

302827¹⁴
2^{es}



UNIVERSIDAD MOTOLINIA, A. C.

ESCUELA DE QUIMICA

Con Estudios Incorporados a la U.N.A.M.

DESARROLLO DE UNA CREMA FACIAL EMOLIENTE
Y NUTRITIVA A BASE DE LIPOSOMAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A I

NUSHIE ALEJANDRA ORTEZ SANDOVAL

México, D. F.

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

I N D I C E

		Página
CAPITULO I	.- INTRODUCCION	1
CAPITULO II	.- ANTECEDENTES	3
2.1	.- Generalidades anatómicas y fisiológicas en la piel	3
2.2	.- Aspectos químicos y fisicoquímicos de la epidermis	5
2.3	.- El Agua, elemento esencial para mantener la suavidad y flexibilidad de la piel	6
2.4	.- Elementos de la piel que regulan el contenido de agua	7
2.5	.- Envejecimiento	8
2.5.1	.- Cambios fisiológicos que se presentan en la piel con el envejecimiento	9
2.6	.- Generalidades sobre liposomas	10
2.6.1	.- Estructura	13
2.6.2	.- Clasificación	17
2.6.3	.- Mecanismo de liberación de sustancias activas en cosmética	18
2.6.4	.- Penetración de los liposomas en el estrato córneo	18
2.6.5	.- Aplicaciones de los liposomas en cosmética	22
2.6.6	.- Métodos de preparación	24
2.6.7	.- Formación de las vesículas	28
2.6.8	.- Control de calidad	29
2.6.9	.- Interacción con las células	32
2.6.10	.- Otras aplicaciones	34
2.7	.- Características organolépticas y de tipo estético que se busca en la crema a formular	40
2.8	.- Selección de los ingredientes	41
2.9	.- Formulación	41

	Página
CAPITULO III - PARTE EXPERIMENTAL	51
3.1 - Diagrama de flujo	51
3.2 - Material, reactivos y equipo	52
3.3 - Metodología	54
3.4 - Control analítico	55
3.5 - Diseño del experimento	60
3.6 - Análisis estadístico	63
CAPITULO IV - RESULTADOS Y DISCUSIONES	68
4.1 - Formulación final	68
4.2 - Método de preparación	69
4.3 - Características definidas del producto	70
4.4 - Encuesta	72
CAPITULO V - CONCLUSIONES	86
BIBLIOGRAFIA	88

CAPITULO I

INTRODUCCION

La piel es un órgano vital que está permanentemente amenazado por su inexorable enemigo, el envejecimiento.

Desde tiempos muy remotos el hombre se ha preocupado por su apariencia física y, desde luego, se ha resistido a aceptar la idea del envejecimiento. Es por ello que constantemente intenta dar una solución a éste proceso biológico.

Ciertamente la ciencia no ha logrado encontrar el secreto de la eterna juventud pero, en cambio, sí ha tenido a su alcance infinidad de recursos que prolongan la juventud, haciendo de ésta una etapa más duradera, modificando la calidad de vida y la belleza humana.

Así la cosmética, en su afán de satisfacer las necesidades del hombre, desde 1980 incorporó en sus productos para el cuidado de la piel un vehículo novedoso, denominado liposoma, que presenta la característica de ser altamente compatible con las membranas celulares y, por ende, con la piel dada su naturaleza fosfolipídica.

Antes de esa década, los espacios lipófilos existentes entre las células queratinosas de la piel eran prácticamente impenetrables por las sustancias hidrófilas, pues solamente aquellas de naturaleza lipídica son solubles en dichas zonas; creándose así una barrera natural.

Con ésta forma innovadora de transporte, los principios hidrófilos (proteínas, extractos vegetales y animales, entre otros) pueden ser encapsulados dentro del espacio interno acuoso de los liposomas y, gracias a su naturaleza lipídica, se logra vencer las zonas lipófilas de la piel.

Por otro lado, también los liposomas son capaces de penetrar la piel hasta profundidades nunca antes alcanzadas, llevando en su interior todo tipo de principios activos que, se ha reconocido, pueden restablecer la lozanía, elasticidad y tersura de la misma. Es por ello que se les ha catalogado como los vehículos biológicos que han revolucionado todas las técnicas para el tratamiento de la piel, y en general a la cosmética y ciencia en sí, por las posibles aplicaciones que en la actualidad son objeto de estudio.

Por lo tanto, resulta interesante desarrollar una crema emoliente y nutritiva a base de liposomas que le proporcione a la piel, sobre todo madura, el grado de humectación y el contenido de grasas que ha perdido. Con ello se buscará recobrar la elasticidad requerida para que éste órgano desempeñe su función protectora que le caracteriza, ya que una piel áspera y reseca permite la penetración de cuerpos extraños hacia capas más profundas, lo que acelera su deterioro; así mismo, se intenta comprobar si su uso le confiere una apariencia más agradable al suavizar los efectos del envejecimiento.

