | 2 | 11157.64 | 137.22 | 9.7939E-06 | 5.14 |
| Dentro de los grupos | 487.88 | 6 | 81.31 | | | |
| Total | 22803.16 | 8 | | | | |

TABLA 13. Prueba de Tukey para comparar las medias de tamaño de partícula
Diferencia entre medias (Tamaño de Partícula)

| | Glicina | Fenilalanina | Triglicina |
|--------------|---------|--------------|------------|
| Glicina | — | 47.17 | 73.83 |
| Fenilalanina | 47.17 | — | 121 |
| Triglicina | 73.83 | 121 | — |

Valor de HSD (diferencia altamente significativa), contra el que se comparan todas las medias = 22.59. Criterio de éxito: cualquier diferencia que produzca un valor absoluto mayor al valor de HSD, se declarará como significativo. Por lo tanto, las tres medias son diferentes con $\alpha = 0.05$.

EFICIENCIA DE ATRAPAMIENTO DE LOS ACTIVOS EN LAS VESÍCULAS

A continuación se presenta la determinación del porcentaje de fármaco atrapado en las vesículas lipídicas:

• GLICINA (Cuantificación por Espectrofotometría UV)

Ecuación de Regresión para la curva de calibración:

$$y = 2.3977 \times 10^{-3} + 2.49 \times 10^{-3} x$$

Absorbancia de la solución estándar de glicina (concentración = 2 mg/ml) que pasó a través de Sephadex G10:

| |
|------------|
| 0.1640 |
| 0.1703 |
| 0.1608 |
| x = 0.1650 |

Absorbancia de la muestra de Transfersomas cargados con glicina que pasó a través de Columna de Sephadex G10:

| |
|------------|
| 0.4657 |
| 0.4612 |
| 0.4720 |
| x = 0.4663 |

Porcentaje de fármaco atrapado en las vesículas

Absorbancia debida a la muestra

$$0.4663 - 0.1650 = 0.3013$$

$$y = 0.3013$$

Ecuación de Regresión:

$$y = 2.3977 \times 10^{-3} + 2.49 \times 10^{-3} x$$

$$x = 120.037 \text{ mcg/ml}$$

$$\frac{120.037 \text{ mcg}}{\text{ml}} \times \frac{5 \text{ ml}}{0.5 \text{ ml}} = \frac{1200.37 \text{ mcg}}{\text{ml}}$$

$$\frac{1200.37 \text{ mcg/ml}}{2000.00 \text{ mcg/ml}} \times 100 = 60.0185 \%$$

• **FENILALANINA (Cuantificación por Espectrofotometría UV)**

Ecuación de regresión para la curva de calibración:

$$y = 0.0102 + 1.6571 \times 10^{-3} x$$

Absorbancia de la solución estándar de fenilalanina (concentración = 2 mg/ml) que pasó a través de la Columna de Sephadex G10:

| |
|------------|
| 0.0012 |
| 0.0010 |
| 0.0013 |
| x = 0.0012 |

Absorbancia de la muestra de Transfersomas cargados con fenilalanina que pasó a través de la Columna de Sephadex G-10:

| |
|------------|
| 0.1035 |
| 0.1044 |
| 0.1040 |
| x = 0.1040 |

Porcentaje de fármaco atrapado en las vesículas

Absorbancia debida a la muestra

$$0.1040 - 0.0012 = 0.1028$$

$$y = 0.1028$$

Ecuación de Regresión

$$y = 0.0102 + 1.6571 \times 10^{-3} x$$

$$x = 55.9011 \text{ mcmolar}$$

$$\frac{55.9011 \text{ mcmol}}{1000 \text{ ml}} \times 10 \text{ ml} = \frac{0.55901 \text{ mcmol}}{\text{ml}}$$

$$\frac{0.55901 \text{ mcmol}}{2 \text{ ml}} \times \frac{4.1 \text{ ml}}{0.1 \text{ ml}} = \frac{11.4597 \text{ mcmol}}{\text{ml}}$$

$$\frac{11.1597 \text{ mcmol}}{\text{ml}} \times \frac{165.19 \text{ mg}}{1 \text{ mcmol}} = 1893.0321 \text{ mg/ml}$$

$$\frac{1893.0321 \text{ mg/ml}}{2000.0000 \text{ mg/ml}} \times 100 = 94.65 \%$$

• **TRIGLICINA (Cuantificación por Electroforesis Capilar)**

Ecuación de Regresión

$$y = 668.79 + 42.23 x$$

Área bajo la curva de la solución estándar de triglicina (concentración = 2 mg/ml) que pasó a través de la columna de Sephadex G10:

| |
|----------|
| 1703 |
| 1705 |
| 1704 |
| x = 1704 |

Tiempo de Migración: 5.329 min

$L_{\text{eff}} = 50 \text{ cm}$

$L_{\text{total}} = 60 \text{ cm}$

Área bajo la curva de la muestra de Transfersomas cargados con triglicina que pasó a través de la columna de Sephadex G10:

| |
|------------|
| 6535 |
| 6087 |
| 6256 |
| x = 6292.7 |

Tiempo de Migración: 5.358 min, 5.458, 5.350.

$L_{\text{eff}} = 50 \text{ cm}$

$L_{\text{total}} = 60 \text{ cm}$

Porcentaje de fármaco atrapado en las vesículas:

Área bajo la curva debida a la muestra:

$$6293 - 1704 = 4589$$

$$y = 4589$$

Ecuación de Regresión

$$y = 668.79 + 42.23 x$$

$$x = 92.828 \text{ mcg/ml}$$

$$\frac{92.828 \text{ mcg} \times 0.4 \text{ ml} \times 0.8 \text{ ml}}{\text{ml} \quad 0.1 \text{ ml} \quad 0.3 \text{ ml}} = \frac{990.166 \text{ mcg}}{\text{ml}}$$

$$\frac{990.166 \text{ mcg/ml}}{2000.000 \text{ mcg/ml}} \times 100 = 49.51 \%$$

Al igual que con el tamaño de partícula, se realizó un análisis de varianza a los datos de eficiencia de atrapamiento de los activos en las vesículas (Tabla 14). Los resultados indican que existe diferencia entre las medias. Mediante la Prueba de Tukey (Tabla 15), con $\alpha = 0.05$, se encontró que las tres medias son significativamente diferentes. Esto quiere decir que la eficiencia de atrapamiento obtenida para los tres principios activos es significativamente diferente.

