



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**APLICACIÓN DE UN DISEÑO EXPERIMENTAL PARA EL
DESARROLLO DE LA FORMULACIÓN DE UNA EMULSIÓN
PARA TRATAMIENTO DE HERIDAS CUTÁNEAS INFECTADAS**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

ANGELICA MARIA CHAVARRIA AMEZCUA



CIUDAD DE MÉXICO, 2020



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: MIRANDA CALDERON JORGE ESTEBAN

VOCAL: Profesor: JUAREZ OSORNIO CARLOS

SECRETARIO: Profesor: MELGOZA CONTRERAS LUZ MARIA

1er. SUPLENTE: Profesor: BERNAL CHAVEZ SERGIO ALBERTO

2° SUPLENTE: Profesor: LOPEZ GARCIA MARIA DEL ROSARIO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**EDIFICIO N, LABORATORIO 110, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD
XOCHIMILCO.**

ASESOR DEL TEMA:

DRA LUZ MARÍA MELGOZA CONTRERAS

SUSTENTANTE:

ANGÉLICA MARÍA CHAVARRÍA AMEZCUA

“Experiencia es simplemente el nombre
que le damos a nuestros errores”

-Oscar Wilde

ÍNDICE

| | | |
|------|--|----|
| I. | RESUMEN | 1 |
| II. | OBJETIVOS | 3 |
| III. | HIPÓTESIS | 3 |
| IV. | MARCO TEÓRICO | 4 |
| | i. LESIONES CUTÁNEAS | 4 |
| | ii. EMULSIONES | 9 |
| | a. Teorías de emulsificación | 14 |
| | b. Evaluación de la estabilidad | 18 |
| | iii. DISEÑO ESTADÍSTICO DE EXPERIMENTOS | 21 |
| | a. Etapas de diseño de experimentos | 22 |
| | b. Selección del diseño experimental | 24 |
| | c. Selección de los factores y sus niveles | 25 |
| | d. Diseños Factoriales | 26 |
| | e. Diseños factoriales con tres factores | 27 |
| | f. Diseño factorial 2^3 | 29 |
| | g. Factoriales 2^k con punto al centro | 30 |

| | | |
|------|--|----|
| h. | Experimentación factorial vs mover un factor a la vez | 30 |
| V. | METODOLOGÍA EXPERIMENTAL | 32 |
| i. | DISEÑO EXPERIMENTAL | 32 |
| ii. | PREPARACIÓN DE LAS EMULSIONES F | 34 |
| iii. | PREPARACIÓN DE LAS EMULSIONES S | 35 |
| iv. | EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LAS EMULSIONES F | 36 |
| v. | EVALUACIÓN DE LAS RESPUESTAS DE LAS EMULSIONES S | 37 |
| vi. | DETERMINACION DE LA VISCOSIDAD | 37 |
| vii. | EVALUACIÓN ESTADÍSTICA | 37 |
| VI. | RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS | 38 |
| i. | RESULTADOS DE LAS EMULSIONES F | 38 |
| ii. | ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LAS FORMULACIONES SIN SULFADIAZINA DE PLATA. | 42 |
| a. | Efecto sobre la estabilidad | 43 |
| b. | Efecto sobre la viscosidad | 49 |

| | |
|--|----|
| iii. OPTIMIZACIÓN DE RESPUESTA MÚLTIPLE PARA LAS FORMULACIONES SIN SULFADIAZINA DE PLATA. | 51 |
| iv. RESULTADOS DE LAS EMULSIONES CON SULFADIAZINA (S) | 53 |
| a. Efecto sobre la estabilidad y evaluación del diseño de experimentos | 56 |
| b. Efecto de la viscosidad | 61 |
| v. OPTIMIZACIÓN DE RESPUESTA MÚLTIPLE | 62 |
| VII. CONCLUSIONES | 66 |
| VIII. BIBLIOGRAFÍA | 68 |

I. RESUMEN

En el campo experimental es común hacer pruebas con el fin de comprobar o demostrar una hipótesis, lo normal es que estas pruebas se hagan a base de ensayo y error y en base a la experiencia adquirida realizar nuevos experimentos hasta llegar al blanco. No obstante hay situaciones donde los experimentos son más complejos y este tipo de experimentación puede resultar en un trabajo extenso y extenuante, por lo que sería mejor analizar el problema de manera eficaz de forma que se obtengan mayores respuestas.

El diseño de experimentos consiste en determinar cuáles pruebas se deben realizar y de qué manera, para obtener datos que, al ser analizados estadísticamente, proporcionen evidencias objetivas que permitan responder las interrogantes planteadas, y de esa manera clarificar los aspectos inciertos de un proceso, resolver un problema o lograr mejoras.

El diseño de experimentos tiene múltiples aplicaciones diversos campos de la investigación. Tal es el caso del desarrollo farmacéutico de un nuevo producto o la mejora de uno ya existente. El diseño experimental correcto, permite la reducción de experimentos así como el análisis de resultados para concluir la mejor formulación que puede obtenerse.

El objetivo de este trabajo, es el empleo de un diseño experimental factorial 2^3 , para obtener la mejor combinación de agentes emulsificantes de una emulsión. Tomando en cuenta tres factores (agentes emulsificantes):

-) Fosfatidilcolina hidrogenada (Phospholipon 90H®): emulsificante de origen natural, usando en la preparación de liposomas y emulsiones farmacéuticas y cosméticas.

- J Monoestearato de glicerilo: es una mezcla de monoacilgliceroles (40 – 50 %), junto con cantidades variables de di- y triacilgliceroles. Tiene un HLB = 3.8 pero es usado como estabilizante en emulsiones W/O, y también a veces como coemulgente en las O/W. Su afinidad cutánea es excelente.
- J PEG-400: agente estabilizante. Ampliamente empleados en una gran variedad de preparaciones farmacéuticas tópicas, orales, rectales, oftálmicas, y parenterales. Son sustancias estables, hidrofílicas, e inocuas para la piel. Prácticamente no penetran en la piel, pero al ser solubles en agua. Se eliminan fácilmente por simple lavado.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Utilizar un diseño de experimentos factorial 2^3 , para desarrollar y optimizar una emulsión con propiedades hidratantes, regenerativas y antibióticas, para el tratamiento de heridas cutáneas abiertas infectadas.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ▶ Utilizar Phospholipon 90H[®] y PEG 400 como emulsificantes funcionales dentro de la formulación de una crema hidratante.
- ▶ Obtener la formulación de una emulsión estable con características hidratantes, regenerativas y antibióticas.
- ▶ Utilizar el diseño estadístico de experimentos para encontrar la mejor mezcla de emulsificantes, que resulte en una emulsión estable, utilizando como factores de respuesta la viscosidad y la estabilidad preliminar.
- ▶ Estudiar el efecto individual y la interacción de los tres emulsificantes.

III. HIPÓTESIS

Durante el proceso de formulación de una emulsión, el diseño estadístico de experimentos es una herramienta útil, pues la información obtenida del análisis estadístico de las respuestas aporta mayor conocimiento del comportamiento del sistema.

IV. MARCO TEÓRICO

LESIONES CUTÁNEAS

El desarrollo de una envoltura de piel fue un componente crucial de adaptación de los animales acuáticos marinos al ambiente terrestre.

Se compone por tres capas principales: Epidermis, Dermis e Hipodermis o estrato basal (Figura 1)

La barrera de permeabilidad está dada por varias capas firmemente empaquetadas en la parte más externa epidermis, que está formada por varias capas resultado del cambio en el interior de los queratinocitos a medida que ascienden al exterior. Estas capas son: estrato basal, estrato espinoso, estrato granuloso, estrato lúcido y estrato córneo (figura 2). Además está formada por otras células como las de Langerhans, Melanocitos y de Mekel [1].

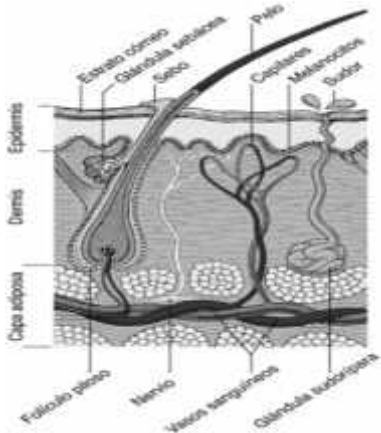


Figura 1. Diagrama que muestra estructura de la Piel



Figura 2. Diagrama que muestra la estructura de la epidermis

La protección mecánica está dada por el tejido conjuntivo que compone la gruesa capa de la dermis ya que el tejido resistente y elástico actúa como una almohadilla. Proporciona nutrientes a la epidermis y apéndices cutáneos. La mayoría de las células que la componen son

fibroblastos, aunque también hay mastocitos y macrófagos. También alberga el sistema nervioso, linfático y sanguíneo [1, 2].

La barrera de vapor y líquido creada por la capa epidérmica facilita el mantenimiento de la homeostasis de líquidos y electrolitos dentro de límites muy ajustados [1].

La hipodermis es una capa constituida básicamente por tejido adiposo, es una capa continua que da origen a los queratinocitos[1, 2].

La dermis provee fuerza y flexibilidad y, la vascularización dérmica, reactiva y facilita el control de la temperatura interna del cuerpo dentro de límites muy estrechos. Todas estas funciones críticas se pierden cuando se lesionan áreas considerables de la piel [2].

Se ha desarrollado un extenso lenguaje para estandarizar la descripción de las lesiones cutáneas; las lesiones elementales de la piel se dividen en primarias y secundarias. Las lesiones primarias son las que aparecen sobre la piel previamente sana, mientras que las lesiones secundarias se producen por una agresión externa sobre la piel o como consecuencia de la evolución de las primarias. Aquellas que interesan para fines de este trabajo son:

-) Úlcera: pérdida de epidermis y parte de la dermis o hipodermis, deja cicatriz al curar. Al describir una úlcera se ha de especificar las características de los bordes, la base o fondo y su contenido.
-) Erosión: pérdida de parte superficial de la epidermis que cura sin dejar cicatriz. Cuando es secundaria al rascado con las uñas se denomina excoriación.
-) Fisura: hendidura o corte lineal que llega a dermis superficial, se denomina también grieta [3, 4].

Este tipo de lesiones representan una pérdida en la continuidad de la piel[4], lo que puede ocasionar como consecuencia de determinados

factores (estado de salud, higiene, etc.) el desarrollo de una infección bacteriana, lo cual retrasa o empeora el proceso de sanación de la herida [2].

Las quemaduras son lesiones secundarias causadas por agentes físicos, químicos o eventualmente biológicos. La principal característica de las lesiones por quemadura es la pérdida de esta cubierta cutánea, ya sea en forma parcial o total [5]. Existe tanto respuesta local como sistémica; la respuesta local consiste en la coagulación del tejido con trombosis progresiva de los vasos circundantes en la zona de estasis; la respuesta sistémica se produce en una quemadura más grande impulsada inicialmente por la liberación de mediadores del tejido lesionado. A continuación, los productos de desecho del sobrecrecimiento bacteriano dentro de la escara desvitalizada estimulan esta respuesta sistémica [2].

Se consideran a las quemaduras masivas aquéllas que involucran más del 50% de la superficie corporal total y que son profundas y por lo tanto requieren en su tratamiento la desbridación y el remplazo de la piel, mismo que se torna un reto para los cirujanos al contar con pocas o limitadas zonas donadoras. La mortalidad de las quemaduras masivas se reporta hasta en un 78%. [5]

Por otro lado, la úlcera por presión es una lesión de la piel, producida secundariamente a un proceso de isquemia, que puede afectar y necrosar aquellas zonas de la epidermis, dermis, tejido subcutáneo y músculo donde se asientan, incluso pudiendo llegar a afectar articulación y hueso.[6]

La principal causa de su formación es la presión ejercida y mantenida entre dos planos duros y la tolerancia de los tejidos a ésta. Por un lado tenemos el plano duro esquelético y prominencias óseas fisiológicas o deformantes del paciente y el otro plano duro generalmente externos a

él, representado por la cama, silla, calzado u otros objetos. Si no desaparece la presión se produce isquemia local, trombosis venosa y alteraciones degenerativas que desembocan en necrosis y ulceración. Las úlceras por presión se clasifican en estadios según las estructuras afectadas de los tejidos, que van del estadio I al IV.[6]

Las heridas son limpias al comienzo pero rápidamente las bacterias endógenas y exógenas las colonizan. A medida que las bacterias se multiplican dentro de la escara en los días siguientes a la lesión, las proteasas producen licuefacción y lesión de la escara. [2]

Ante signos locales de infección y heridas que no progresan correctamente deben utilizarse antimicrobianos tópicos. Entre los antimicrobianos tópicos recomendados están la sulfadiazina de plata, gentamicina y metronidazol. Los antimicrobianos sistémicos sólo deben utilizarse en infección con repercusión sistémica (fiebre, compromiso del estado general, aumento de la VHS, leucocitosis).[7]

La Sulfadiazina de plata crema al 1% es el estándar de oro para el tratamiento tópico de quemaduras de segundo grado. Algunas de sus desventajas son la necesidad de cambio de apósito al menos una vez al día y el dolor que esto ocasiona. Los avances recientes, se dirigen al desarrollo de parches que retienen la humedad, que tienen las ventajas de mejorar el manejo del exudado, menor cambio de apósito, mejorar la barrera ante microorganismos y menos interrupción del tejido sano.[8]

El aseo tiene como objetivo remover bacterias y detritus de la herida produciendo el menor daño posible para favorecer la cicatrización. El desbridamiento se realiza con agentes que deben ser seguros y no citotóxicos y tienen como objetivo la remoción del tejido necrótico del lecho de la úlcera. Existen varios tipos:

- a. Quirúrgico: es el método más rápido, pero el más agresivo, requiriendo pabellón y anestesia.
- b. Mecánico: con gasa tejida seca sobre la herida, es barato, pero doloroso.
- c. Autolítico: usando hidrogel, transparentes o hidrocoloides es más lento, pero muy efectivo
- d. Por presión negativa: excelente debridante, barato, cómodo y con buenos resultados.
- e. Cortante: es aquel que hace la enfermera a pie de la cama, tiene como limitación que puede causar dolor y hemorragias.
- f. Larval: eliminación de tejido desvitalizado mediante la aplicación de larvas de *Lucilla Sericatta*.
- g. Aplicación local de enzimas exógenas que funcionan de forma sinérgica con las enzimas endógenas, degradando la fibrina, el colágeno desnaturalizado y la elastina [7, 9].

Finalmente se tapa la herida con un apósito. La elección del apósito adecuado de acuerdo a los principios de curación avanzada de heridas, la etapificación de la úlcera y los objetivos del tratamiento. En cada etapa el apósito adecuado debe ser capaz de:

- a. Grado I: proteger integridad cutánea y evitar daño progresivo.
- b. Grado II: mantener el lecho de la úlcera húmeda y tejido perilesional seco, minimizando el dolor y protegiendo del trauma.
- c. Grado III y IV: mantener el lecho de la úlcera húmeda, debridar tejido necrótico, absorber exudado, proteger tejido de granulación y mantener tejido perilesional seco, minimizando el dolor [6, 7, 9].

Las heridas abiertas pueden tener complicaciones no quirúrgicas como es el aumento de la mortalidad, el hecho de presentar una úlcera por presión aumenta cuatro veces la mortalidad. La osteomielitis ocurre en

el 38% de los pacientes con úlceras por presión III-IV. Para su tratamiento se requiere la escisión del hueso afectado, cobertura con músculo y terapia antibiótica prolongada (promedio 6 meses). La sepsis por úlceras es muy poco frecuente pero tiene alta mortalidad (48%). Los microorganismos aislados son generalmente múltiples (polimicrobiano) [6].