HIPOTESIS: La incorporación de los liposomas en una forma cosmética produce efectos palpables sobre el usuario tales como retardar los efectos del envejecimiento.

OBJETIVOS: Se ha comprobado que las cremas faciales desarrolladas hasta ahora presentan una escasa penetración en la piel, por lo que difícilmente sus principios activos logran depositarse en las zonas deseadas. Así, la incorporación de los liposomas en éste tipo de productos para el cuidado de la piel, puede resultar provechoso para dirigir su contenido hacia capas más profundas, dada su alta compatibilidad con las membranas biológicas y su gran poder de penetración. Con ésta innovadora forma de transporte se intenta proporcionar a la piel madura aquello que ha perdido con el paso del tiempo y cuya carencia acentúa los efectos del envejecimiento.

CAPITULO II

A N T E C E D E N T E S

La piel es un órgano que se debe tomar en cuenta al desarrollar la fórmula de un cosmético o medicamento de aplicación tópica . El conocimiento de su anatomía, fisiología y sobre todo, de su composición y propiedades fisicoquímicas, permite realizar una mejor selección de las sustancias , principios activos y/o excipientes, que integrarán la formulación del producto.

(2, 14 ,15 y 29)

A continuación se señalarán los aspectos más importantes en la formulación de cremas emolientes.

2.1) GENERALIDADES ANATOMICAS Y FISIOLÓGICAS DE LA PIEL

La piel es un órgano que consiste en tejidos unidos estructuralmente y que sirve como frontera entre el resto del organismo y el medio exterior. Realiza principalmente funciones de protección, absorción, secreción, excreción, termoregulación, pigmentación, información sensorial y regulación de los procesos inmunológicos.

Está constituida por tres capas: la epidermis, dermis, y la hipodermis.

La epidermis es la capa más externa, tiene un espesor promedio de 0.2 mm. Impide la salida de sustancias nutritivas, regula la salida de agua y electrolitos y protege de la penetración de agua y agentes extraños.

La dermis, capa subyacente a la epidermis, tiene un espesor promedio de 3 a 5 mm. Sirve como zona de soporte y anclaje de la epidermis. En ella se encuentran vasos sanguíneos y linfáticos, folículos pilosos, terminaciones nerviosas, glándulas sebáceas y sudoríparas.

La hipodermis es una capa subyacente a las dos anteriores, tiene una discreta vascularización. Actúa como aislante térmico y absorbente mecánico de choques.

La epidermis es la capa de mayor interés en el desarrollo de formulaciones para medicamentos y cosméticos, ya que representa una barrera natural que ofrece cierta resistencia

al paso de sustancias a través de ella. También se halla dividida en varias capas: iniciando desde la más interna hasta llegar a la más externa se tiene:

- * **Capa germinativa:** es la capa donde ocurre la reproducción celular y en ella se generan células que, después de pasar por una serie de cambios tales como: deshidratación, queratinización, melanización y lipidación llegan al estrato córneo para remplazar a las células muertas que se desprenden durante la descamación.

- * **Capa mucosa o de Malpighi:** formada por células gruesas, columnares, unidas por fibrillas, lo cual les da cohesión, resistencia y elasticidad a las acciones del exterior.

- * **Estrato granuloso:** capa formada por células aplanadas que presentan signos de degeneración córnea, retracción nuclear y una intensa actividad queratogénica.

- * **Estrato lúcido:** capa formada por células aplanadas, muertas, sin núcleo y que también llevan a cabo una gran actividad queratogénica.

- * **Estrato córneo:** capa formada por células aplanadas, muertas, sin núcleo, constituidas por una cubierta de queratina que rodea a una porción central de grasa. Estas células se encuentran entrelazadas entre sí, formando escamas, las cuales se desprenden constantemente y son reemplazadas por nuevas células que provienen de las capas más internas. Constituye una barrera eficaz contra las ondas luminosas y térmicas, bacterias y sustancias químicas.

(2, 14, 15, 27 y 34)

Estas son las capas de naturaleza celular que constituyen la epidermis y que en algunas partes de la piel se reducen a sólo estrato córneo y capa germinativa. De todas ellas el estrato córneo tiene una mayor importancia en la formulación de cremas emolientes, ya que de su grado de hidratación dependen la suavidad y flexibilidad de la piel.