TABLA 14. Análisis de varianza para la eficiencia de atrapamiento de los principios activos estudiados en las vesículas Transfersómicas.

Análisis de Varianza de un Factor

| Grupos | Cuenta | Suma | Promedio | Varianza |
|--------------|--------|--------|----------|----------|
| Glicina | 3 | 180.05 | 60.02 | 1.19 |
| Fenilalanina | 3 | 282.47 | 94.16 | 1.69 |
| Triptócina | 3 | 148.51 | 49.50 | 8.14 |

Análisis de Varianza

| Fuente de variación | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Cuadrados Medios | F | Probabilidad | Valor crítico para F |
|----------------------|-------------------|--------------------|------------------|----------|--------------|----------------------|
| Entre grupos | 3269.99 | 2 | 1634.99 | 445.2722 | 2.9974E-07 | 5.1432 |
| Dentro de los grupos | 22.03 | 6 | 3.67 | | | |
| Total | 3292.02 | 8 | | | | |

TABLA 15. Prueba de Tukey para comparar las medias de eficiencia de atrapamiento.
Diferencia entre medias (Eficiencia de Atrapamiento)

| | Glicina | Fenilalanina | Triglicina |
|--------------|---------|--------------|------------|
| Glicina | --- | 34.14 | 10.52 |
| Fenilalanina | 34.14 | ---- | 44.66 |
| Triglicina | 10.52 | 44.66 | ----- |

Valor de HSD (diferencia altamente significativa), contra el que se comparan todas las medias = 4.80.
Criterio de éxito: cualquier diferencia que produzca un valor absoluto mayor al valor de HSD, se declarará como significativo. Por lo tanto, las tres medias son diferentes con $\alpha = 0.05$.

VI. DISCUSIÓN

❖ ADAPTACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE PREPARACIÓN DE TRANSFERSOMAS

Durante su pasaje a través de poros de menor tamaño, los Transfersomas transportan eficientemente materiales macromoleculares asociados a ellos. Siempre que se requiera, pueden volverse hasta 5 veces más deformables que cualquier otra vesícula lipídica usada comúnmente. La razón de esto es que sus componentes son elegidos de tal forma que las vesículas obtenidas sean capaces de adaptarse y cambiar de forma dependiendo del tamaño y forma de los poros [13].

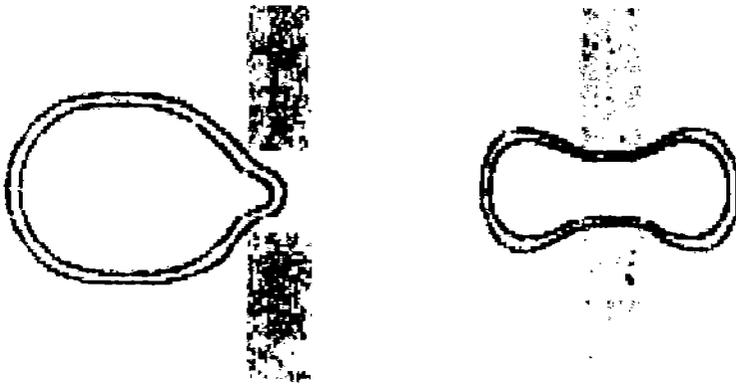


FIGURA 11.

Representación de un Transfersoma acercándose y pasando a través de un poro estrecho [13].

En las vesículas Transfersómicas, el agente tensoactivo tiende a acumularse en los sitios de mayor estrés. Los tensoactivos presentan una gran inclinación para formar estructuras curvadas (por ejemplo, las micelas); este arreglo disminuye el costo energético de la deformación de las vesículas, favoreciendo entonces su deformabilidad [14]. En consecuencia, los Transfersomas experimentan cambios de forma siempre que se requiere, cuando existe estrés en los alrededores o por confinamiento del espacio (figura 11) [13, 14]. Dependiendo de la aplicación para la que se destinen las vesículas lipídicas será el tensoactivo de elección. Generalmente se prefieren los tensoactivos no iónicos o aniónicos, debido a que generan menor toxicidad celular [16].

Por lo anterior, podría esperarse que por tratarse de vesículas deformables, la filtración (extrusión) repetida de las vesículas no tuviera efecto en su tamaño. Sin embargo, de acuerdo a lo reportado en la bibliografía, el tamaño de los Transfersomas antes y después de atravesar los poros es prácticamente el mismo a menos que dicho tamaño sea muy grande ($\geq 200-300$ nm). La razón de que las vesículas grandes se fragmenten durante la filtración no es que a un máximo tamaño de partícula dejen de ser deformables, es más bien que presentan una tendencia inherente a ser pequeñas (aproximadamente 100 nm) [14].

Las membranas de policarbonato tienen un tamaño de poro muy uniforme, razón por la cual se emplean para homogenizar el tamaño de partícula en todos los estudios realizados con vesículas lipídicas. Por el contrario, no se encuentra hasta la fecha información en la bibliografía acerca del comportamiento o propiedades de las vesículas lipídicas al filtrarlas a través de membranas de ésteres mixtos de celulosa.

Al sonicar una suspensión de vesículas lipídicas disminuye su tamaño de partícula, es por esto que dicho método se emplea comúnmente para su homogenización. De acuerdo a lo anterior, se esperaba que al aumentar el tiempo de sonicación disminuyera gradualmente el tamaño de partícula.

Sin embargo, experimentalmente se encontraron aumentos y disminuciones en dicho tamaño sin tendencia aparente (tabla 3 y figuras 6, 7 y 8, páginas 46, 49, 50 y 51). Además, se encontró que el tamaño de partícula se modifica de acuerdo al agente tensoactivo y tipo de Membrana empleados (figuras 6, 7 y 9, páginas 49, 50, 51 y 52).

Esto quiere decir que el tamaño de partícula no depende sólo de un factor, sino de la combinación de las condiciones empleadas para su preparación (agente tensoactivo, tipo de membrana y tiempo de sonicación, etc). Por lo tanto, para determinar las condiciones óptimas para la preparación de vesículas Transfersómicas será necesario tomar en cuenta los materiales con que se va a trabajar (tipo de membrana y tensoactivo), así como las características (tamaño de partícula, potencial zeta) que se quiera obtener.