EMULSIONES

Una emulsión es un sistema de dos fases que es termodinámicamente inestable preparado por combinación de dos líquidos inmiscibles o parcialmente miscibles, en el cual pequeños glóbulos de uno de los líquidos están dispersos uniformemente a través del otro líquido. Cuando un líquido se pone en contacto con otro líquido, con el cual es insoluble e inmiscible, la fuerza causada por cada líquido para resistir la ruptura en partículas más pequeñas, se llama tensión interfacial [10].

El líquido que está disperso en pequeñas gotas se conoce como la fase dispersa, interna o discontinua. El otro líquido es el medio de dispersión, fase externa o fase continua [11].

Aunque se traten de dispersiones termodinámicamente inestables, las emulsiones pueden convertirse en cinéticamente estables gracias a la presencia de agentes tensoactivos que presentan la capacidad de adsorción en las superficies de las gotas [12]. El emulsionante se acumula en la interfase y forma una capa protectora en la forma de una película dura y elástica que no se rompe cuando las gotas chocan (Figura 3). Para optimizar estas propiedades a menudo se usan mezclas de emulsionantes [11].

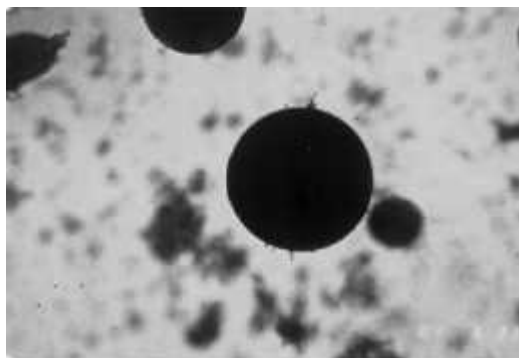


Figura 3. Microfotografía de una gota de emulsión de crudo en una solución acuosa. Se puede notar la presencia del film interfacial en la superficie de la gota [13].

Las sustancias que poseen actividad superficial reciben el nombre de anfifílicas, es decir, que tienen cierto grado de afinidad por las dos fases inmiscibles. Cuando esta sustancia se disuelve en un solvente, por ejemplo agua, la presencia de grupo hidrofóbico causa una distorsión en la estructura del líquido, incrementando la energía libre. Cuando las moléculas de surfactante se transportan a la interfase la energía libre se reestablece al liberar las moléculas de agua en el grupo hidrófobo. Dado que se requiere menos trabajo para llevar las moléculas de tensioactivo a una interfaz en relación con las moléculas de disolvente, la presencia del tensioactivo disminuye el trabajo requerido para aumentar el área interfacial, lo que resulta en una disminución de la tensión interfacial [14] (figura 4).

Los surfactantes son sustancias que reducen la resistencia de una gota a formar gotas más pequeñas. Acorde a la teoría de la tensión superficial de emulsificación, el uso de surfactantes resulta en una reducción en la tensión interfacial de dos líquidos inmiscibles, reduciendo la fuerza de repulsión de los líquidos y disminuyendo la atracción de cada líquido por sus propias moléculas [10].

Cuando el aceite es la fase dispersa y una solución es la fase continua, el sistema se designa como una emulsión aceite-en-agua (O/W). Viceversa; cuando el agua o una solución acuosa es la fase dispersa y el aceite o el material oleoso es la fase continua, el sistema se designa como una emulsión agua-en-aceite (W/O) [10, 12] (figura 5). La energía libre de estos sistemas dispersos es grande por la cantidad de energía superficial total de las gotas [11].

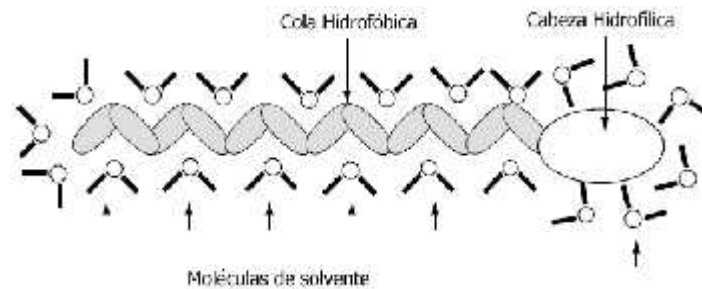


Figura 4. Para una molécula de surfactante en agua, las moléculas de agua se acomodan en diferentes estructuras de la molécula anfifílica.

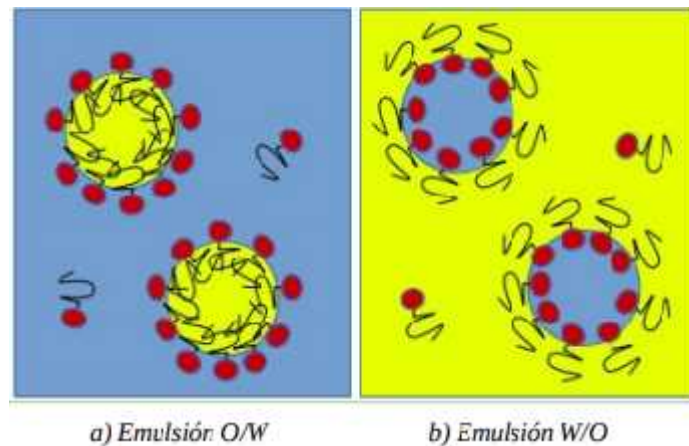


Figura 5 Emulsiones O/W y W/O. Las moléculas de tensoactivo están ordenadas alrededor de las gotas de fase interna (agua en azul aceite en amarillo) [15].

Los líquidos asumen una forma de pequeñas gotas esféricas para minimizar su área superficial; aunque el área superficial total del sistema, es decir, la suma del área de todas las gotas es mayor al inicial. Estas pequeñas gotas son atraídas por la fuerza entre las moléculas resistiendo así la distorsión de las gotas. Si dos o más gotas del mismo líquido se ponen en contacto una con la otra, se hace más termodinámicamente favorable que coalescan, haciendo una gota más grande, lo que provoca un decremento en su área superficial comparado con el total del área entre las dos gotas [10].

El tipo de emulsión depende en cierta medida de la proporción fase volumen. Cuanto mayor sea la fracción de una fase mayor será la probabilidad de que forme la fase externa. Así, es más probable que se forme una emulsión O/W si el agua representa una mayor fracción del volumen que la fase oleosa. Sin embargo, es posible que la fase interna de una emulsión represente hasta el 74% del volumen de una emulsión y de todos modos dé lugar a un producto estable. Generalmente se suele cumplir la regla de Bancroft [10, 11].

La teoría más comúnmente aceptada, en relación con el tipo de emulsión, es la de Bancroft y sus cols, que ha sido confirmada por los trabajos de Clowes y otros. De acuerdo con esta teoría, la película de moléculas tensoactivas orientadas entre las dos fases de la emulsión se considera como una tercera fase, que presenta distintas tensiones superficiales con cada uno de los dos líquidos que forman la emulsión. En el caso de las emulsiones aceite/agua, si la película tiene una mayor afinidad por el agua que por aceite, su tensión superficial será más baja del lado del agua, que lado del aceite. La película tenderá entonces a curvarse de forma tal que reduzca la tensión superficial total; es decir,

formará una curva con la cara de baja tensión superficial en el lado exterior y la de alta tensión superficial en el interior, o lo que es lo mismo, se formarán glóbulos de aceite en agua. El mismo caso aplica en las emulsiones de aceite en agua [11, 16].

Los agentes emulsificantes pueden clasificarse en diferentes categorías de acuerdo a sus características físicas o químicas. Sin embargo la clasificación presentada es más útil para los fines de este trabajo dividirse en tres clases:

1. Agentes emulsificantes naturales: son sustancias que derivan de fuentes vegetales, estos materiales forman coloides hidrofílicos cuando se añaden al agua y generalmente producen emulsiones o/w. Además su actividad superficial es baja, estos materiales alcanzan su poder emulsionante por incremento de la viscosidad de la fase acuosa. Ejemplos son caseína, colesterol, gelatina y lecitina.
2. Sólidos finamente divididos: son arcillas coloidales, estos compuestos son buenos emulsificantes y tienden a absorberse en la interfase
3. Agentes emulsificantes sintéticos: son muy efectivos en la reducción de la fase interfacial entre las fases de agua y aceite, debido a que las moléculas poseen ambas características. Están disponibles en diferentes tipos iónicos. Ejemplos son dodecil sulfato, cloruro de benzalconio y polietilenglicol 400.

La naturaleza anfótera de los agentes tensioactivos puede ser expresado en términos de una escala empírica que comúnmente se denomina el balance HLB (balance hidrófilo-lipófilo) [11]. Los emulsificantes con valores HLB altos (8 a 16) tienden a formar una emulsión O/W, mientras que aquellos con valores HLB bajos (3 a 8) tienden a formar emulsiones

W/O [10]. Dependiendo el valor de HLB cada emulsificante tiene diferentes aplicaciones (figura 6).

Teorías de emulsificación

El proceso de emulsificación es tan dinámico y complejo que un modelo aproximado y un tratamiento teórico es casi imposible. Con ciertas limitaciones es posible obtener un estimado en orden de magnitud de aquellos pasos como velocidad de formación de gota y velocidades de absorción. Simplemente hay demasiados eventos (simultáneos y secuenciales) ocurriendo en un marco de tiempo muy corto y en esencia el caos domina. Afortunadamente si las condiciones son controladas, un adecuado nivel de reproducibilidad se puede obtener, así estos útiles sistemas pueden ser formulados y producidos [16].

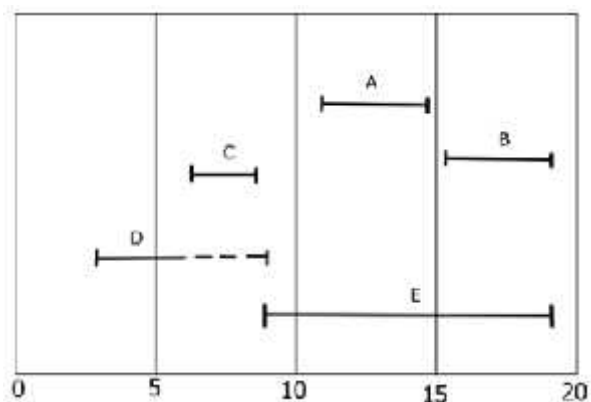


Figura 6. Aplicaciones de tensoactivos con diferentes valores de HLB. A: Detergentes, B: Solubilizantes, C: Humectantes superficiales, D: Emulsiones W/O, E: Emulsiones O/W [1]

Las teorías más predominantes son la teoría de la tensión superficial (ver antes), la teoría de la cuña orientada y la teoría de la película interfacial.

La teoría de la cuña propone que un surfactante forma capas monomoléculares alrededor de las gotas de la fase interna de la emulsión, se basa en la suposición de que los agentes emulsificantes se orientan alrededor y dentro de un líquido en relación a su solubilidad. Si los surfactantes tienen una porción hidrofílica y una hidrofóbica y las moléculas se posicionarán u orientarán dentro de cada fase. Dependiendo de la forma y el tamaño de las moléculas, sus características de solubilidad y por lo tanto su orientación, la teoría de la cuña supone que el emulsionante rodeara cada gota de aceite o agua [10, 11].

La teoría de la película interfacial propone que el emulsionante forma una interfase entre el aceite y el agua rodeando de gotas la fase interna como una delgada capa de película adsorbida en la superficie de las gotas, esta película actúa como barrera mecánica que previene el contacto y la coalescencia con la fase externa. El emulsionante debe ser suficiente para recubrir totalmente cada gota de la fase interna y formar una emulsión estable [10, 17].

Aunque ninguna de las teorías de emulsificación puede individualmente explicar el mecanismo por el cual la mayoría de los emulsionantes promueven la formación y estabilidad de las emulsiones. Es probable que dentro de un mismo sistema emulsionado, más de una de las teorías pueda ser aplicada. Por ejemplo, la reducción de la tensión interfacial es crítica durante la formación inicial de una emulsión, pero la formación de una capa protectora de moléculas o una película de emulsionante es igual de importante para continuar la estabilidad de la emulsión. Sin embargo la mayoría de los emulsionantes son capaces de ambas acciones [10, 14].

En algunos casos se ha encontrado que la combinación de dos agentes emulsionantes, uno de los cuales es soluble en agua el otro soluble en

aceite, da emulsiones de aceite en agua más estables que un solo agente tensioactivo. Puede suponerse que los dos agentes se interpenetran en la interfase, formando una película de mayor espesor y mayor robustez y plasticidad que la que forma una sola especie molecular. Puede existir antagonismo entre dos agentes emulsionantes naturales dentro del mismo producto; por ejemplo, entre la lecitina y el colesterol, presentes en los huevos [16].

Es bien conocido que habiendo emulsionantes suficientes se formará una película compacta de moléculas en la interfase. No obstante cuando se utiliza un solo tipo de emulsionante las moléculas idénticas forman la monocapa y la estructura de las moléculas idénticas se encuentran en estrecha proximidad, lo que obliga a las moléculas a mantenerse separadas por impedimento estérico o de repulsión de cargas y se debilita la película interfacial. La solución es incorporar una o más especies adicionales de emulsificantes, es decir un sistema de emulsionantes (figura 7). Estos emulsionantes no necesariamente deben ser de valores de HLB similares, de hecho se logran mejores resultados cuando los emulsionantes tienen HLB de valores muy diferentes [1].

Esto se debe a que las moléculas diferentes se alternan en la interfase y forman una película mucho más compacta, firme y continua, que actúa como una barrera mecánica. El segundo emulsionante, de hecho puede tener un poder emulsionante muy bajo (valores de HLB muy bajos), el monoestearato de glicerilo (HLB-3.8) es un ejemplo [1, 18].

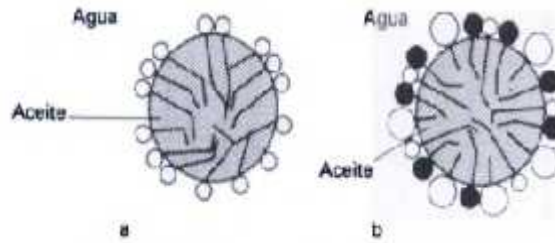


Figura 7. Efecto mezcla de emulsionante sobre la estabilidad de la emulsión [1].

a: estabilidad pobre

b: estabilidad buena

) HLB medio insaturado

○ HLB alto saturado

[HLB bajo insaturado

La estabilidad del sistema disperso es caracterizada por un comportamiento constante en tiempo de sus parámetros básicos, llamados la dispersión y la distribución uniforme de la fase dispersa en el medio. El problema de la estabilidad es una de las más importantes y complicadas en la química coloidal.

La consistencia de las emulsiones se puede incrementar por incremento de la viscosidad de la fase continua, incremento del volumen fraccional de la fase interna, reducción del tamaño de partícula de la fase interna, incremento de la proporción del agente emulsionante o añadiendo un emulsionante hidrofóbico a la fase oleosa de la emulsión [10, 11].

Cuando se discute la estabilidad de un sistema emulsionado es importante tener una idea clara de la condición de los componentes y la terminología empleada. Cuatro términos son comúnmente utilizados (Figura 8):

-) Rompimiento: es un proceso en el cual se da una separación total de la emulsión. El resultado macroscópico es consecuencia de una coalescencia microscópica. Se pierde totalmente la estabilidad de la emulsión.

-) Coalescencia: se refiere a un proceso de envejecimiento debido a la unión de dos o más gotas, resultando en una reducción de su área interfacial. Aunque esto resulta en un cambio microscópico de la condición de la fase externa pero eventualmente causará la separación de la emulsión.
-) Floculación Se refiere al agregado de gotas de la emulsión, que forma flóculos o conjuntos sueltos de partículas pero que la identidad de cada una se mantiene. El proceso está influenciado por las cargas en las superficies de los glóbulos. Toma lugar antes del cremado y suele ser un proceso reversible.
-) Cremado En este proceso ocurre con el tiempo en donde los agregados de gotas se separan por influencia de la gravedad, que pueden elevarse o sedimentar, dependiendo de la densidad de acuerdo a la ley de Stokes (ecuación 1). El proceso es reversible si se aplica un poco de energía [13-15, 17].

$$V_s = \frac{2r^2(\rho_2 - \rho_1)g}{9\eta} \quad (1)$$

Ecuación de Stokes. Donde r es el radio de partícula, ρ_1 y ρ_2 son las densidades de la partícula y de la fase continua respectivamente, g es la gravedad y η es la viscosidad del sistema. La velocidad de sedimentación es directamente proporcional al tamaño de partícula [15].