El Magharaby et al [8] y Lee et al [16] en dos estudios independientes encontraron que, al emplear Tween 80 y Colato de Sodio como tensoactivos, se obtienen Transfersomas con mayor tamaño de partícula al emplear Tween 80. En el presente estudio se obtuvieron también vesículas de mayor tamaño al emplear dicho tensoactivo.

Para evaluar la morfología de las vesículas, se observaron las dispersiones Transfersómicas preparadas con Tween 80 y Colato de Sodio por microscopía de transmisión electrónica con tinción negativa (técnica de microscopía alternativa a la microscopía confocal láser), obteniéndose las imágenes que se muestran a continuación:

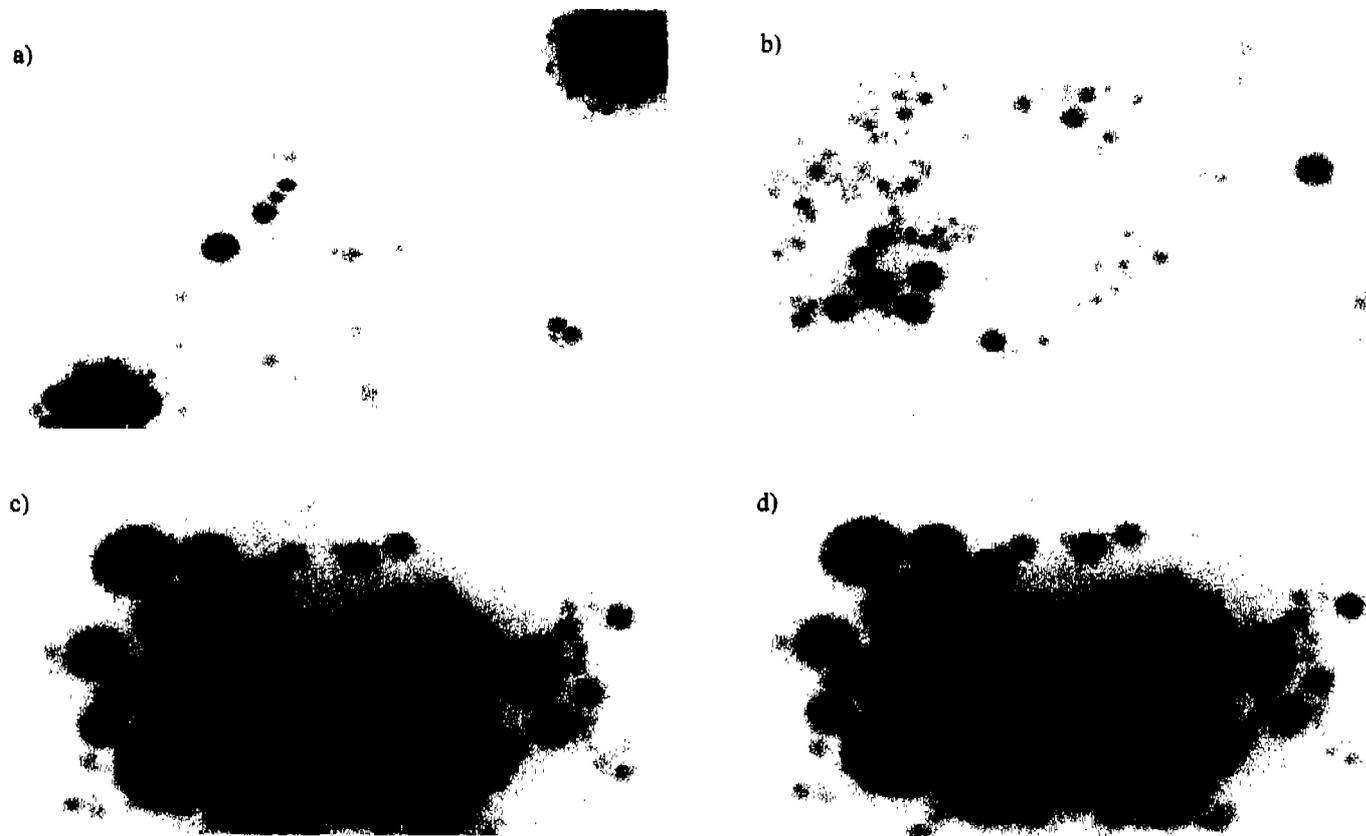


Figura 12.
Vesículas transférmicas visualizadas por medio de microscopía de transmisión electrónica con tinción negativa a 20,000x y preparadas bajo las siguientes condiciones: a) y b) Colato de Sodio, 10 minutos de sonicación, 3 filtraciones y membranas de policarbonato; c) y d) Tween 80, 10 minutos de sonicación, 3 filtraciones y membranas de policarbonato.

En la figura 12 se confirma la obtención de las vesículas lipídicas deseadas. Se puede observar que las vesículas preparadas con Tween 80 presentan mayor tamaño de partícula y que dicho tamaño es más homogéneo con respecto al obtenido con las vesículas preparadas con Colato de Sodio.

Para el propósito de este estudio y de acuerdo a los resultados obtenidos, las condiciones óptimas para preparar las vesículas se eligieron con base en lo siguiente:

- En general, el menor tamaño de partícula se obtiene al sonicar durante 10 minutos (figura 6).
- Se obtiene, también, el menor tamaño de partícula al filtrar tres veces (figura 8).
- Estadísticamente no existe diferencia al emplear membranas de policarbonato o de ésteres mixtos de celulosa. Sin embargo, se observa que se logra menor variación en el tamaño de partícula, con respecto al tiempo de sonicación, al emplear membranas de policarbonato (figura 7).
- El método analítico empleado para la cuantificación de triglicina (Electroforesis Capilar) [35,36] no contempla la presencia de otros iones en la muestra analítica. Según un estudio realizado por Lee et al [16], los tensoactivos influyen el valor de potencial zeta de las vesículas. De acuerdo a lo anterior, se eligió al Tween 80 para la preparación de Transfersomas en este estudio por ser un compuesto no iónico, para evitar la interferencia de los iones del tensoactivo en la cuantificación de triglicina. Otra ventaja de emplear Tween 80 como tensoactivo es que retrasa la degradación de las vesículas lipídicas debido a estabilización estérica, gracias a esto mantiene estable su tamaño de partícula durante, al menos, 28 días [16].