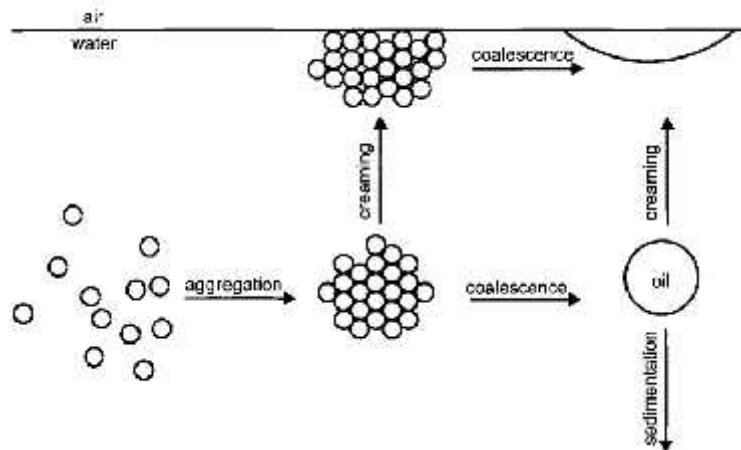


Figura 8. Esquema de los procesos de inestabilidad de las emulsiones [11].

Evaluación de la estabilidad de emulsiones

Comúnmente se utilizan pruebas en frascos de vidrio o botellas para evaluar la estabilidad o inestabilidad de las emulsiones. Las emulsiones que se pretenden probar se ponen en el frasco y entonces se realiza la prueba de “deemulsificación” que se desea a un determinado tiempo. Por ejemplo se pueden someter a diferentes temperaturas o se pueden centrifugar.

Después de la prueba se examinan, aquellas que son estables lucen homogéneas sin fase separadas o con una muy pequeña separación, mientras que en las separadas se observa la separación de fases y el brillo de la fase oleosa y la claridad de la fase acuosa [13]

Si se realizan medidas u observaciones a través del tiempo se puede determinar la velocidad de separación. Al centrifugar muestras de las emulsiones se acelera este proceso.

Una prueba de centrifuga puede utilizarse para estudiar la sedimentación de sistemas coloidales, ya que las fuerzas centrífugas adicionales se pueden emplear para superar las tendencias de mezcla de

difusión y convección. La fuerza centrífuga es proporcional a la masa al igual que la fuerza gravitacional, pero el coeficiente no es la aceleración debido a la gravedad (g) más bien $\epsilon^2 x$, donde x es la velocidad angular ($2\pi \times$ revolución \times segundo) y x es la distancia de la partícula desde el eje de rotación. Entonces la fuerza impulsora para la sedimentación se convierte en $m(\rho_2 - \rho_1) \epsilon^2 x$ y la velocidad final es:

$$\frac{d}{dt} = \frac{2a^2(\rho_2 - \rho_1)\omega^2 x}{9\eta} \quad (2)$$

Donde ρ_2 son las densidades de la fase externa (2) y continua (1) y η la viscosidad del sistema.

Como $\epsilon^2 x$ se sustituye por g en la ecuación se puede hablar de múltiples valores de g en la centrifuga y se puede reducir el tiempo que se necesita para sedimentar partículas de cierto tamaño [13].

Además de estas pruebas existen otros métodos para estudiar la estabilidad de una emulsión, tales como:

- ✓ Métodos ópticos: dispersión de luz, espectroscopía de correlación de fotones y turbidimetría.
- ✓ Medidas de la constante dieléctrica o conductividad eléctrica, en las regiones más altas o más bajas de la emulsión. Y
- ✓ Espectroscopia de resonancia magnética nuclear, calorimetría y mediciones de velocidad ultrasónica [13].

Las emulsiones poseen un número de ventajas importantes sobre otras formas líquidas:

-) En una emulsión, fármacos pobremente solubles en agua, pueden ser fácilmente incorporadas, mejorando la velocidad de disolución y la biodisponibilidad.

-) Se pueden enmascarar olores y sabores desagradables de forma parcial o completa.
-) La velocidad de absorción y la permeación de los medicamentos pueden ser controlados.
-) La absorción puede aumentarse por la disminución del tamaño de la fase interna.
-) Se pueden obtener varios tamaños de partícula de la fase interna por técnicas de preparación, desde microemulsiones hasta nanoemulsiones.
-) El agua es un diluyente barato y un buen disolvente para la mayoría de los fármacos y saborizantes que se añaden a las emulsiones [10].

DISEÑO ESTADÍSTICO DE EXPERIMENTOS

En el campo experimental es común hacer pruebas con el fin de comprobar o demostrar una hipótesis, lo normal es que estas pruebas se hagan a base de ensayo y error y en base a la experiencia adquirida realizar nuevos experimentos hasta llegar al blanco. No obstante hay situaciones donde los experimentos son más complejos y este tipo de experimentación puede resultar en un trabajo extenso y extenuante, por lo que sería mejor analizar el problema de manera eficaz de forma que se obtengan mayores respuestas [19].

El diseño de experimentos consiste en determinar cuáles pruebas se deben realizar y de qué manera, para obtener datos que, al ser analizados estadísticamente, proporcionen evidencias objetivas que permitan responder las interrogantes planteadas, y de esa manera clarificar los aspectos inciertos de un proceso, resolver un problema o lograr mejoras. El diseño de experimentos (DDE) es un conjunto de técnicas activas, en el sentido de que no esperan que el proceso mande

las señales útiles, sino que éste se “manipula” para que proporcione la información que se requiere para su mejoría [19, 20].

El diseño de tratamientos es la selección de los factores a estudiar, sus niveles y la combinación de ellos. El diseño de tratamientos es independiente del diseño experimental que indica la manera en que los tratamientos se aleatorizan a las diferentes unidades experimentales y las formas de controlar la variabilidad natural de las mismas. Por lo tanto el diseño experimental tiene dos partes: el diseño de tratamientos y el análisis estadístico [19, 21].

Etapas de diseño de experimentos

Un aspecto fundamental del diseño de experimentos es decidir cuáles pruebas o tratamientos se van a realizar y cuántas repeticiones de cada uno se requieren, de manera que se obtenga la máxima información al mínimo costo posible. El arreglo formado por los diferentes tratamientos que serán corridos, incluyendo las repeticiones, recibe el nombre de matriz de diseño o sólo diseño.

Las siguientes son etapas básicas de un diseño experimental: [19, 22].

1. Planeación y realización.

-) Se debe entender y delimitar el problema en estudio a través de investigaciones preliminares que ayuden a entender el problema.
-) Elegir las variables de respuesta: ya que en ella se refleja el resultado de las pruebas y se debe asegurar que estas se midan de manera confiable.
-) Determinar cuáles factores deben estudiarse o investigarse: de acuerdo a la supuesta influencia que tienen sobre la respuesta, de modo que se utilice toda la información

disponible para incluir los factores que se considera que tienen un mayor efecto.

-) Seleccionar los niveles de cada factor, así como el diseño experimental adecuado a los factores que se tienen y al objetivo del experimento.
-) Planear y organizar el trabajo experimental: con base en el diseño seleccionado, organizar y planear con detalle el trabajo experimental.
-) Realizar el experimento: seguir al pie de la letra el plan previsto.

2. Análisis

En esta etapa no se debe perder de vista que los resultados experimentales son observaciones muestrales, no poblacionales. Por ello, se debe recurrir a métodos estadísticos inferenciales para ver si las diferencias o efectos muestrales son lo suficientemente grandes para que garanticen diferencias poblacionales. La técnica estadística central en el análisis de los experimentos es el llamado análisis de varianza (ANOVA).

3. Interpretación

Con el respaldo del análisis estadístico formal se debe analizar con detalle lo que ha pasado en el experimento, desde contrastar las conjeturas iniciales con los resultados del experimento, hasta observar los nuevos aprendizajes que sobre el proceso se lograron, verificar supuestos y elegir el tratamiento ganador, siempre con apoyo de las pruebas estadísticas.

Se debe ser muy cuidadoso en la planeación y el análisis de un experimento. El punto de partida para una correcta planeación es aplicar

los principios básicos del diseño de experimentos: aleatorización (asegura la variabilidad y reduce el error), repetición (reproducibilidad y variabilidad) y bloqueo (reduce el error experimental), los cuales tienen que ver directamente con que los datos obtenidos sean útiles para responder a las preguntas planteadas [19, 21, 22].

En proceso es necesario tener presente que la experimentación es parte del proceso de aprendizaje, en el cual se formulan tentativamente hipótesis acerca del problema en estudio, se realizan experimentos para investigar dichas hipótesis y con base en los resultados se formulan nuevas hipótesis. A medida que se avanza, se eliminan algunas variables, se agregan otras, se modifica la región de exploración de algunos factores, se añaden nuevas variables de respuesta, por lo tanto, se experimenta secuencialmente [20].

Se debe considerar altamente que el conocimiento no estadístico es vital, se tiene que reconocer que las metodologías estadísticas no garantizan soluciones exitosas, en primer lugar se requiere que el experimentador tenga un buen nivel de conocimiento técnico y práctico sobre el fenómeno o proceso que estudia, de tal forma que pueda vislumbrar con cierta facilidad cuáles son los aspectos clave del fenómeno y sea capaz de plantear conjeturas precisas, vislumbrar el tipo de relaciones entre las variables de respuesta y los posibles factores a estudiar [19, 20].

Selección del diseño experimental

Existen muchos diseños experimentales para estudiar la gran diversidad de problemas o situaciones que ocurren en la práctica. Esta cantidad de diseños hace necesario saber cómo elegir el más adecuado para una situación dada y es preciso conocer cómo es que se clasifican los diseños de acuerdo con su objetivo y su alcance. El objetivo del

experimento se utiliza como un criterio general de clasificación de los diseños experimentales.[19].

Aquí se debe seleccionar el diseño experimental adecuado a los factores que se tienen y al objetivo del experimento, elegir el conjunto de pruebas que se van a correr, y esto resulta de la cantidad de factores y niveles seleccionados; también considerar el costo y tiempo necesarios [19, 20].

La figura 9, muestra la clasificación general de acuerdo con su objetivo.

Durante la realización del experimento se debe hacer énfasis en seguir el plan previsto al pie de la letra para nulificar efectos indeseables o desviaciones [19].

Selección de los factores y sus niveles

Como ya se dijo, se debe conocer el proceso para elegir los factores que varíaran y los niveles sobre los cuales se hará el experimento. También deben considerarse la forma en que se controlaran estos factores para mantenerlos en los valores deseados y su forma de medición [20].

La recomendación es incluir en el experimento a cada factor que pueda tener una influencia importante en la respuesta. Cuando el número de factores es grande, la estrategia inicial es correr un diseño altamente fraccionado o saturado para detectar los pocos factores que tienen mayor influencia, y posteriormente plantear un segundo experimento más informativo sobre los factores que resultan importantes [19].

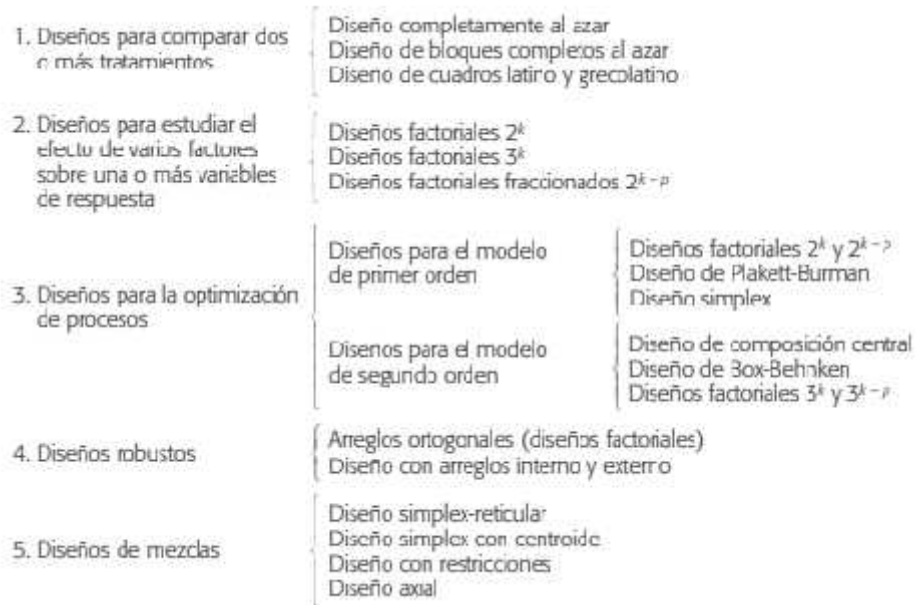


Figura 9. Clasificación de los Diseños Factoriales [19].

También es importante la separación que se elija entre un nivel y otro en un factor dado. Los niveles muy juntos no sirven para detectar el efecto de ese factor, mientras que niveles muy separados pueden causar problemas en la operación del proceso. Cuando no se sabe cuáles niveles utilizar en un factor, es recomendable realizar corridas preliminares del proceso, moviendo sólo ese factor y con esta información seleccionar los niveles a utilizar en el experimento [19].

Diseños Factoriales

Muchos experimentos involucran el estudio de los efectos de dos o más factores, para lo cual se desarrolló un tipo especial de tratamientos, el diseño factorial. Estos, producen experimentos más eficientes pues cada observación proporciona información sobre los factores y es factible ver las respuestas de un factor en diferentes niveles de otro factor en el mismo experimento. Es decir, que en cada prueba completa o réplica del

experimento, todas las posibles combinaciones de niveles de los factores son investigados [21, 22].

Por ejemplo, si hay "a" niveles del factor A y "b" niveles del factor B, cada replica contiene todos los tratamientos combinados ab. Cuando los factores se arreglan en un diseño factorial, a menudo se dice que están cruzados [22].

El efecto de un factor es un cambio en la respuesta medida ocasionado por un cambio en el nivel de ese factor, los tres efectos de interés son los simples, los principales y los de interacción [21].

En algunos casos sucede que la diferencia en la respuesta entre los niveles de un factor no es la misma en todos los niveles de los otros factores, se dice que entonces hay una interacción entre los factores [22].

Diseños factoriales con tres factores

Cuando se quiere investigar la influencia de tres factores (A, B y C) sobre una o más variables de respuesta, y el número de niveles de prueba en cada uno de los factores es a, b y c, respectivamente, se puede construir el arreglo factorial abc, que consiste de abc tratamientos o puntos experimentales. Entre los arreglos de este tipo que se utilizan con frecuencia en aplicaciones diversas se encuentran: el factorial 2^3 , el factorial 3^3 y los factoriales mixtos con no más de cuatro niveles en dos de los factores, por ejemplo, el factorial $4 \times 3 \times 2$ y el factorial $4 \times 4 \times 2$, por mencionar dos de ellos [19].

El diseño con dos factores permite la investigación de la interacción de primer orden o doble, AB, en el diseño con tres factores las dos interacciones de primer orden adicionales, AC y BC, amplían las inferencias del estudio y debe considerarse además una interacción de segundo orden o de tres factores, ABC [21].

En un diseño factorial abc como el presentado en este trabajo, se supone que el comportamiento de la respuesta Y puede describirse mediante el modelo de efectos dado por:

$$Y_{i_l} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk} + \varepsilon_{i_l}$$

$$i = 1, 2, \dots, a; j = 1, 2, \dots, b; k = 1, 2, \dots, c; l = 1, 2, \dots, n$$

(3)

Donde μ es la media general, α_i es el efecto del nivel i -ésimo del factor A, β_j es el efecto del nivel j del factor B y γ_k es el efecto del nivel k en el factor C; $\alpha\beta$, $\alpha\gamma$ y $\beta\gamma$ representan efectos de interacción dobles (de dos factores) en los niveles ij , ik , jk , respectivamente, y $(\alpha\beta\gamma)_{ijk}$ es el efecto de interacción triple en la combinación o punto ijk ; ε_{i_l} representa el error aleatorio en la combinación ij y l son las repeticiones o réplicas del experimento. Todos los efectos cumplen la restricción de sumar cero, es decir, son desviaciones relacionadas con la media general μ [19, 21, 22].

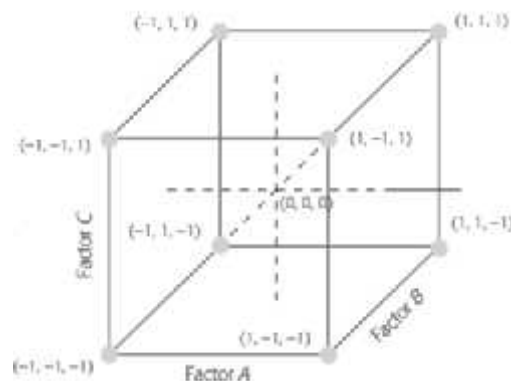


Figura 10. Región experimental para un diseño 2^3 [17]

Diseño factorial 2^3

Con este diseño se estudian tres factores en dos niveles cada uno. Consta de $2^3 = 2 \times 2 \times 2 = 8$ tratamientos diferentes. La región experimental es un cubo regular centrado en el origen (0, 0, 0), cuyos vértices son los ocho tratamientos (figura 10). La matriz de diseño se construye fácilmente alternando el signo menos y el signo más en la primera columna, dos menos y dos más en la segunda columna, y cuatro menos y cuatro más en la tercera; el diseño resulta acomodado en el orden estándar o de Yates (tabla 1). [19, 22] Hay tres notaciones reconocidas para la matriz de diseño. La primera usa los signos + y - (ó 0 y 1) para los niveles de prueba y se llama notación geométrica o codificada. La segunda utiliza letras para identificar las combinaciones de los tratamientos (A,B,C, etc) [22].

Tabla 1. Matriz de diseño 2^3

| Factor A | Factor B | Factor C |
|----------|----------|----------|
| - | - | - |
| + | - | - |
| - | + | - |
| + | + | - |
| - | - | + |
| + | - | + |
| - | + | + |
| + | + | + |

Con el diseño de la figura 1 se pueden estudiar los $2^3 - 1 = 7$ efectos: tres efectos principales A, B, C; tres interacciones dobles AB, AC, BC y una interacción triple ABC. Por lo general, el interés se enfoca en estudiar los efectos principales y las interacciones dobles [19]

Factoriales 2^k con punto al centro

Cuando en un diseño factorial 2^k los k factores admitan un nivel de prueba intermedio, es recomendable implementar un tratamiento adicional formado por la combinación del nivel intermedio o medio de todos los factores. Esta combinación se le conoce como punto central [19].

Las razones para correr el punto central con cierto número de réplicas es obtener grados de libertad adicionales para el error en la tabla de ANOVA, sin perjudicar el balance en la estimación ni los efectos de interés. Es más conveniente interpretar el ANOVA con al menos 8 grados de libertad en el error, condición que a veces es difícil de cumplir, por ejemplo cuando por razones económicas el experimento se corre sin las réplicas suficientes. La segunda razón, dirigida a factores cuantitativos, es que las repeticiones al centro permiten detectar la posible presencia de curvatura en al menos uno de los factores objeto de estudio. La curvatura a la que nos referimos son los efectos cuadráticos A^2 , B^2 , ... etc. Una vez detectados estos efectos, el experimento se aumenta con más puntos experimentales para analizar dicha curvatura [19, 22].

Experimentación factorial vs mover un factor a la vez

Los diseños factoriales son más eficientes que el tradicional experimento de mover un factor a la vez, que utilizan las personas cuando no tienen conocimiento del diseño de experimentos.

En un ejemplo: un proceso donde se prueban 3 diferentes factores en dos niveles, en la experimentación tradicional se hacen pruebas fijando dos factores y cambiando el otro factor en diferentes niveles e igual para los otros dos factores, de manera que se realizan 8 experimentos; la

mejor condición puede ser cualquiera de los cuatro tratamientos que no se probaron; hay tratamientos que sin saberlo fueron probados en dos pasos (8 veces), y otros en ninguno. Después de realizar 24 pruebas sólo se estudiaron la mitad de los posibles tratamientos. Además, la comparación entre los resultados de un tratamiento y otro no se hizo con un criterio estadístico, y no se estudió el efecto simultáneo de los factores. Por lo tanto, se han gastado muchos recursos y se ha obtenido poca información; asimismo, no hay garantía de que la solución propuesta sea la mejor.

Aplicando un diseño factorial, con el cual se investigan (en orden aleatorio) todas las posibles combinaciones de los niveles de los factores. Por ejemplo, en el caso descrito antes, con 24 pruebas o incluso con menos, 16 por decir, se podrían haber estudiado los ocho tratamientos, y después de un análisis estadístico, saber qué factores son más importantes, si interactúan sobre Y y concluir cuál es el tratamiento que más conviene [19].

V. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

DISEÑO EXPERIMENTAL

Inicialmente se realizó el diseño experimental para desarrollar una emulsión que no incluyera el antibiótico (sulfadiazina de plata, SFP), para probar el sistema emulsionante, con el objetivo de obtener una emulsión estable. En una segunda etapa, se realizó otro diseño, esta vez añadiendo el antibiótico a la formulación.

Para el desarrollo de la formulación de la emulsión sin sulfadiazina de plata (emulsiones F) se planteó un diseño experimental factorial 2^3 (tres factores y dos niveles) tomando un punto intermedio dentro de diseño. Los factores que se probaron fueron tres emulsificantes: Phospholipon 90H[®] (Fosfatidilcolina Hidrogenada) y Monoestearato de glicerilo (MEG) y Polietilenglicol 400 (PEG-400). El programa que se utilizó para la secuencia de tratamientos (aleatorización) fue el software Statgraphics Centurion XVI (versión 16.1.11). Para este caso se consideró la prueba de estabilidad preliminar y viscosidad, como respuesta del diseño experimental.

En la tabla 2 se muestra el diseño experimental realizado.

Donde el nivel bajo (-) para Phospholipon 90H es 1% y alto(+) 5%; para MEG el nivel bajo 0.3% y alto 1%; y para el PEG-400 el nivel bajo 0.5% y alto 3%. Los niveles altos o bajos de se consideraron de acuerdo a la información proporcionada por el proveedor.

Para el desarrollo de la segunda formulación que contiene sulfadiazina de plata (formulaciones S), se planteó otro diseño experimental factorial 2^3 (tabla 3), también con un punto intermedio, utilizando el mismo

programa. Los porcentajes de cada factor se consideraron de acuerdo a los resultados obtenidos en el diseño experimental anterior.

Tabla 2. Matriz de diseño aleatorizada para las emulsiones F, el punto medio utilizado en este caso se muestra como la formulación F1.

| Ejecución | A: Phospholipon 90H [®] | B: MEG | C: PEG 400 |
|-----------|--|-----------|------------------|
| F1 | 0 | 0 | 0 |
| F2 | - | - | - |
| F3 | + | + | + |
| F4 | + | - | - |
| F5 | - | + | + |
| F6 | + | - | + |
| F7 | + | + | - |
| F8 | - | + | - |
| F9 | - | - | + |

Tabla 3. Matriz de diseño aleatorizada para las emulsiones con sulfadiazina de plata. El punto central es la formulación S4

| Ejecución | A: Phospholipon 90H [®] | B: MEG | C: PEG400 |
|-----------|--|-----------|--------------|
| S1 | - | - | + |
| S2 | - | + | - |
| S3 | - | - | - |
| S4 | 0 | 0 | 0 |
| S5 | + | - | + |
| S6 | + | + | - |
| S7 | + | + | + |
| S8 | - | + | + |
| S9 | + | - | - |

Donde el nivel bajo para Phospholipon 90H[®] es 4% y alto 5%; para MEG el nivel bajo 0.3% y alto 1%; y para el PEG-400 el nivel bajo 0.5% y alto 3%.

ELABORACIÓN DE LAS EMULSIONES F (SIN SULFADIAZINA DE PLATA)

Se diseñó una formulación general para cada tratamiento del diseño experimental, los aditivos en la fórmula se seleccionaron de acuerdo en lo reportado en la literatura tomando en consideración su seguridad para aplicación tópica y su eficacia en la curación de heridas de segundo y tercer grado. Se muestran en la tabla 4, así como su proporción en la formulación y su función.

Se prepararon lotes de 150 g de cada ejecución, siguiendo la formulación de la tabla 4.

Primero se pesaba la cantidad de agua y con agitación se añadía el Phospholipon 90H[®], para evitar que éste último se aglomere en agua caliente. Después se calentaba a 70°C y entonces se añadían el resto de los componentes de la fase acuosa y el PEG 400.

Para la fase oleosa, se pesaba por separado el aceite de coco junto con el triglicérido cáprico caprílico y el MEG; con agitación se llevaba a una de 70°C. En este punto se mezclaba la fase oleosa en la acuosa. Entonces se dejaba enfriar a 50°C, a esta temperatura se agitaba a alta cizalla con un equipo ultraturrax T18 WIS18N-19G IKA[®] a 6000 rpm durante 10 minutos, durante este proceso se añadían la vitamina A y E. Transcurridos los 10 minutos se detenía la agitación del equipo ultraturrax y se continuaba con agitación mecánica hasta que las emulsiones alcanzaban la temperatura ambiente.

Cada emulsión se almacenó en un frasco de vidrio y se dejaron reposar durante 72 horas.

Tabla 4. Formulación general para todas las emulsiones, aditivos, proporción y función.

| Aditivo | Porcentaje | Función |
|------------------------------------|------------|---|
| Fase oleosa | | |
| Vitamina A | 0.5 | Promueve la Reepitelización.[23, 24] |
| Vitamina E | 0.5 | Antioxidante, humectante[24] |
| Aceite de coco | 1 | Fitoesterol, humectante con propiedades antiinflamatorias[23] |
| Triglicérido cáprico caprílico | 7 | Derivado del aceite de coco humectante y oclusivo[24] |
| Fase acuosa | | |
| Urea | 5 | Hidratante, puede penetrar capas de queratina. Componente del FNH[23, 24] |
| Ácido láctico | 5 | Hidratante, puede penetrar capas de queratina. Componente del FNH[23, 24] |
| L-Arginina | 2 | Hidratante. Componente del FNH[24] |
| Alantoína | 1 | Cicatrizante, antirritante y removedor de tejido necrótico [25] |
| D-pantenol | 2.5 | Interviene en la sanación de heridas y disminuye la inflamación cutánea. Aporta un efecto calmante.[24] |
| Glicerina | 2 | Hidratante[23, 24] |
| Fenoxietanol | 0.3 | Preservativo[24] |
| Agua | c.b.p | Diluyente |
| Emulsionantes | | |
| MEG | c/n | Emulsionante secundario soluble en aceite biocompatible[26] |
| PEG 400 | c/n | Emulsionante soluble en agua de fácil enjuague[24] |
| Phospholipon 90H | c/n | Emulsionante, protege la piel, parte de FNH[27] |
| c/n: Cantidad necesaria | | |
| FNH: Factor Natural de Hidratación | | |

PREPARACIÓN DE LAS EMULSIONES S (CON SULFADIAZINA DE PLATA)

Estas emulsiones tienen la misma formulación general reportada en la tabla 4. Pero en este caso cada emulsión cuenta con una dosis de 1% de sulfadiazina de plata (SFP).

Se prepararon lotes de 100g de cada ejecución.

Se siguió el mismo procedimiento que para las emulsiones F, pero en este caso la proporción de SFP se añadía a la fase oleosa, para evitar su descomposición en agua.

Cada emulsión se almacenó en un frasco de vidrio color ámbar y se dejaron reposar durante 72 horas en un sitio oscuro para protegerlas de la luz.

El Phospholipon 90H[®] (Fosfatidilcolina hidrogenada de soya al 90%, American Lecithin Company) se obtuvo de una donación por parte de Merk de México. El Monoesterarato de glicerilo y el Polietilenglicol 400 se obtuvieron de la droguería Cosmopolita. La sulfadiazina de plata (98%) se obtuvo de Sigma Aldrich. El resto de los aditivos de la formulación se obtuvieron de la droguería Cosmopolita, grado cosmético.

EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LAS EMULSIONES F

La estabilidad se realizó de dos maneras diferentes. Inicialmente se hacían observaciones a las 24, 48 y 72 horas, en las que se observaba la separación de cada una de las emulsiones, después de 96 horas se agitaban suavemente las nueve emulsiones para reconstituirlas y se llevaban a tubos de centrifuga por duplicado. Se centrifugaban a 3000 rpm durante 30 minutos a 23°C siguiendo el procedimiento recomendado por la guía AMVISA para estabilidad preliminar [28].

De acuerdo a estas observaciones se tomó en cuenta que una emulsión que sufría separación durante las primeras 72 horas se calificaba de 0 a 4, aquellas que no se separaban en ese lapso pero si después de la prueba de estabilidad preliminar obtenían de 5 a 9 y aquellas que no se

separaron al salir de la centrifuga se calificaban con 10. Esto con el fin de obtener datos numéricos para su posterior evaluación estadística.

EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LAS EMULSIONES S

La evaluación de la estabilidad preliminar se llevó a cabo de acuerdo a lo indicado en la guía ANVISA de estabilidad de productos cosméticos. Se pesaban cantidades iguales de cada una de las emulsiones por duplicado en tubos de centrifuga transparentes, se centrifugaron a 3000 rpm durante 30 minutos.

Transcurrido este tiempo se observaba si había o no separación, midiendo la altura desde la base del tubo hasta la superficie de la emulsión y la altura desde la base del tubo hasta la interfase de separación. Después con tubos vacíos e iguales, se añadía agua a la altura baja y se pesaba, después se añadía agua necesaria para alcanzar la altura mayor y se pesaba de nuevo. Este procedimiento se repitió para todos los tubos.

Se calculó el porcentaje separado, y este se restó al 100%. Considerando que el 100% corresponde a una emulsión que no se separó después de la prueba.

DETERMINACIÓN DE LA VISCOSIDAD

Para la determinación de la viscosidad de ambos experimentos, se utilizó un viscosímetro CAP 2000 Brookfield utilizando el cono 1 a 50 rpm y una temperatura de 25°C

EVALUACIÓN ESTADÍSTICA

Se realizó la evaluación estadística de cada diseño experimental utilizando el software Statgraphics Centurion XVI (versión 16.1.11).

VI . RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

A continuación se presentan y discuten los resultados de la elaboración y obtención de las emulsiones con y sin sulfadiazina de plata. A su vez, se presentan los análisis estadísticos para ambos casos y se discuten los resultados de estos análisis.

RESULTADOS DE LAS EMULSIONES F

El objetivo de este diseño experimental inicial, era conocer el comportamiento de los emulsionantes/estabilizadores seleccionados para la formulación y sus interacciones, a través de las dos respuestas de interés: Viscosidad y Estabilidad preliminar.

La tabla 5 muestra el diseño experimental realizado, las cantidades de cada factor estudiado en gramos y las respuestas medidas.