❖ INFLUENCIA DEL PESO MOLECULAR Y LA SOLUBILIDAD EN LA EFICIENCIA DE ATRAPAMIENTO DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS EN TRANSFERSOMAS

Al observar el tamaño de las vesículas obtenidas (tablas 3 y 5) encontramos que al cargar los diferentes principios activos aumenta el tamaño de partícula con respecto al tamaño de las vesículas vacías. Esto concuerda con la información reportada en la bibliografía [16] y puede deberse a que el volumen ocupado por el activo incluido en la fase acuosa incrementa su tamaño.

En resumen, tenemos que las características de las vesículas cargadas con los principios activos son las siguientes:

Tabla 16. Características de los Transfersomas con los principios activos encapsulados

| PRINCIPIO ACTIVO | PESO MOLECULAR (g/mol) | SOLUBILIDAD EN AGUA (g/ml) | TAMAÑO DE PARTÍCULA (nm) | EFICIENCIA DE ATRAPAMIENTO |
|------------------|------------------------|----------------------------|--------------------------|----------------------------|
| Glicina | 75 | 0.25000 | 523.87 | 60.0185 % |
| Fenilalanina | 165.19 | 0.02960 | 476.67 | 94.650 % |
| Triglicina | 191.14 | 0.00128 | 597.67 | 49.510 % |

Por lo mencionado anteriormente, se esperaba que el tamaño de las vesículas aumentara al aumentar el peso molecular del activo encapsulado. Sin embargo, en las figuras 10 y 13 se observa que el tamaño de partícula de las vesículas cargadas con fenilalanina (activo de peso molecular "intermedio") es el menor de los tres.

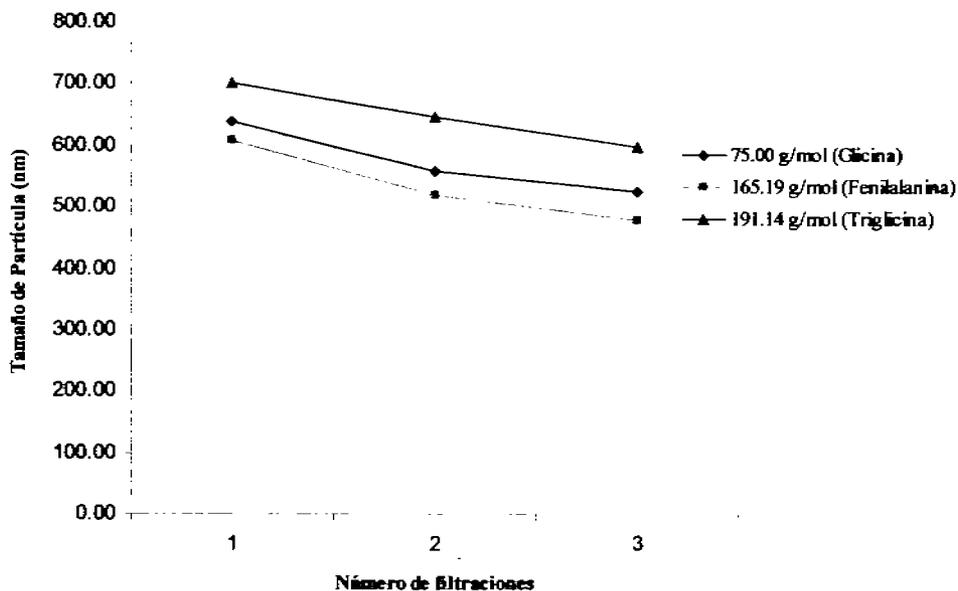


Figura 13. Comparación de tamaño de partícula de las vesículas con principio activo encapsulado con respecto al número de filtraciones. Tendencia del tamaño de partícula al variar el peso molecular del activo.

A la fecha, se han encapsulado en vesículas Transfersómicas activos como diclofenaco, estradiol, triamcinolona, inulina, péptidos y proteínas; todos ellos con una alta eficiencia de atrapamiento ($\geq 90\%$), excepto la inulina [4, 5, 8, 9, 14]. El peso molecular de dichos activos varía desde cientos hasta miles de Daltons, sin haber una tendencia aparente en la eficiencia de atrapamiento según el peso molecular. No se ha reportado información en la bibliografía sobre la influencia que tiene el peso molecular en la eficiencia de atrapamiento de los fármacos.

Se esperaba obtener una mayor eficiencia de atrapamiento en las vesículas cargadas con glicina, debido a su menor peso molecular, al pequeño tamaño de su molécula y a la técnica de preparación empleada.

Sin embargo, esto no ocurrió así puesto que, con base en la tabla 16 y la figura 14, el principio activo con mayor eficiencia de atrapamiento fue fenilalanina. Por lo tanto, la información obtenida en este estudio no es suficiente para demostrar la existencia de una relación entre el peso molecular de los activos y su eficiencia de atrapamiento.

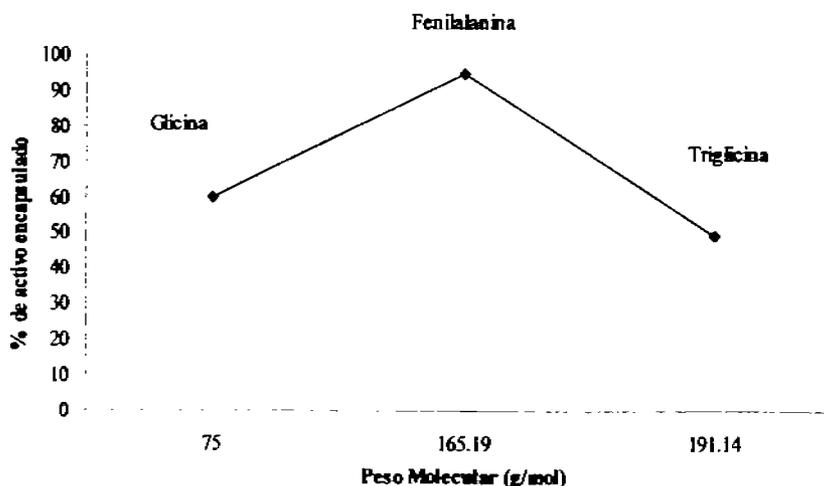
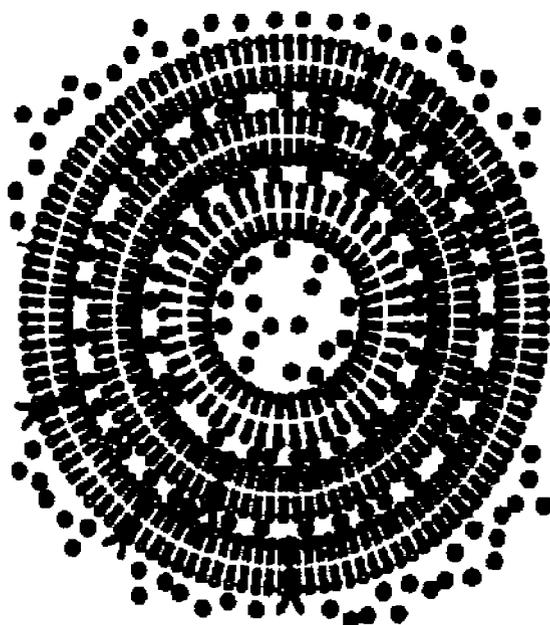