En este caso los resultados de la prueba de estabilidad se decidieron de manera cualitativa, sólo a partir de la observación de los tubos después de salir de la centrifuga. De este modo se decidió que la emulsión F5 que se muestra en la figura 11.1 era la que había sufrido la separación más marcada de todas, además fue la primer emulsión en separarse (antes de 24 h) por otra parte en la figura 11.2 se muestran la emulsión F2 que sufrió separación durante las primeras 72 horas.

Aunque se aprecia una separación muy similar en ambas imágenes, no se puede decir que el efecto de las cantidades de los emulsionantes sea la misma, debido a que la emulsión F2 soportó mayor tiempo antes de sufrir coalescencia, y esto puede ser indicativo del efecto de la mezcla de los emulsionantes en conjunto sobre la estabilidad de la emulsión. Mientras que la formulación F5 tenía el nivel bajo de Phospholipon 90H[®] y MEG pero el nivel alto de PEG, podría suponerse que esto haría una

emulsión más estable que la formulación F2, que tiene todos los niveles bajos, lo cual sugiere que existe una interacción entre los emulsionantes (que se analizará más adelante con el ANOVA.), es decir que existe una relación entre las diferentes proporciones de emulsionantes.

Tabla 5. Diseño experimental sin Sulfadiazina de plata y los resultados de la medición de las respuestas

| Ejecución | A: Phospholipon 90H [®] (g) | MEG (g) | PEG 400 (g) | Estabilidad | Viscosidad (cP) |
|-----------|---|------------|----------------|-------------|--------------------|
| F1 | 3.0 | 0.65 | 1.75 | 5 | 617 |
| F2 | 1.0 | 0.3 | 0.5 | 3 | 530 |
| F3 | 5.0 | 1.0 | 3.0 | 8 | 1010 |
| F4 | 5.0 | 0.3 | 0.5 | 7 | 790 |
| F5 | 1.0 | 1.0 | 3.0 | 0 | 563 |
| F6 | 5.0 | 0.3 | 3.0 | 10 | 1550 |
| F7 | 5.0 | 1.0 | 0.5 | 9 | 786 |
| F8 | 1.0 | 1.0 | 0.5 | 6 | 976 |
| F9 | 1.0 | 0.3 | 3.0 | 7 | 913 |

Una buena evaluación de este tipo de diferencias entre las formulaciones otorga más opciones como niveles de respuesta, lo cual facilita el análisis estadístico y reduce el error.

Las figuras 11.3 y 11.4 corresponden a las formulaciones F3 y F9, que se separaron al salir de la centrifuga.



Figura 11.1
Formulación F5 muestra
una separación total en tres
fases.



Figura 11.2
F1 que sufrió separación en
tres fases durante las
primeras 72 horas



Figura 11.3
Formulación F3, se
observa separación
pero no diferentes
fases.



Figura 11.4
Formulación F9 se
observa una
separación pequeña en
la parte superior.



Figura 11.5
Formulación F6 no se
observa separación.

En los tubos de la emulsión F3 se observa una pequeña separación al fondo del tubo sin embargo no se observan fases como se puede apreciar claramente en la figura 11.1, lo cual puede sugerir que estamos cerca de llegar a una emulsión estable, por lo cual se decidió dar el valor de 8. Por otra parte en la figura 11.4, se observa una pequeña separación, lo cual indica que una parte de menor densidad, es decir la fase oleosa flocló en la parte superior del tubo, probablemente este fenómeno de separación se dio debido a una deficiencia en la proporción de los emulsionantes para formar una película estable sobre la fase interna de la emulsión [1], por lo cual la fase inferior se observa opaca y homogénea como se espera de una emulsión estable, como lo es la emulsión F6.

Finalmente la figura 11.5 muestra la formulación F6 que fue completamente estable.

La variabilidad en las proporciones de los emulsionantes dio también una alta variabilidad en la viscosidad que van desde 530 cP hasta 1550 cP. La tabla 6 ordena las estabilidades de menor valor a mayor para facilitar la comparación con la viscosidad. Se puede observar que existe una relación directamente proporcional de la estabilidad con la viscosidad. Al aumentar la viscosidad de la fase continua se reduce la posibilidad de que dos gotas se encuentren con rapidez y se junten (coalescan o se agreguen), lo que puede indicar que la estabilidad se ve afectada por el aumento de la viscosidad [14]. Pero por las ligeras diferencias que se observan entre, por ejemplo, la formulación F5 y F2 o más evidente entre las formulaciones F8, F4, F7 y F9, no puede asegurarse que el aumento de la viscosidad aumente la estabilidad o viceversa.

En el supuesto de que una mayor proporción de emulsionantes produce una mayor estabilidad; la formulación F3, presenta los niveles altos de

todos los emulsionantes pero no una mejor estabilidad comparada con la formulación F6 que presenta el nivel bajo para MEG y alto para los otros dos emulsionantes. Es más estable pero también más viscosa, entonces sólo en este caso puede sugerirse que existe una relación entre la viscosidad y la estabilidad o bien, que los niveles de MEG tienen un efecto sobre la estabilidad.

El análisis estadístico permite resolver estas interrogantes, al determinar el efecto de cada emulsionante sobre la estabilidad y la viscosidad. Además se puede conocer la interacción que existe entre los emulsionantes, evaluando estas respuestas.

Tabla 6. Estabilidades de menor valor a mayor

| Emulsión | Estabilidad | Viscosidad |
|----------|-------------|------------|
| F5 | 0 | 563 |
| F2 | 3 | 530 |
| F1 | 5 | 617 |
| F8 | 6 | 976 |
| F4 | 7 | 790 |
| F9 | 7 | 913 |
| F3 | 8 | 1010 |
| F7 | 9 | 786 |
| F6 | 10 | 1550 |

ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LAS FORMULACIONES SIN SULFADIAZINA DE PLATA.

Una vez que todas las emulsiones fueron realizadas y se midieron cada una de las respuestas del diseño, se realizó un análisis de varianza (ANOVA), para evaluar el efecto sobre la estabilidad, el efecto sobre la viscosidad y finalmente se realizó una optimización de respuesta múltiple para determinar la combinación de factores experimentales que optimizan simultáneamente las respuestas. Los resultados se muestran a continuación.

Efecto sobre la estabilidad

La tabla de Análisis de varianza (tabla 7) muestra la variabilidad de cada factor sobre la estabilidad. Luego prueba la significancia estadística de cada efecto por comparación del cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso ningún efecto tiene valor P menor a 0.05.

Tabla 7. Resultados del ANOVA para la estabilidad.

| Fuente de Variabilidad | Suma de cuadrados | gl | CM | F | Valor P |
|--|-------------------|----|------|-------|---------|
| A: Phospholipon | 40.5 | 1 | 40.5 | 13.75 | 0.0656 |
| B: MEG | 4.5 | 1 | 4.5 | 1.53 | 0.3419 |
| C: PEG | 0.5 | 1 | 0.5 | 0.17 | 0.7202 |
| AB | 0.5 | 1 | 0.5 | 0.17 | 0.7202 |
| AC | 0.5 | 1 | 0.5 | 0.17 | 0.7202 |
| BC | 24.5 | 1 | 24.5 | 8.32 | 0.1021 |
| Error total | 5.9 | 2 | 2.9 | | |
| Total (corr.) | 76.8 | 8 | | | |
| R-cuadrada = 92.341% | | | | | |
| R-cuadrada (ajustado para gl.) = 69.364% | | | | | |
| Error estándar estimado = 1.716 | | | | | |

El valor R cuadrada ajustado por grados de libertad es un valor más apropiado para la comparación de modelos con diferentes números de variables independientes, que el valor de R cuadrada. Este valor indica si los resultados se ajustan adecuadamente al modelo utilizado para el análisis. El valor de 69.36% indica que hay un 30% de probabilidad de que la variabilidad en los resultados no puedan explicarse con los valores de los factores elegidos.

Ningún factor o interacción se considera estadísticamente significativo debido a que ninguno resultó tener un valor P menor a 0.05; es decir que ningún factor puede explicar la variabilidad de los resultados.

El análisis estadístico permite excluir algunos efectos que resultan menos significativos, al excluirlo se obtiene un grado de libertad extra

para el cálculo del error lo que mejora el ANOVA, de modo que se puede observar mejor, qué efectos sí son significativos de los que no. En este caso se decidió eliminar efecto C (en negritas), que además tiene un valor estimado de 0.0 (tabla 8).

Tabla 8. Efectos estimados para la estabilidad.

| Efecto | Estimado | Error Stnd. | V.I.F. |
|-----------------|----------|-------------|--------|
| Promedio | 6.11111 | 0.571979 | |
| A: Phospholipon | 4.5 | 1.21335 | 1.0 |
| B: MEG | -1.0 | 1.21335 | 1.0 |
| C: PEG | 0.0 | 1.21335 | 1.0 |
| AB | 1.0 | 1.21335 | 1.0 |
| AC | 1.0 | 1.21335 | 1.0 |
| BC | -3.5 | 1.21335 | 1.0 |

Tabla 9. El mejor ANOVA obtenido, tras la exclusión del factor C.

| Fuente de Variabilidad | Suma de cuadrados | gl | CM | F | Valor P |
|---|-------------------|----|------|-------|---------|
| A: Phospholipon | 40.5 | 1 | 40.5 | 20.63 | 0.0200 |
| B: MEG | 2.0 | 1 | 2.0 | 1.02 | 0.3871 |
| AB | 2.0 | 1 | 2.0 | 1.02 | 0.3871 |
| AC | 2.0 | 1 | 2.0 | 1.02 | 0.3871 |
| BC | 24.5 | 1 | 24.5 | 12.48 | 0.0386 |
| Error total | 5.9 | 3 | 1.9 | | |
| Total (corr.) | 76.9 | 8 | | | |
| $R^2 = 92.341 \%$ $R^2_{aj} = 79.5761 \%$ Error estándar estimado = 1.401 | | | | | |

Ahora se puede observar que el efecto A y la interacción BC, son significativos, el valor de R cuadrada ajustada aumentó y se considera aceptable. Mientras que los valores P para los demás factores aumentaron ligeramente (tabla 9).

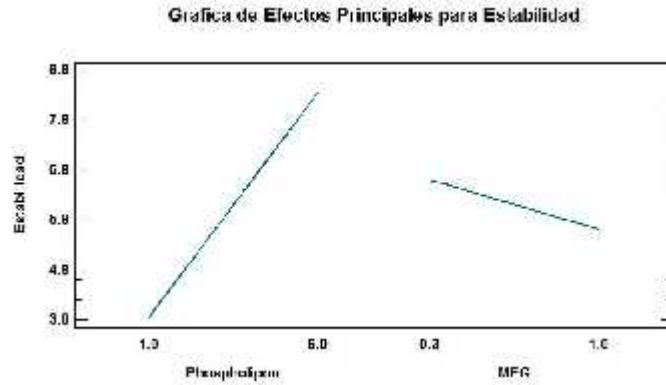
El error estándar estimado es de 1.4, cuando el estimado de un efecto es más grande que el doble del error estándar estimado, es indicativo de que el factor es importante [19]. De acuerdo a la tabla 8, en este caso sólo se considera el efecto, A y la interacción BC.

En la gráfica 1 la pendiente positiva del Phospholipon 90H[®] muestra un efecto sobre la estabilidad, esto es que a mayores cantidades mayor estabilidad. Por otro lado la pendiente negativa del MEG indica un efecto inverso sobre la estabilidad. El PEG muestra una pendiente de cero (tabla 8) lo que indica que el efecto individual del PEG sobre la emulsión es nulo.

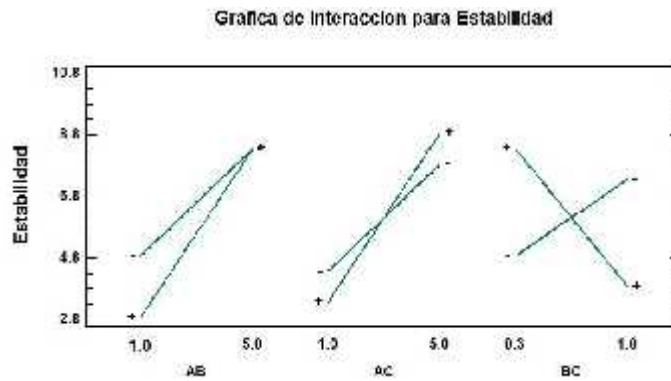
Este efecto nulo no es indicativo de que no exista una función dentro de la formulación, éste únicamente señala que por sí solo no tiene un efecto; también se debe considerar el efecto de interacción entre los emulsionantes. Se ha demostrado que se obtienen emulsiones más estables cuando se utilizan combinaciones de emulsionantes solubles en agua con emulsionantes solubles en aceite [29]. Lo que explica la interacción del PEG con el MEG que se observa en la gráfica 2.

Al usar los efectos como sumas de variables aleatorias los efectos no significativos deben seguir una distribución normal con media igual a cero y varianza constante. Esto significa que en la gráfica de probabilidad media normal (gráfica 3); los efectos que están distribuidos normalmente (B, C, AB, AC) son irrelevantes, mientras que los efectos significativos aparecen alejados de la línea de normalidad (A y BC).

Cuando se tienen efectos positivos y negativos y cuando el diseño se corre con muy pocos factores, es mejor utilizar la gráfica de probabilidad media normal que la gráfica de probabilidad normal [22].



Gráfica 1 Efectos de cada factor sobre la estabilidad.



Gráfica 2. Interacción de los factores para la estabilidad. A: Phospholipon B:MEG y C: PEG



Gráfica 3. Probabilidad Media Normal para la Estabilidad. A: Phospholipon B:MEG y C: PEG

El efecto significativo individual de A contra el efecto individual de B o C, no implica que sea el único emulsionante que interviene en la estabilidad de la emulsión. Una mezcla de emulsionantes de diferentes características físicas y químicas interactúan, en la formación de una película interfacial estable. Este efecto puede estar relacionado a la geometría de empacado de las moléculas de emulsionante, que es la proporción entre volumen del área de la cabeza y la longitud de la cola [30]. Para la lecitina (fosfatidilcolina) este parámetro tiene un valor de 0.8 y aumenta si la fase oleosa penetra dentro de las cadenas alquílicas de la molécula. Una posible manera de reducir este parámetro es añadiendo un segundo emulsionante más hidrófilo [29, 31], en este trabajo se añadió el PEG. Se ha demostrado que la mezcla de fosfatidilcolina con PEG aumenta la estabilidad de emulsiones [32, 33].

En la gráfica 2 se puede observar que el efecto del Phospholipon 90H[®] sobre la estabilidad se ve afectado por la proporción de PEG. Además el extremo de línea más alto en la escala de estabilidad corresponde claramente a la combinación A+C+. En esta misma grafica también se puede notar la interacción entre B y C, en este caso la combinación más estable corresponde a la combinación B-C+. Finalmente la combinación AB indica que la proporción de B tiene un efecto nulo sobre A y en este caso se considera que no hay interacción.

La combinación de fosfatidilcolina con emulsionantes no iónicos puede incrementar el tamaño de partícula. Cavalli et al. [34], utilizaron ácido esteárico, un emulsionante no iónico (tween 80) y fosfatidilcolina como sistema emulsionante. El tamaño de partícula fue mucho más grande cuando se comparaba con el mismo sistema pero con un emulsionante iónico. Trota et al.[35], probaron también un sistema emulsionante de fosfatidilcolina con una sal biliar, alcohol bencílico o lactato de butilo y un 2.5-10% de monoestearato de glicerilo, encontraron que el tamaño

de partícula disminuía al disminuir la proporción de MEG. Esto puede explicar que no exista interacción AB, sin embargo esto no implica que el MEG no intervenga en la estabilidad, mas bien indica que el sistema emulsionante funciona mejor en proporciones bajas de MEG.