Figura 14.
Porcentaje de activo encapsulado con respecto a su peso molecular

De acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas, el mayor atrapamiento obtenido para fenilalanina se debe a que se trata de una molécula anfifílica, que presenta afinidad tanto por la fase acuosa como por la fase lipídica, ocurriendo una partición del activo entre ambas fases, de tal forma que, al hidratar la película lipídica parte del principio activo agregado se reparte en el núcleo acuoso de las vesículas y otra parte se reparte en la bicapa lipídica de las vesículas.

De los tres principios activos estudiados, fenilalanina es la que presenta el $K_{O/W}$ más alto (tabla 2), por lo tanto, es la molécula que presenta mayor afinidad por la fase lipídica. Lo anterior puede servir para explicar por qué el tamaño de partícula de las vesículas cargadas con fenilalanina es el menor de los tres (tablas 12 y 13, figura 13). Es probable que al acomodarse la molécula dentro de la bicapa lipídica, el núcleo acuoso dentro de las vesículas ocupe un menor volumen, lo que provoca un menor tamaño de partícula sin disminuir la eficiencia de atrapamiento del activo.

En el caso de glicina y triglicina, el tamaño de las vesículas cargadas con el último activo es mayor (tablas 12 y 13, figura 13), lo cual puede deberse a su mayor peso molecular con respecto a glicina. La eficiencia de atrapamiento de glicina es un poco mayor que para triglicina (figura 14), esto puede también relacionarse con su tamaño molecular, pues al ser una molécula más pequeña y más hidrofílica, permanece asociada con mayor fuerza a la fase acuosa, por lo que se atrapa en mayor proporción. La siguiente figura ilustra lo mencionado anteriormente:



- Y Moléculas solubles en agua con la parte hidrofóbica penetrando la fase lipídica.
- | Moléculas solubles en lípidos.
- Moléculas solubles en agua.

Figura 15.

Representación de una vesícula lipídica de tres bicapas en la que la carga de la superficie puede ser positiva, negativa o neutra. Las sustancias hidrosolubles se sitúan en los compartimientos acuosos de la vesícula y las sustancias liposolubles en las propia bicapas lipídicas. Ciertas macromoléculas pueden insertarse en las bicapas orientando la parte hidrófila hacia el agua [39]

Hasta la fecha, no se encuentra información en la bibliografía acerca de la influencia de la solubilidad de los activos en el tamaño de partícula de las vesículas cargadas [4, 5, 6, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15]. En este caso, no se encontró una tendencia o una relación definida entre la solubilidad y el tamaño de partícula. Esto se muestra en la siguiente figura:

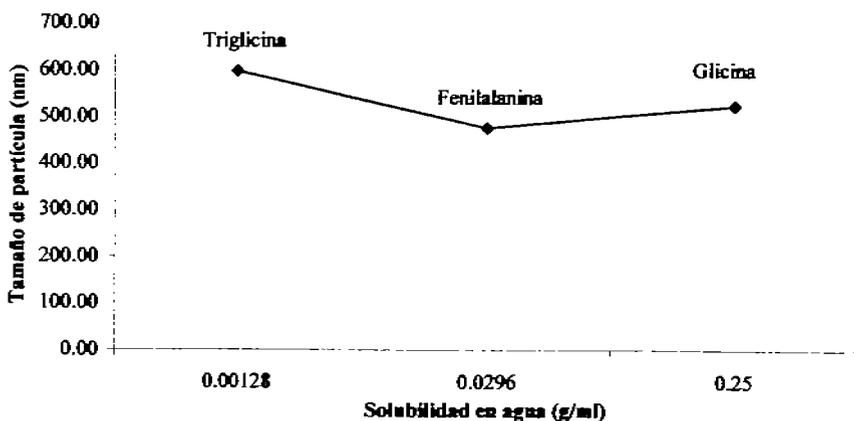


Figura 16. Tamaño de partícula de las vesículas con respecto a la solubilidad de los principios activos estudiados

De acuerdo a la figura 16, el menor tamaño de partícula se obtuvo con el principio activo de solubilidad "intermedia" y el mayor tamaño de partícula se obtuvo con el activo de menor solubilidad.

Como en el caso del peso molecular, no se ha reportado hasta la fecha información sobre la influencia de la solubilidad en la eficiencia de atrapamiento de los principios activos en las vesículas lipídicas.

En la figura 17 se observa que el activo que se atrapó en mayor proporción fue el de solubilidad intermedia (en este caso, fenilalanina) ya que, al tratarse de una molécula anfifílica, se puede repartir entre ambas fases en las vesículas. De los dos activos restantes se logra atrapar mayor proporción de glicina con respecto a triglicina debido a que la primera es más hidrosoluble, repartiéndose en la fase acuosa de las vesículas.

El menor porcentaje de activo atrapado se obtiene con triglicina debido a que además de ser poco soluble en agua, no es lo suficientemente hidrofóbica (tabla 2) como para presentar interacciones de dicha naturaleza con la bicapa lipídica de los Transfersomas [38].