El efecto que se observa para el factor A (graficas 1 y 3 y tabla 9) se puede explicar en parte con los trabajos de Pichot et al.[36]: ellos demostraron como la fosfatidilcolina forma una película elástica y viscosa, que resistiría mejor la coalescencia. Por otro lado, se sabe que cuando una gota de fase interna está cargada positiva o negativamente, incrementa la repulsión de las gotas y por lo tanto disminuye la agregación y coalescencia [37]. En el trabajo de Rydhag y Wilton, muestran como la composición de la fosfatidilcolina afecta la estabilidad, añadiendo fosfolípidos cargados negativamente e incrementando la estabilidad por incremento de la repulsión [38].

En la formulación utilizada en este trabajo, el ácido láctico aporta una concentración de protones (H^+). La fosfatidilcolina es un emulsionante zwitteriónico, en un medio ácido, la carga positiva de la cabeza polar de la molécula predomina (figura 12). La figura 13a intenta explicar esta teoría.

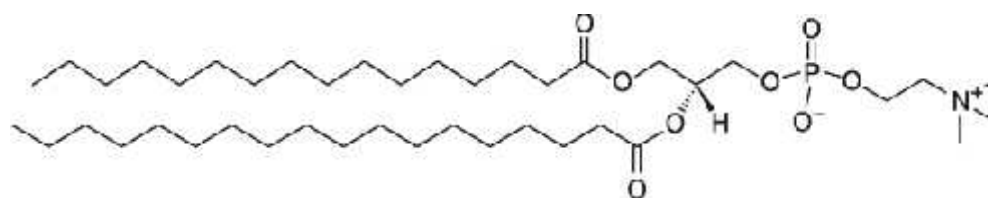


Figura 12. Molécula de Fosfatidilcolina hidrogenada.

Entonces la estabilidad estaría determinada mediante tres acciones, 1: el impedimento repulsivo aportado por el Phospholipon, 2: La incorporación de dos emulsionantes de diferente HLB y, 3: las

interacciones de Phospholipon con los otros dos emulsionantes, forman una película más compacta, fuerte, elástica y menos impedida pero a menores proporciones de estos, mayor efecto repulsivo aportado por el Phospholipon y por lo tanto mejor estabilidad.

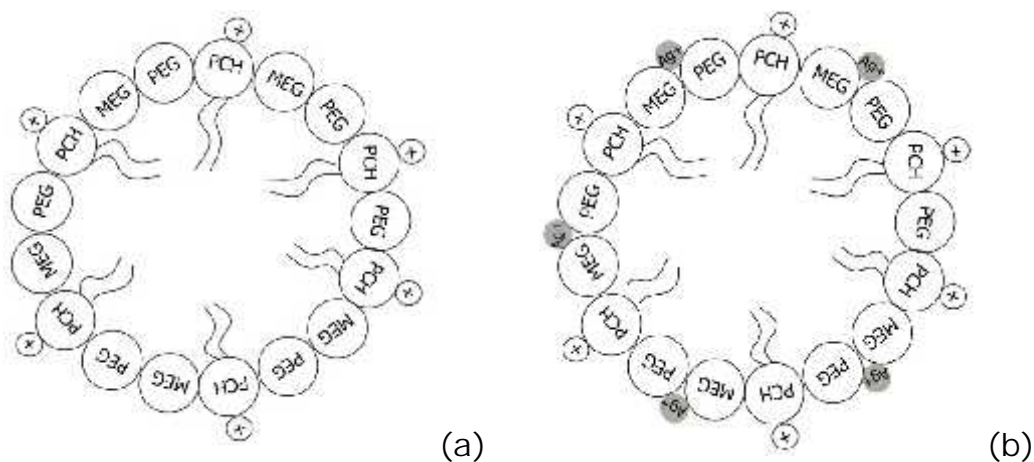
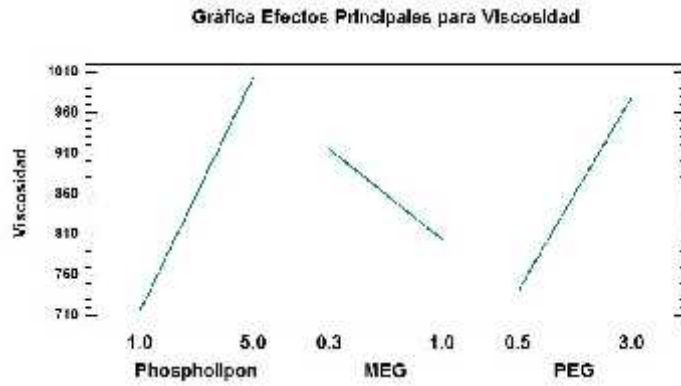


Figura 13. Representación de una micela suponiendo la forma más simple. (a) Muestra la micela formada por el sistema emulsionante del primer diseño. (b) muestra la micela con iones plata (Ag^+)

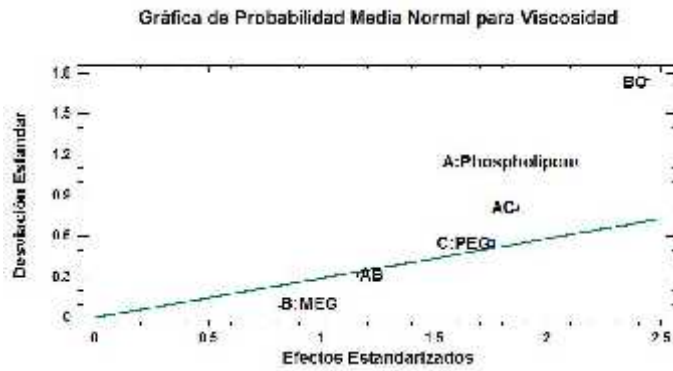
Efecto sobre la viscosidad

En este análisis se encontró que todos los emulsionantes tienen un efecto individual sobre la viscosidad (gráfica 4), las pendientes positivas del Phospholipon y PEG indican que tiene una tendencia a aumentar la viscosidad mientras que se aumente la proporción de éstos. Para el caso del MEG muestra una tendencia disminuir la viscosidad.

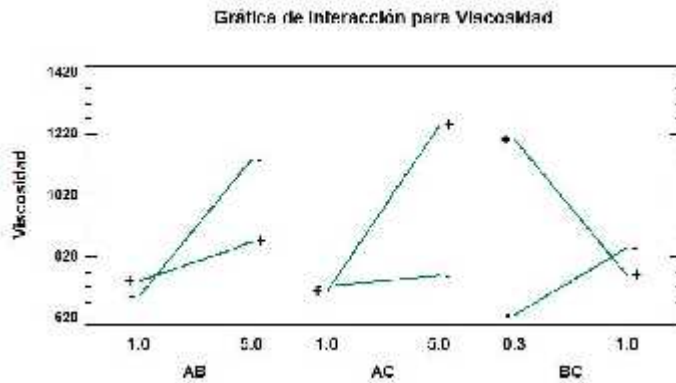
Por otro lado en la gráfica de Probabilidad Media Normal (gráfica 5) se puede observar que únicamente el efecto del Phospholipon y la interacción entre MEG y PEG (BC), se encuentran un poco alejados de la línea de probabilidad normal y por lo tanto pueden ser significativos; sin embargo no se puede asegurar que la interacción sea significativa o se deba al azar.



Gráfica 4. Efectos principales para la viscosidad.



Gráfica 5. Gráfica de Probabilidad Media Normal para la viscosidad. A: Phospholipon B: MEG y C: PEG



Gráfica 6. Interacción del Phospholipon con PEG para la viscosidad A: Phospholipon B: MEG y C: PEG

En la gráfica 6 se puede notar que el efecto del factor A no se ve afectado y no muestra un aumento significativo en la viscosidad cuando las proporciones de PEG están en el nivel bajo. Esto indica que el cambio de la viscosidad en la interacción se da únicamente en el nivel alto de PEG y la viscosidad más baja está en la interacción A- C+, aunque la viscosidad de la mezcla A- C- es en realidad casi igual. Por lo tanto no hay interacción para la mezcla AC.

También se puede observar que las mezclas de AC y BC en el nivel alto de C, son las que tienen mayor efecto en el cambio de la viscosidad mientras que el nivel bajo resulta en viscosidades bajas y a variar poco la viscosidad cuando se cambian las proporciones de los otros dos emulsionantes. Aunque el Polietilenglicol se utiliza como agente viscosante en formas líquidas [37], no se puede atribuir un efecto individual sobre la viscosidad.

Existe una clasificación que divide a los fosfolípidos en 4 categorías. La fosfatidilcolina se encuentra en la categoría II, no es soluble en agua pero se hincha en soluciones acuosas [39]. A ciertas concentraciones de agua la fosfatidilcolina forma estructuras micelares y después estas estructuras se reacomodan en un arreglo tipo gel [40]. Debido al método en que las emulsiones fueron preparadas, se puede suponer que una parte de la fosfatidilcolina permaneció en esta estructura, lo cual explicaría el efecto de aumento de la viscosidad al aumentar la proporción de ésta.

OPTIMIZACIÓN DE RESPUESTA MÚLTIPLE PARA LAS FORMULACIONES SIN SULFADIAZINA DE PLATA.

Este procedimiento ayuda a determinar la combinación experimental de factores que optimizan simultáneamente varias respuestas. Lo hace maximizando una función deseada.

Como ya se mencionó, el objetivo de este diseño experimental era obtener una emulsión estable con una viscosidad baja. Las tablas 9 y 10 muestran los resultados de la optimización. La tabla 10 muestra la combinación de los factores que maximizan la función así mismo muestra la combinación de factores a los cuales el nivel óptimo se alcanza. En la tabla 11 se muestran los resultados óptimos que podrían obtenerse en los niveles de este experimento.

Tabla 10. Resultados de la optimización de respuesta múltiple. Muestra los niveles para alcanzar el resultado óptimo (maximizar la estabilidad y disminuir la viscosidad).

| Factor | Bajo (%) | Alto (%) | Óptimo (%) |
|-------------------------------|----------|----------|------------|
| Phospholipon 90H [®] | 1.0 | 5.0 | 5.0 |
| MEG | 0.3 | 1.0 | 1.0 |
| PEG | 0.5 | 3.0 | 0.5 |

Tabla 11. Resultados de la optimización de respuesta múltiple. Muestra el resultado predicho a partir de las condiciones óptimas.

| Respuesta | Óptimo |
|-----------------|--------|
| Estabilidad | 9.61 |
| Viscosidad (cP) | 788.19 |

Después de obtener estos resultados de la combinación óptima de emulsionantes, se planteó un segundo diseño. Debido a que el efecto del Phospholipon 90H[®] resultó ser el factor que tuvo el mayor efecto para ambas respuestas y que en el nivel alto presentó mejores estabilidades se decidió trabajar el nivel alto de nuevo y para el nivel bajo debería

estar por encima del punto medio entonces se eligió 4.0% como el nivel bajo.

La interacción BC resultó también tener un efecto significativo para las respuestas, además en el caso de la viscosidad las combinaciones AB y AC muestran una interacción que aunque no son significativas no puede asegurarse que se deban al azar o al error experimental. Por estos motivos se decidió trabajar los mismos niveles del primer diseño.

RESULTADOS DE LAS EMULSIONES CON SULFADIAZINA (S)

La tabla 12 muestra el segundo diseño experimental y los resultados de las respuestas medidas.

Otra de las ventajas del diseño experimental es la posibilidad de determinar aquellos factores que pudieron afectar las respuestas y por lo tanto el análisis estadístico, de esta manera futuros experimentos se podrán realizar de manera más óptima.

En esta ocasión se decidió medir la estabilidad en una escala cuantitativa indirecta, a manera de obtener resultados más exactos para el análisis estadístico. Se puede observar de la tabla 12 que las formulaciones S5, S6, S7 y S9 son repeticiones del primer diseño, si se comparan los resultados de estabilidad para estas formulaciones con los de la tabla 5.

La evaluación de la estabilidad con este método, intentó ser más exacto, al medir el porcentaje de separación de las emulsiones. Mientras que el primero evaluaba la separación desde la observación y el tiempo, el segundo método mide la proporción de la emulsión separada después de la prueba. Esta proporción se puede ver como la cantidad de la formulación total que se puede emulsionar con las proporciones de emulsionantes presentes.

Este método de medición de la estabilidad resultó más exitoso pues los datos se ajustaron mejor al modelo estadístico sin afectar la tendencia de la estabilidad.

Tabla 12. Resultados del diseño experimental con Sulfadiazina de plata y los resultados de la medición de las respuestas.

| Ejecución | Phospholipon (%) | MEG (%) | PEG 400 (%) | Estabilidad (%) | Viscosidad (cP) |
|-----------|------------------|---------|-------------|-----------------|-----------------|
| S1 | 4.0 | 0.30 | 3.00 | 74.86 | 1065 |
| S2 | 4.0 | 1.00 | 0.50 | 78.34 | 900 |
| S3 | 4.0 | 0.30 | 0.50 | 83.35 | 690 |
| S4 | 4.5 | 0.65 | 1.75 | 82.80 | 1376 |
| S5 | 5.0 | 0.30 | 3.00 | 81.35 | 1323 |
| S6 | 5.0 | 1.00 | 0.50 | 100.00 | 926 |
| S7 | 5.0 | 1.00 | 3.00 | 95.45 | 1077 |
| S8 | 4.0 | 1.00 | 3.00 | 73.78 | 863 |
| S9 | 5.0 | 0.30 | 0.50 | 80.19 | 1763 |

Otra opción para evaluar la estabilidad, sería dar valor de cero a las emulsiones separadas (ya que es el efecto indeseable) y el valor de 1 a las que no se separaron. Este método tiene el defecto de aportar muy poca información al análisis estadístico, como ya se había mencionado antes, es necesario encontrar la manera de reportar cada separación como un comportamiento diferente lo que además permitirá disminuir el error estadístico. Cuando hay poca variación en la variable de respuesta el ANOVA se ve afectado y resulta en valores de R cuadrada muy pequeños [19]. Existen métodos cuantitativos más específicos para medir la estabilidad. Uno es el propuesto por Trotta, et.al.[29]: ellos monitorearon el descenso de un marcador lipofílico dentro de la emulsión a un nivel específico, y observaron la coalescencia con el tiempo.

Anteriormente ya se había discutido la posibilidad de que una viscosidad alta aumentara la estabilidad de las emulsiones por disminución en el

movimiento browniano de las partículas. Por otra parte en una emulsión, el menor tamaño de partícula y por lo tanto la menor viscosidad resultan en una alta estabilidad [41]. De la tabla 1 la formulación F7 presentó una buena estabilidad y baja viscosidad y de la tabla 11 la formulación S6 presenta las mismas características. No obstante en ambos diseños se obtienen también viscosidades muy bajas o bien similares de emulsiones que no son estables.

La viscosidad de una emulsión depende también de diversos factores como la proporción de fase interna, la fuerza de cizalla al preparar la emulsión, la distribución del tamaño de gota y la naturaleza de la fase interna [1, 41]. Como ejemplo las formulaciones S6 y S7, tuvieron las estabilidades más altas pero presentaron viscosidades diferentes, sin embargo guardan una relación: las proporciones de A y B son iguales, pero C está en la proporción más baja para la mejor estabilidad y menor viscosidad, lo que indica que se necesitaban menores proporciones de PEG para obtener la mejor estabilidad. Los resultados sugieren entonces que el exceso de PEG se disolvió en la fase externa causando un aumento en la viscosidad [42, 43].

Debido a esto no se puede asegurar el efecto o la relación de la viscosidad sobre la estabilidad. La viscosidad se evaluó como respuesta del diseño, únicamente como una característica organoléptica de la emulsión.

El conocimiento estadístico no es suficiente para el diseño experimental, se requiere también un buen nivel de conocimiento técnico y práctico acerca del problema planteado o proceso que se desea estudiar, de tal manera que se puedan encontrar los aspectos clave y se puedan plantear conjeturas precisas, analizar el tipo de relaciones entre las variables de respuesta y los posibles factores a estudiar.