De acuerdo a los resultados obtenidos, el activo que se atrapó con mayor eficiencia no fue el de mayor o menor solubilidad en agua, sino el de mayor afinidad por las vesículas lipídicas. Esto último va de acuerdo con lo reportado en la gran mayoría de las referencias consultadas, en las que se menciona que la eficiencia de atrapamiento de los fármacos depende de la afinidad del fármaco por las vesículas [14] y de la técnica de preparación de las mismas [39, 40, 41].

La técnica empleada para cargar los principios activos en las vesículas fue la misma, por lo tanto, se puede decir que en este caso la afinidad de los activos estudiados por las vesículas definió su eficiencia de atrapamiento.

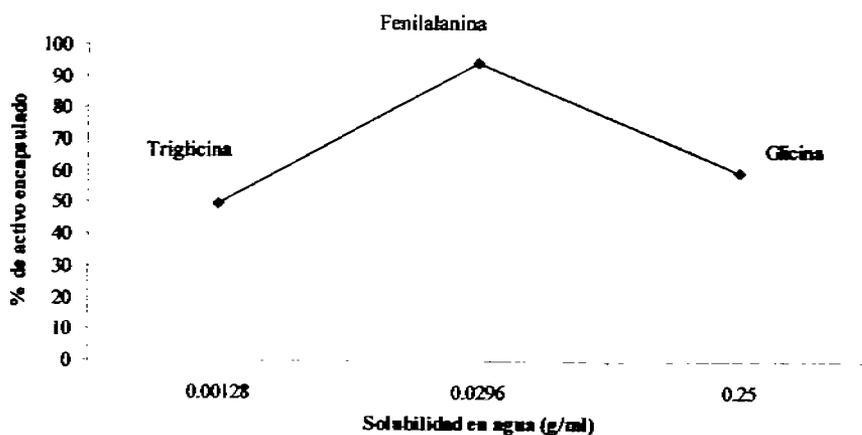


FIGURA 17.
Porcentaje de activo encapsulado con respecto a su solubilidad en agua

VII. CONCLUSIONES

Con base a los resultados obtenidos (mayor porcentaje de encapsulamiento para fenilalanina, que es un compuesto anfifílico) y a la información bibliográfica consultada, se concluye que en este estudio la eficiencia de encapsulamiento fue debida a la afinidad de los activos por las vesículas lipídicas, y no al peso molecular ni a la solubilidad.

Se logró estandarizar la técnica de preparación de Transfersomas, siendo las condiciones óptimas de preparación: 10 minutos de sonicación, Tween 80 como agente tensoactivo, número de filtraciones: tres y empleo de membranas de policarbonato.

Los sistemas Transfersómicos fueron caracterizados midiendo su tamaño de partícula mediante la técnica de dispersión dinámica de luz. El tamaño de partícula promedio obtenido fue de 300 nm para Transfersomas vacíos, 574 nm para Transfersomas con glicina, 535 nm para Transfersomas con fenilalanina y 649 nm para Transfersomas con triglicina. Se logró observar a las vesículas por microscopía de transmisión electrónica con tinción negativa, encontrando partículas de forma esférica con una membrana bien delimitada.

Se logró encapsular de manera adecuada a los tres principios activos hidrosolubles modelo en las vesículas Transfersómicas empleando la técnica estandarizada de preparación. Los porcentajes de principio activo encapsulado obtenidos fueron: 49.51 para Triglicina, 60.0185 para Glicina y 94.650 para Fenilalanina.

VIII. ANEXO

CURVAS DE CALIBRACIÓN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS

En las tablas 17, 18 y 19, así como en las figuras 18, 19 y 20 se presentan las curvas de calibración realizadas para la cuantificación de los principios activos.

TABLA 17. Curva de Calibración de Glicina en propanol al 50%.
Técnica analítica: Espectrofotometría UV

| Concentración (mcg/ml) | Absorbancia | Concentración (mg/ml) | Absorbancia | Concentración (mg/ml) | Absorbancia |
|---------------------------|-------------|--------------------------|-------------|--------------------------|-------------|
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 100 | 0.2473 | 100 | 0.2316 | 100 | 0.2504 |
| 200 | 0.5117 | 200 | 0.5236 | 200 | 0.4596 |
| 300 | 0.7120 | 300 | 0.7709 | 300 | 0.7524 |
| 400 | 1.0202 | 400 | 1.0138 | 400 | 1.0865 |
| 500 | 1.2043 | 500 | 1.2264 | 500 | 1.2501 |
| 600 | 1.5157 | 600 | 1.4737 | 600 | 1.4805 |

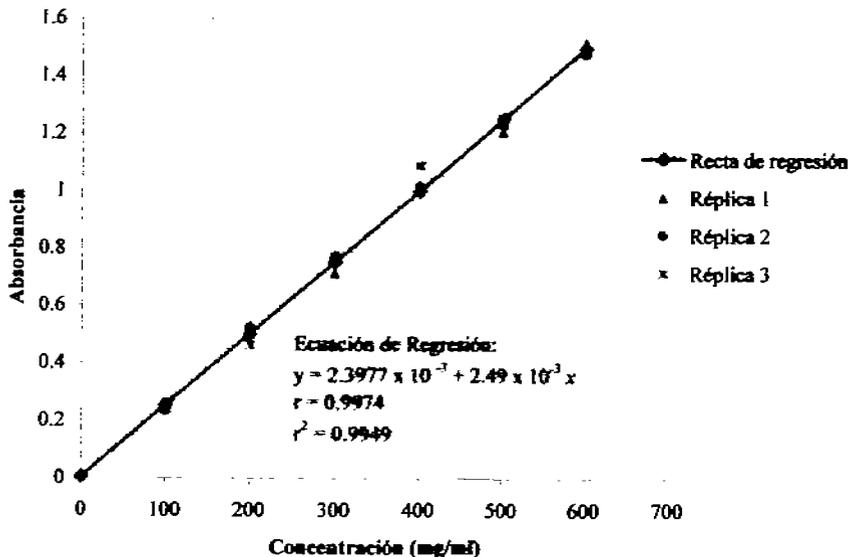


FIGURA 18.
Curva de Calibración de Glicina en Propanol al 50%

TABLA 18. Curva de Calibración de Fenilalanina en propanol al 50%.
Técnica analítica: Espectrofotometría UV

| Concentración μM | Absorbancia | Absorbancia | Absorbancia |
|--------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| 0 | 0 | 0 | 0 |
| 50 | 0.0840 | 0.0839 | 0.0832 |
| 100 | 0.1725 | 0.1706 | 0.1719 |
| 200 | 0.3489 | 0.3522 | 0.3490 |
| 300 | 0.5218 | 0.5245 | 0.5220 |
| 400 | 0.6742 | 0.6760 | 0.6762 |
| 500 | 0.8250 | 0.8259 | 0.8266 |

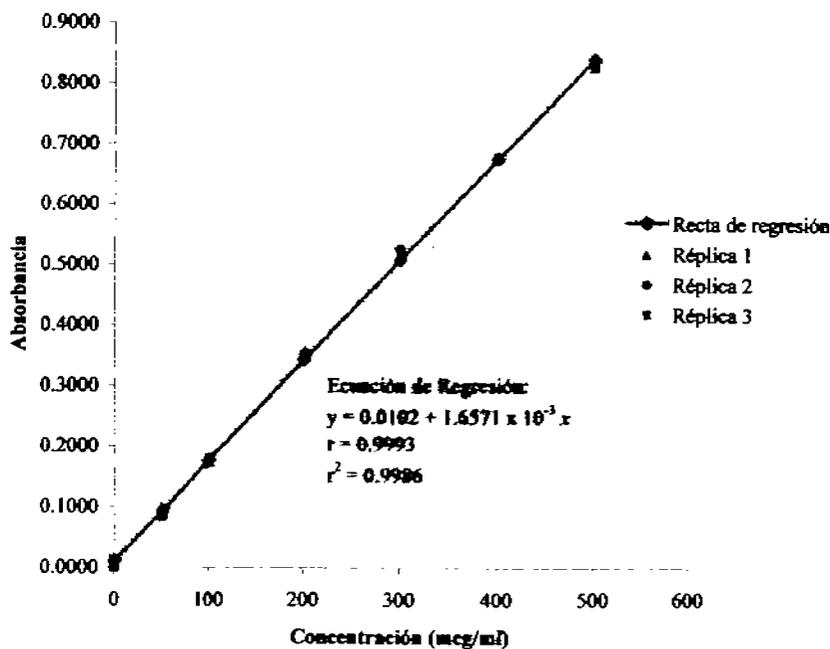


FIGURA 19.
Curva de Calibración de Fenilalanina en Propanol al 50%

TABLA 19. Curva de Calibración de Triglicina en propanol al 50%. Técnica analítica: Electroforesis Capilar

| Concentración mcg/ml | ABC1 | ABC2 | ABC3 |
|-------------------------|-------|-------|-------|
| 0 | 0 | 0 | 0 |
| 50 | 2131 | 2154 | 2225 |
| 100 | 4719 | 4740 | 4810 |
| 150 | 7405 | 7380 | 7355 |
| 200 | 9471 | 9487 | 9423 |
| 250 | 11581 | 11600 | 11620 |
| 500 | 20857 | 20854 | 22592 |

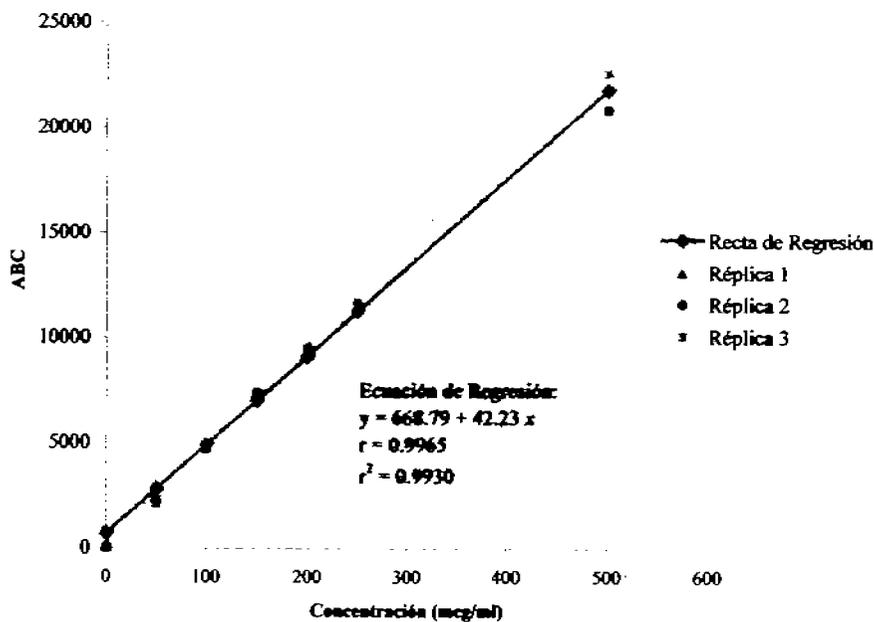


FIGURA 20.
Curva de Calibración de Triglicina en Propanol al 50%

IX. REFERENCIAS

1. FOLDVARI, Marianna. Non-invasive administration of drugs through the skin: challenges in delivery system design. Pharmaceutical Science and Technology Today. Vol. 3, No. 12. pp. 417-425, 2000.
2. ROLLAND, Alain. Pharmaceutical Particulate Carriers. DRUGS AND THE PHARMACEUTICAL SCIENCES Vol. 61. Marcel Dekker. U.S.A, 1993. pp.367-379.
3. WALTERS, Kenneth A. Dermatological and Transdermal Formulations. DRUGS AND THE PHARMACEUTICAL SCIENCES Vol. 119. Marcel Dekker. U.S.A, 2002. pp. 1-12.
4. CEVC, Gregor; BLUME Gabriele. New, highly efficient formulation of diclofenac for the topical, transdermal administration in ultradeformable drug carriers, Transfersomes. Biochimica et Biophysica Acta. Vol. 1514, 2001. pp. 191-205.
5. PAUL, A; CEVC, G; BACHHAWAT B.K. Transdermal immunisation with an integral membrane component, gap junction protein, by means of ultradeformable drug carriers, Transfersomes. Vaccine, Vol 16. No. 2/3, pp. 188-195, 1998.
6. ESSA, Ebtessam BONNER, Michael; BARRY, Brian. Electroporation and ultradeformable liposomes; human skin barrier repair by phospholipid. Journal of Controlled Release. Vol. 92, 2003. pp. 163 - 172.
7. <http://www.idea-ag.de/web/en/faq/index-transfersome.html>.
8. EL MAGHRABY, G et. al. Oestradiol skin delivery from ultradeformable liposomes: refinement of surfactant concentration. International Journal of Pharmaceutics. Vol. 196. 2000. pp. 63-74.