Efecto sobre la estabilidad y evaluación del diseño experimental. En el análisis de varianza (tabla 13) es notable el aumento en el valor de la R cuadrada ajustada, lo cual indica que los datos se ajustaron mejor al modelo comparados con el valor del primer modelo. Además el Phospholipon, el MEG y la interacción AB resultaron ser significativos.

Tabla 13. ANOVA para la estabilidad de las formulaciones S

| Fuente de varianza | Suma de Cuadrados | gl | Cuadrado Medio | F | Valor P |
|--|-------------------|----|----------------|-------|---------|
| A: Phospholipon | 272.144 | 1 | 272.144 | 45.54 | 0.0213 |
| B: MEG | 96.744 | 1 | 96.744 | 16.19 | 0.0566 |
| C: PEG | 33.784 | 1 | 33.784 | 5.65 | 0.1405 |
| AB | 200.0 | 1 | 200.0 | 33.47 | 0.0286 |
| AC | 11.664 | 1 | 11.664 | 1.95 | 0.2972 |
| BC | 0.3961 | 1 | 0.3961 | 0.07 | 0.8209 |
| Error Total | 11.952 | 2 | 5.9762 | | |
| Total (corr.) | 626.686 | 8 | | | |
| R cuadrada = 98.09 % | | | | | |
| R cuadrada (ajustado para gl.) = 92.37 % | | | | | |
| Error Estándar del est. = 2.44 | | | | | |

Al comparar los valores del efecto estimado (tabla 14) contra el doble del error estándar encontramos que el efecto A, B y la interacción AB son importantes, lo cual refuerza la información aportada en el ANOVA. En la gráfica 9 se puede apreciar como estos factores se alejan de la línea de probabilidad normal, coincidiendo con el ANOVA.

Tabla 14. Efectos estimados para la estabilidad de las formulaciones S.

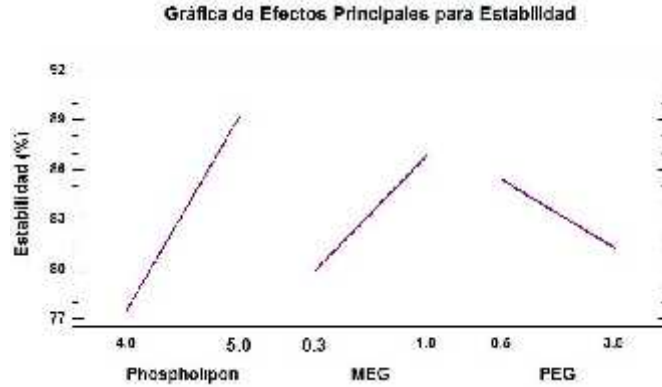
| Efecto | Estimado | Error Stnd. | V.I.F |
|-----------------|----------|-------------|-------|
| promedio | 83.3467 | 0.8148 | |
| A: Phospholipon | 11.665 | 1.7286 | 1.0 |
| B: MEG | 6.955 | 1.7286 | 1.0 |
| C: PEG | -4.11 | 1.7286 | 1.0 |

| | | | |
|----|--------|--------|-----|
| AB | 10.0 | 1.7286 | 1.0 |
| AC | 2.415 | 1.7286 | 1.0 |
| BC | -0.445 | 1.7286 | 1.0 |

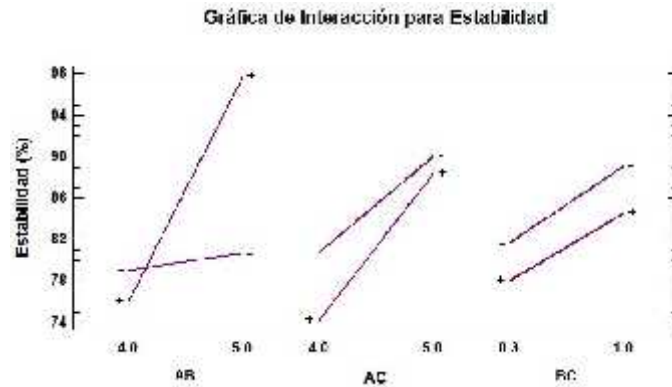
Si que se hubiera hecho un experimento secuencial. En esta situación dejaríamos el nivel de MEG constante en 1.0% que son los experimentos S2, S6, S7 y S8, en éstos se varían las proporciones de Phospholipon y PEG, y se obtienen como resultados estabilidades que van del 73% al 100%. Al obtener el resultado de la formulación S2 entonces se variarían los niveles de los otros dos emulsificantes en diferentes cantidades y podrían pasar cierto número de experimentos hasta llegar al resultado de la ejecución S6.

Supongamos que con solo 4 experimentos se llega al objetivo deseado, entonces con los pocos datos obtenidos, no se podría hacer un análisis que pudiera determinar científicamente el comportamiento individual y las interacciones entre los emulsionantes. Es por esto que el diseño experimental aporta mucho conocimiento con menores recursos.

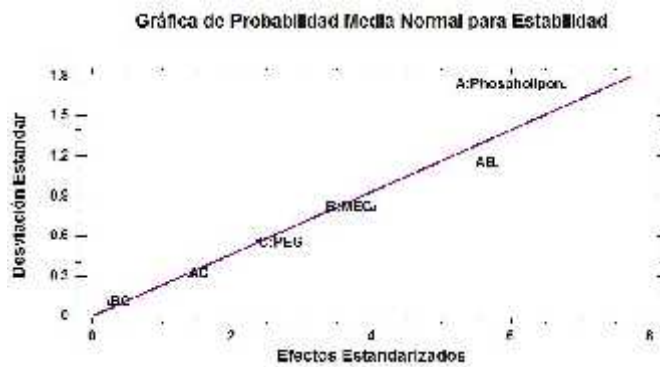
Se puede observar en la gráfica 7 que el efecto del Phospholipon es el mismo que en el primer experimento, donde además ya se había confirmado que el efecto de éste era significativo, esto se puede también apreciar en la gráfica 8.



Gráfica 7. Efectos Principales para la estabilidad de las formulaciones con sulfadiazina de plata.



Gráfica 8. Interacción para la estabilidad de las formulaciones con sulfadiazina de plata. A: Phospholipon B: MEG y C: PEG



Gráfica 9. Gráfica de Probabilidad Media Normal para la estabilidad de las formulaciones con sulfadiazina de plata. A: Phospholipon B: MEG y C: PEG

Por otra parte el cambio en la pendiente del MEG es notable, esto puede deberse a que se cambió la proporción de Phospholipon y el método de medición de la estabilidad o, al efecto de la SFP. La misma situación se repite con el PEG. Este comportamiento se puede apreciar también en la gráfica 8.

El cambio de método de medición de la estabilidad sobre los resultados del diseño ya fue discutido en las páginas anteriores. El cambio en la proporción de Phospholipon puede ser aparentemente diferente en ambos diseños, pero en realidad los resultados del primer diseño deberían reflejar los resultados del segundo diseño.

Si analizamos una vez más la gráfica 2 y esta vez nos centramos en la sección de proporción de Phospholipon ~4-5% y lo comparamos con la gráfica 8, deberían de ser muy parecidas. Si analizamos la mezcla AB, en realidad no son tan diferentes, el nivel alto de B cambia gradualmente con respecto al aumento de A. mientras que en el nivel bajo la estabilidad varía muy poco.

En cambio la comparación de la mezcla AC es diferente. Mientras que la tendencia en el cambio de la estabilidad se mantiene para cada nivel de C, en esta ocasión el nivel alto de C resultó dar la mejor estabilidad, este cambio también se puede apreciar en la gráfica 7. Además se puede observar marcadamente en la desaparición de la interacción BC.

Por lo tanto este cambio puede atribuirse únicamente a la adición de sulfadiazina de plata. Este antibiótico es insoluble en aceite y tiene una baja solubilidad en agua aunque aumenta con el descenso del pH [44]. Como se muestra en la figura 14, la sulfadiazina consiste en sulfadiazina desprotonada (SF^-) y plata (Ag^+), en presencia de agua, la molécula se hidroliza parcialmente, y la sulfadiazina se protona (SFH) [45]. Entonces la sulfadiazina queda disuelta en agua y el ion plata queda adsorbido en

la micela. Recordemos que la micela está cargada positivamente por la fosfatidilcolina, al añadir el catión plata que también es voluminoso, ocasiona repulsión entre las moléculas de los emulsionantes y desestabiliza la micela. Un comportamiento similar es descrito en el trabajo de Benita et al [46].

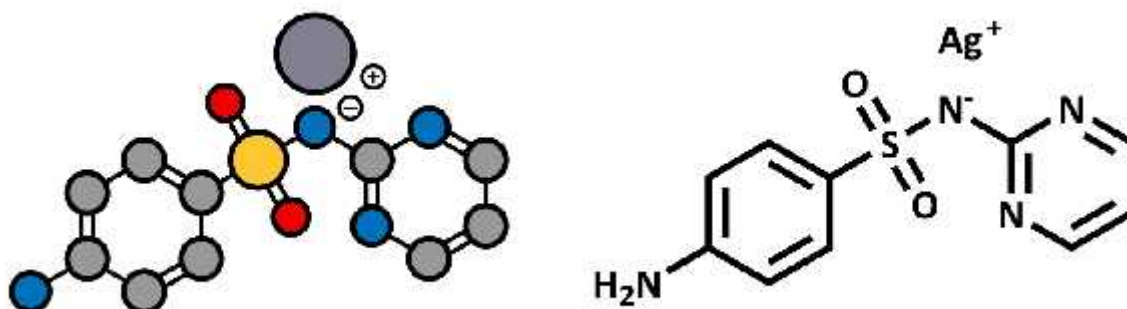


Figura 14. Molécula de Sulfadiazina de plata (SFP). La molécula de la izquierda representa los tamaños de cada elemento se puede notar como la Ag^+ es de mayor tamaño.

Los resultados observados en las gráficas 7-9 y la tabla 12 muestran que al aumentar la proporción de MEG la micela se estabiliza, probablemente al separar las cargas positivas. Lo cual explica que la interacción AB sea significativa. Esta fue la interacción más significativa, probablemente debido a la hidrofobicidad del MEG. La figura 13b intenta explicar esta teoría.

Para confirmar estas suposiciones, se podría realizar un estudio para medir el potencial Z de las emulsiones. Sin embargo no fue realizado al no ser el objetivo principal de este trabajo.

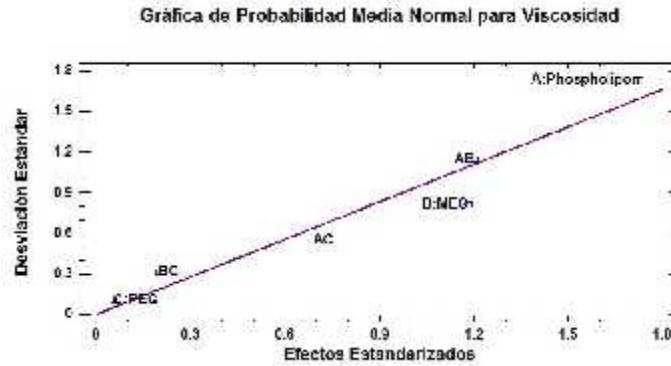
Efecto de la viscosidad

En la gráfica 10 se puede observar que ningún efecto se separó de la línea de probabilidad media y en el ANOVA (tabla 15) los valores de P de todos los efectos se encuentran por encima de 0.05, por lo cual el efecto de ningún factor es significativo. El valor de R cuadrada ajustado es sumamente bajo, lo que indica que los valores no se ajustan al modelo utilizado. Este valor de R cuadrada indica que el modelo tal como está explica solo el 4.38% de la variabilidad.

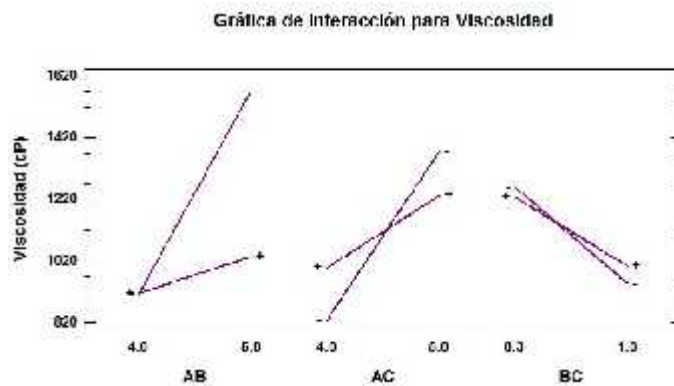
Se considera que en este caso los factores que se estudiaron no fueron adecuados para explicar el cambio de la viscosidad y que este cambio podría deberse a otros factores.

Tabla 15. ANOVA para la Viscosidad de las formulaciones con Sulfadiazina de Plata

| Fuente de Variabilidad | Suma de cuadrados | gl | Cuadrado Medio | F | Valor P |
|--|-------------------|----|----------------|------|---------|
| A: FCH | 308505.0 | 1 | 308505. | 3.00 | 0.2255 |
| B: MEG | 144453.0 | 1 | 144453. | 1.40 | 0.3578 |
| C: PEG | 300.125 | 1 | 300.125 | 0.00 | 0.9618 |
| AB | 148785. | 1 | 148785. | 1.45 | 0.3522 |
| AC | 49141.1 | 1 | 49141.1 | 0.48 | 0.5610 |
| BC | 4005.13 | 1 | 4005.13 | 0.04 | 0.8618 |
| Error total | 205818. | 2 | 102909. | | |
| Total (corr.) | 861008. | 8 | | | |
| R cuadrada= 76.0957 % | | | | | |
| R cuadrada (adjusted for d.f.) = 4.38281 % | | | | | |
| Standard Error of Est. = 320.794 | | | | | |



Gráfica 10. Gráfica de Probabilidad Media Normal para la viscosidad de las formulaciones con sulfadiazina de plata.



Gráfica 11. Gráfica de Interacción para la viscosidad de las emulsiones con Sulfadiazina de plata . A: Phospholipon B: MEG y C: PEG

Aunque las interacciones no son significativas en la gráfica puede notarse algo importante: el comportamiento de la interacción AB se conservó con la misma tendencia, pero las combinaciones AC y BC cambiaron.

OPTIMIZACIÓN DE RESPUESTA MÚLTIPLE

Antes de realizar la optimización de respuesta múltiple se realizó un análisis de varianza para estabilidad y para viscosidad, excluyendo aquellos factores o interacciones que resultaron ser menos significativos.

En el caso de la estabilidad se excluyó la combinación BC. La gráfica 12, muestra la interacción resultante para las otras dos combinaciones. No

se observó un cambio relevante en esta gráfica, sin embargo el error estándar disminuyó a 2.029 y el valor de R ajustada por grados de libertad aumenta a 94.745%. Además el valor P para el MEG disminuyó a 0.0167, lo que demuestra que el efecto del MEG es significativo si se considera que la interacción BC se debe al azar y por tanto podía no ser tomada en cuenta para el análisis.

Esta exclusión no tiene ningún significado experimental pero estadísticamente agrega grados de libertad al error lo que permite diferenciar mejor aquellos efectos que son significativos.



Gráfica 12. Gráfica de Interacción para la estabilidad, cuando se excluye la interacción BC del análisis. A: Phospholipon B: MEG y C: PEG

Para el análisis de la viscosidad se excluyó el factor C y la interacción BC, que presentaron los valores P más altos. Aunque ningún efecto resultó ser significativo, el error estándar disminuyó a 229.196 y el valor de R ajustada aumentó considerablemente a 51.1914%. Además el valor P para el Phospholipon disminuyó a 0.0725 por lo que ahora podría atribuirse a este factor el cambio de viscosidad.

Después de excluir estos factores se realizó el análisis de optimización de respuesta múltiple. En este caso se buscó únicamente maximizar la estabilidad, mientras que la viscosidad estaría determinada por este factor. La tabla 16 muestra las condiciones para el análisis. Mientras que

la tabla 17 muestra las proporciones de cada emulsionante para obtener la respuesta óptima que se observan en la tabla 18.