-
9. CEVC, Gregor et. al. Ultraflexible vesicles, Transfersomes, have an extremely low pore penetration resistance and transport therapeutic amounts of insulin across the intact mammalian skin. Biochimica et Biophysica Acta. Vol. 1368. 1998. pp. 201-215.
 10. ESSA, Ebtessam et. al. Iontophoretic estradiol skin delivery and tritium exchange in ultradeformable liposomes. International Journal of Pharmaceutics. Vol. 240, 2002. pp. 55-66.
 11. TAO, L. Skin delivery from lipid vesicles. Cosmetics and Toiletries. Vol. 115. No. 4. 2000. pp. 43-50.
 12. KIM, Adele et. al. In vitro and in vivo transfection efficiency of a novel ultradeformable cationic liposome. Biomaterials. Vol. 25, 2004. pp: 305-313.
 13. CEVC, Gregor et. al. Ultradeformable lipid vesicles can penetrate the skin and other semi-permeable barriers unfragmented. Evidence from double label CLSM experiments and direct size measurements. Biochimica et Biophysica Acta. Vol. 1564, (2002). pp: 21-30.
 14. CEVC, Gregor; SCHÄTZLEIN, Andreas; BLUME, Gabriele. Transdermal drug carriers: Basic properties, optimization and transfer efficiency in the case of epicutaneously applied peptides. Journal of Controlled Release, Vol. 36, 1995. pp: 3-16.
 15. CEVC, Gregor; BLUME, G. Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. Biochimica et Biophysica Acta. Vol. 1104, 1992. pp. 226-232.
 16. LEE, E.H et. al. Effect of edge activators on the formation and transfection efficiency of ultradeformable liposomes. Biomaterials. Vol 26, 2004. pp: 205-210.

-
17. VERMA, D et. al. Liposomes increase skin penetration of entrapped and non-entrapped hydrophilic substances into human skin: a skin penetration and confocal laser scanning microscopy study. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. Vol. 55, 2003. pp. 271-277.
 18. M. Castillo. Principios y fundamentos de Electroforesis Capilar. TESIS. FES Cuautitlán, UNAM. México, 2000. pp 5,15-22.
 19. <http://www.ama-assn.org/ama1/pub/upload/images/446/skinatlas.gif>. Marzo 31, 2005.
 20. SKOOG, Douglas. Análisis Instrumental. 4ª ed. Mc Graw Hill. España, 1994. pp. 785-787
 21. FORET, Bocek. Capillary zone electrophoresis. Ed. VCH. Alemania, 1998. pp.135-186;
 22. HEIGER, David. High Performance Capillary Electrophoresis. 3ª ed. Hewlett Packard Company. France, 1997. pp. 13-18, 44, 45, 77-108
 23. RIVERA, María. Electroforesis Capilar, una nueva herramienta para la química analítica. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. México, 1996. pp. 3, 4,12-13.
 24. http://www.ce.vt.edu/program_areas/environmental/teach/smprimer/icpms/icpms.html, Marzo 14, 2003.
 25. <http://www.relaq.mx/RLO/tutoriales/cromatografia/croma1/html>, Marzo 12, 2003.
 26. <http://www.ceandec.com/> Marzo 12,200.3
 27. CLAESSENS, H; BILLIET, H. Capillary Electro separation methods. Delft University of Technology. USA, 1995. Pp16.
 28. OLIVERA, A. Caracterización y cuantificación de compuestos de Selenio en una levadura enriquecida mediante Electroforesis Capilar. TESIS. FES Cuautitlán, UNAM. México, 2004. pp 5,15-22.

-
29. WESTON, Andrea. HPLC AND CE PRINCIPLES AND PRACTICE. Academic Press. London, England. 1997. pp. 154-183.
30. HARRIS, Daniel. Análisis químico cuantitativo. 2ª ed. Reverté. España, 2001. pp: 499 - 509.
31. THE MERCK INDEX AND ENCYCLOPEDIA OF CHEMICAL AND DRUGS. 11th ed. MERCK, U.S.A. pp: 765, 1131, 1253.
32. ADIBI, Siamak et al. Evidence for two different modes of tripeptide disappearance in human intestine. Journal of Clinical Investigation. Vol 56, 1975. pp: 1355-1363.
33. <http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>
34. LYNCH, M.J. Métodos de Laboratorio Vol.1. 2ª edición. Nueva Editorial Interamericana. México, D.F. 1997.
35. KASICKA, Vaclav, et. al. External electric field control of electroosmotic flow in non-coated and coated fused-silica capillaries and its application for capillary electrophoretic separations of peptides. Journal of Chromatography B. Vol. 741, 2000. pp. 43-54.
36. KASICKA, Vaclav, et. al. Capillary electrophoresis device with double UV detection and its application to the determination of effective mobilities of peptides. Journal of Chromatography A. Vol. 709, 1995. pp. 31-38.
37. DANIEL, Wayne. Bioestadística. 4ª ed. Limusa. México, 2002. pp. 295-317, 384.
38. [Appendix] <http://www.ub.rug.nl/eldoc/dis/science/e.streefland/append.pdf>
Septiembre 29, 2004.

-
39. MOLINA, F. Master Internacional en Formas Farmacéuticas Liposomales. Unidad 10: Procedimientos de Encapsulación. Universidad de Valencia. España, 2000. pp 23.
40. OSTRO, Marc. Liposomes: from biophysics to therapeutics. Marcel Dekker. USA, 1987. pp: 57.
41. W. Mehenert, K. Mäder, Solid lipid nanoparticles, characterization and applications, Adv. Drug Delivery Reviews. Vol. 47, 2001. pp: 165-196.
42. DOMENECH, José. Biofarmacia y Farmacocinética Vol. II. Ed. Síntesis, España
43. ROVESSAC, Francis; ROVESSAC, Annick. Chemical analysis. John Wiley and Sons. Great Britain, 2000. pp: 111-117.