La Gráfica 13 muestra la superficie de respuesta estimada a una proporción constante de PEG. Se puede observar que el grado de deseabilidad aumenta cuando las proporciones de A y B son mayores.

Tabla 16. Condiciones para el análisis de optimización de respuesta múltiple.

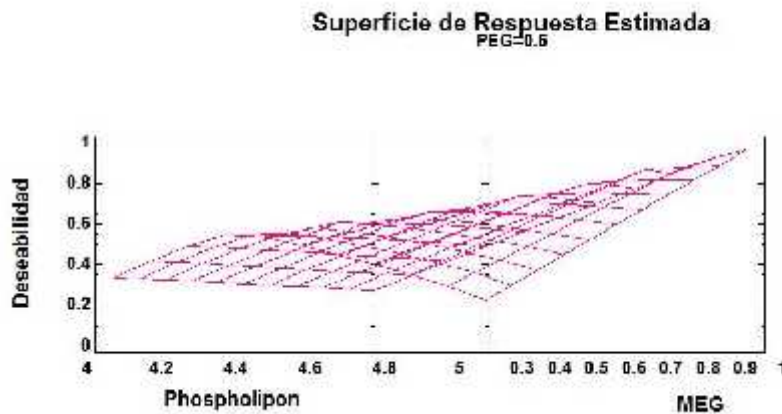
| Respuesta | Deseabilidad | | Objetivo |
|-----------------|--------------|----------|-----------|
| | Bajo (%) | Alto (%) | |
| Estabilidad (%) | 73.78 | 100.0 | Maximizar |
| Viscosidad (%) | 690.0 | 1763.0 | 1100.5 |

Tabla 17. Proporción sugerida de cada emulsionante

| Factor | Bajo (%) | Alto (%) | Óptimo (%) |
|-------------------|----------|----------|------------|
| Phospholipon 90H® | 4.0 | 5.0 | 5.0 |
| MEG | 0.3 | 1.0 | 0.9999 |
| PEG | 0.5 | 3.0 | 0.7040 |

Tabla 18. Estabilidad y Viscosidad predicha para una emulsión óptima.

| Respuesta | Óptimo |
|-------------|---------|
| Estabilidad | 98.3636 |
| Viscosidad | 1100.5 |



Grafica 13. Superficie de respuesta estimada.

Cuando se excluyen el factor C o las interacciones de este, es fácil suponer que al excluir experimentalmente el PEG, se lograría una buena estabilidad sólo con la mezcla Phospholipon-MEG. Pero en realidad lo que los resultados pueden indicar es que el factor PEG no se evaluó en los niveles adecuados, o bien, la elección del emulsionante no fue correcta, o simplemente que no tiene un efecto directo sobre la estabilidad.

Cuando un diseño factorial muestra este tipo de resultados, se recomienda cambiar la estrategia, por ejemplo se puede correr un nuevo análisis probando más factores, en un diseño factorial fraccionado o bien utilizar el método estadístico de superficie de respuesta.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos de los experimentos, se obtuvieron dos emulsiones estables, una de ellas sin sulfadiazina de plata (F6) y la segunda con el antibiótico (S6). Si bien la viscosidad no es la más baja de todas las emulsiones, ambas viscosidades no se pueden considerar altas, especialmente la emulsión S6.

El sistema emulsionante propuesto para estabilizar ambas fases de la formulación, resultó ser exitoso, si bien el análisis estadístico demuestra que se pudo optimizar este sistema, su uso era importante debido a las características de cada emulsionante. Ya que estos tienen una función extra además de estabilizar la emulsión.

El Phospholipon resultó ser el emulsionante que mayor efecto tuvo sobre la estabilidad en ambos diseños, el MEG y PEG, parecen intervenir en la formación de una película más fuerte, mejor empacada y menos impedida, de lo que sería una emulsión formada únicamente con lecitina. Otros investigadores han demostrado este mismo efecto utilizando diferentes sistemas emulsionantes al usado en este trabajo.

Las diferencias en cada diseño sobre la viscosidad, no muestra evidencias estadísticas contundentes para asegurar que el cambio de la viscosidad se debía a algún factor específico. Sin embargo las gráficas de interacción (que no se obtienen a partir de datos estadísticos), muestran que la viscosidad se veía afectada por las proporciones de cada emulsionante.

El diseño de experimentos resultó ser una herramienta útil y económica para el desarrollo de la emulsión, redujo el número de experimentos que se ejecutaron y además, reveló las interacciones que se dan entre los

componentes del sistema emulsionante y de manera individual, en diferentes proporciones de éstos.

El empleo de dos diseños de experimentos con y sin antibiótico, dio una perspectiva desde el punto de vista fisicoquímico de lo que sucede en una emulsión al añadir un compuesto que se ioniza en presencia de agua. Aunque esto no se midió como respuesta al diseño experimental y por lo tanto es solo una conjetura, un estudio para medir el potencial Z (o algún otro método) de las emulsiones con y sin antibiótico podría ser útil.

El uso de compuestos derivados de lecitina de soya como formadores de nanopartículas (nanoemulsiones o liposomas) ha sido ampliamente estudiado, la literatura disponible de su uso como formador de emulsiones (especialmente la fosfatidilcolina hidrogenada de soya) para el área farmacéutica es limitada y no muy actual. Sin embargo su uso industrial, especialmente en la industria cosmética es elevado

Este trabajo pretendió utilizar Phospholipon como emulsificante principal y funcional, para su uso en la curación de heridas cutáneas abiertas, las cuales tienen estratos de la piel destruidos lo que ocasiona una pérdida de agua y por lo tanto que la herida se seque complicando la curación. La fosfatidilcolina ayudaría a aumentar la humedad de la herida al mismo tiempo que actuaría como barrera para evitar la pérdida de agua. El resto de los componentes de la formulación pretenden ayudar a acelerar el proceso de la curación como reepitelizadores o desbridantes. Muchos tratamientos se deben llevar a cabo por un profesional y en ocasiones en un hospital. La mayoría de estos tratamientos son costosos y dolorosos para el paciente. Una emulsión de baja viscosidad pretende facilitar la aplicación del tratamiento y al tener agua como fase continua, es fácil de remover.

BIBLIOGRAFÍA

1. Wilkinson, J.B. and R.J. Moore, *Cosmetología de Harry*. 1990: Díaz de Santos.
2. Sheridan, R.L.P., Tania J. y Odo, Lillian M, *Alteraciones de la piel debido a factores físicos y químicos*, in *Fitzpatrick Dermatología en Medicina General*, K. Wolf, L.A. Goldsmith, and S.I. Katz, Editors. 2003, Editorial Medica Panamericana: España. p. 852-858, 878-886.
3. Page, E.H.E. *Descripción de las lesiones cutáneas*. (2016); Available from: <https://www.msdmanuals.com/es-mx/professional/trastornos-cut%C3%A1neos/abordaje-del-paciente-dermatol%C3%B3gico/descripci%C3%B3n-de-las-lesiones-cut%C3%A1neas>.
4. Resnik, K.S. and A.B. Ackerman, *On Standard Definitions of Individual Skin Lesions*. *JAMA Dermatology*, 1998. **134**(5): p. 636-637.
5. Cuenca-Pardo, J. and C.d.J. Álvarez-Díaz, *Tratamiento de quemaduras masivas con autoinjertos mallados y aloinjertos de epidermis humana cultivada in vitro. Reporte de un caso*. *Cirugía Plástica*, 1999. **9**(2): p. 78-82.
6. Blanco López, J.L., *Definición y clasificación de las úlceras por presión*. *El Peu*, 2003, vol. 23, núm. 4, p. 194-198, 2003.
7. Prado, A., P. Andrades, and S. Benitez, *Úlceras por Presión.*, in *Cirugía Plástica Esencial*, P. Andrades and S. Sepúlveda, Editors. 2005, Universidad de Chile: Santiago, Chile. p. 111-126.
8. Caruso, D.M., et al., *Randomized Clinical Study of Hydrofiber Dressing With Silver or Silver Sulfadiazine in the Management of Partial-Thickness Burns*. *Journal of Burn Care & Research*, 2006. **27**(3): p. 298-309.
9. Barón-Burgos, M., M. Benitez-Ramirez, and E. Escarvajal-Lopez, *Guía para la Prevención y Manejo de las UPP y Heridas Crónicas*, I.N.d.G. Sanitaria, Editor. 2015, Colección Editorial de Publicaciones del Instituto Nacional de Gestión Sanitaria: Madrid. p. 11-16.
10. Crowley, M.M., "Pharmaceutical Manufacturing", in *Remington The Science and Practice of Pharmacy* D. Troy, Editor. 2005, Lippincott Williams Wilkins.: USA. p. 759-763.
11. Mollet, H. and A. Grubenmann, *Formulation Technology Emulsions, Suspensions, Solid Forms*, in *Formulation Technology Emulsions, Suspensions, Solid Forms*. 2004, WILEY-VCH: Germany. p. 59-69.
12. Aranberri, I., et al., *Elaboración y caracterización de emulsiones estabilizadas por polímeros y agentes tensioactivos*. *Revista iberoamericana de polímeros*, 2006. **7**(3): p. 211-231.
13. Schramm, L.L., *Emulsions, Foams, and Suspensions: Fundamentals and Applications*. 2005, Weinheim, Germany: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 224-226.
14. Myers, D., *Surfaces, Interfaces, and Colloids Principles and Applications*. 2nd ed. 1999, United States: Wiley-VCH. 263-286
15. Juárez-Osornio, C., *Estructuras tipo emulsión lipídicas y liposomas. Dipalmitoilfosfatidil colina, Colesterol, Tween 20-Span 20 o Tween 80-Span 80 en medio acuoso.*, in *Facultad de Química, UNAM*. 2016, Universidad Nacional Autónoma de México: México. p. 112.
16. Bailey, A.E., *Aceites y grasas industriales*. 1961, Barcelona: Reverté. 267 - 268.
17. Lieberman, H.A. and L. Lachman, *The theory and practice of industrial Pharmacy*. 7th ed. 2008, New Delhi: CBS Publishers and Distributors Pvt Ltd. 502-532.
18. Kulkarni, V.S. and C. Shaw, *Chapter 2 - Surfactants, Lipids, and Surface Chemistry*, in *Essential Chemistry for Formulators of Semisolid and Liquid Dosages*, V.S. Kulkarni and C. Shaw, Editors. 2016, Academic Press: Boston. p. 5-19.

19. Gutiérrez-Pulido, H. and R. de la Vara-Salazar, *Análisis y diseño de experimentos*. 3ra ed. 2012, Mexico: McGraw Hill Interamericana 2-11, 116-119, 128-133,154-170, 190-192.
20. Rojas-Cardenas, L.E. and L. Rojas-Cortes, *Exploracion al Diseño Experimental*. Ciencia e Ingenieria Neogradina, 2000. **9**: p. 51-59.
21. Kuehl, R., *Diseño de Experimentos, Principios Estadísticos de Diseño y Análisis de Investigación*. SERBIULA (sistema Librum 2.0), 2001: p. 175-208, 232-233,.
22. Montgomery, D.C., *Design and analysis of experiments*. 9th ed. 2017, United Estates: Wiley and sons editorial 179-185, 201-206. 230, 240-253, 282-289.
23. SHAI, A., *Handbook of cosmetic skin care*. 2nd ed. 2015: Informa UK Ltd. 56, 131, 137.
24. Barel, A.O., M. Paye, and H.I. Maibach, *Handbook of Cosmetic Science and Technology, Third Edition*. 3rd ed. 2009: Taylor & Francis. 26-301, 92-94,112,113,125-127, 295
25. Araújo, L.U., et al., *Profile of wound healing process induced by allantoin*. Acta Cirurgica Brasileira, 2010. **25**: p. 460-461.
26. Shah, M. and Y. Agrawal, *Ciprofloxacin hydrochloride-loaded glyceryl monostearate nanoparticle: factorial design of Lutrol F68 and Phospholipon 90G*. Journal of microencapsulation, 2012. **29**(4): p. 331-343.
27. *Phospholipon 90 H*, P. GmbH, Editor. 2007: Nattermannallee, Cologne
28. *Guía de estabilidad en productos cosméticos*. A.N.D.V. . 2005, Sanitaria: Brasilia. p. 17.
29. Trotta, M., F. Pattarino, and T. Ignoni, *Stability of drug-carrier emulsions containing phosphatidylcholine mixtures*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2002. **53**(2): p. 203-208.
30. Israelachvili, J.N., D.J. Mitchell, and B.W. Ninham, *Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers*. Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics, 1976. **72**: p. 1525-1568.
31. Fillery-Travis, A.J., L.H. Foster, and M.M. Robins, *Stability of emulsions stabilised by two physiological surfactants: L-alpha-phosphatidylcholine and sodium taurocholate*. Biophys Chem, 1995. **54**(3): p. 253-60.
32. Jumaa, M. and B.W. Müller, *Parenteral emulsions stabilized with a mixture of phospholipids and PEG-660-12-hydroxy-stearate: evaluation of accelerated and long-term stability*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2002. **54**(2): p. 207-212.
33. Donsì, F.W., Y. Huang, Q., *Freeze-thaw stability of lecithin and modified starch-based nanoemulsions*. Food Hydrocolloids, 2011. **25**(5): p. 1327–1336.
34. Cavalli, R., et al., *The effect of the components of microemulsions on both size and crystalline structure of solid lipid nanoparticles (SLN) containing a series of model molecules*. Pharmazie, 1998. **53**(6): p. 392-396.
35. Trotta, M., F. Debernardi, and O. Caputo, *Preparation of solid lipid nanoparticles by a solvent emulsification–diffusion technique*. International journal of pharmaceutics, 2003. **257**(1-2): p. 153-160.
36. Pichot, R., F. Spyropoulos, and I.T. Norton, *Competitive adsorption of surfactants and hydrophilic silica particles at the oil–water interface: Interfacial tension and contact angle studies*. Journal of Colloid and Interface Science, 2012. **377**(1): p. 396-405.
37. Friberg, S. and L. Mandell, *Phase equilibria and their influence on the properties of emulsions*. Journal of the American Oil Chemists Society, 1970. **47**(5): p. 149-152.
38. Rydhag, L. and I. Wilton, *The function of phospholipids of soybean lecithin in emulsions*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1981. **58**(8): p. 830-837.
39. Pichot, R., R.L. Watson, and I.T. Norton, *Phospholipids at the interface: current trends and challenges*. International journal of molecular sciences, 2013. **14**(6): p. 11767-11794.

40. Shchipunov, Y.A. and P. Schmiedel, *Phase Behavior of Lecithin at the Oil/Water Interface*. Langmuir, 1996. **12**(26): p. 6443-6445.
41. Prinderre, P., et al., *Formulation and evaluation of o/w emulsions using experimental design*. International Journal of Pharmaceutics, 1998. **163**(1-2): p. 73-79.
42. Flick, E.W., *Cosmetics Additives: An Industrial Guide*. 1991: Noyes Publications.
43. Cheng, R., Y. Yang, and X. Yan, *The wall effect on viscosity measurement of dilute aqueous solutions of polyethylene glycol and polyvinyl alcohol using a paraffin-coated capillary viscometer*. Polymer, 1999. **40**(13): p. 3773-3779.
44. Nesbitt, R.U., Jr. and B.J. Sandmann, *Solubility Studies of Silver Sulfadiazine*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1977. **66**(4): p. 519-522.
45. Kunkely, H., *Photoproperties of silver sulfadiazine*. Inorganic Chemistry Communications, 2007. **10**: p. 226-228.
46. Benita, S., D. Friedman, and M. Weinstock, *Physostigmine emulsion: a new injectable controlled release delivery system*. International Journal of Pharmaceutics, 1986. **30**(1): p. 47-55.