(2, 14, 15, 27, 29 y 34)

Por encima del estrato córneo existe una capa lipídica que lubrica la piel e impide la entrada de agua, sobre ésta capa hay una de carácter acuoso, producto de la transpiración. Una parte de los lípidos del sebo, del agua excretada y de los productos de descamación dan lugar a una capa emulsionada, que puede ser de tipo Ac / Ag o Ag / Ac . Por último se tiene una capa

gaseosa, formada principalmente por bióxido de carbono y vapor de agua, que ayuda a mantener la hidratación de la piel y ofrece cierta resistencia a los cambios bruscos de temperatura

(2, 14, 15 y 27)

2.2) ASPECTOS QUIMICOS Y FISICOQUIMICOS DE LA EPIDERMIS

Se puede considerar a la epidermis como un gel constituido por: agua (que va disminuyendo desde un 70 % en la capa más interna, hasta un 10 a 20 % en la capa más externa), proteínas (27 %), lípidos (2 %) y minerales (0.5 %).

El estrato córneo está constituido principalmente por queratina, una proteína rica en aminoácidos como cistina, histidina, lisina y arginina. Esta proteína es insoluble en agua y en ácidos e hidróxidos diluidos, y proporciona cierta dureza al estrato córneo.

Los lípidos de la superficie de la piel tienen como fuente el sebo excretado por las glándulas sebáceas, los lípidos presentes en el estrato córneo y los lípidos que constituyen el resto de la epidermis.

El sebo está formado principalmente por: triglicéridos, (cerca de un 50 %), ceras, escualeno, ácidos grasos libres y ésteres del colesterol.

Los principales lípidos presentes en las células del estrato córneo son: fosfolípidos (forman un complejo con la queratina), triglicéridos, ésteres parciales del glicerol, colesterol (mitad libre y mitad esterificado), linoleatos alquílicos (siendo el de etilo el aparente factor promotor de la cicatrización), ácido araquidónico y escualeno.

Los lípidos que integran el resto de la epidermis son: triglicéridos (cerca de un 48%), fosfolípidos, ácidos grasos libres, ceras, escualeno, colesterol libre y ésteres del colesterol.

Todas estas fuentes contribuyen a formar la capa lipídica de la superficie de la piel.

Las secreciones acumuladas sobre la superficie de la piel le confieren un pH entre 4.5 y 5.5, el cual es variable según los individuos y las zonas epidérmicas. El pH de las capas superficiales asegura que la queratina se encuentre en su punto isoeléctrico, y por lo tanto en su

mínima solubilidad y reactividad además contribuye a inhibir el desarrollo de ciertos microorganismos patógenos.

(14, 15 y 27)

2.3) EL AGUA, ELEMENTO ESENCIAL PARA MANTENER LA SUAVIDAD Y FLEXIBILIDAD DE LA PIEL

Gaul y Underwood demostraron experimentalmente que el agua es el único plastificante del estrato córneo.

(9)

Por otra parte, Blank demostró que el material córneo seco es muy quebradizo y que la queratina depende del agua para poseer elasticidad, ya que observó que el callo requiere un 10% como mínimo de agua para ser blando y flexible. También demostró que la sola adición de materiales oleosos al estrato córneo para corregir su resequedad no es suficiente, sino que requiere que haya una hidratación, lo que puede ser aún sin el uso de vehículos oleosos.

(3, 4 y 11)

Estas investigaciones corroboran que el agua es un elemento esencial para mantener la suavidad y flexibilidad de la piel.

Las células vivas contienen aproximadamente un 70 % de agua, mientras que las células muertas (estrato córneo y lúcido) la poseen en un 10 a 20 %.

Cuando el contenido de agua en el estrato córneo es menor del 10 % la piel se vuelve seca. Frazier y Blank declaran que una piel seca se caracteriza por todos o cualquiera de los siguientes signos: aspereza, aspecto escamoso, disminución de la flexibilidad, agrietamiento y arrugamiento.

(3, 4, 8, 15 y 27)

2.4) ELEMENTOS DE LA PIEL QUE REGULAN EL CONTENIDO DE AGUA

El agua que hidrata el estrato córneo es producto de la transpiración, la cual se efectúa principalmente por medio de las glándulas sudoríparas. Muy poca agua proviene de las capas epidérmicas más internas, ya que el estrato granuloso representa una barrera casi impermeable al agua que difunde a través de dichas capas.

Los elementos que regulan el contenido de agua en el estrato córneo son: un factor humectante natural (FHN) , un sistema de membrana semipermeable de naturaleza lipoprotéica y los lípidos de la superficie de la piel.

(4, 15,16, 27 y 38)

El factor humectante natural (FHN), denominado así por Jacobi, es una mezcla de sustancias hidrofílicas, que dan al estrato córneo la capacidad de retener y mantener así a la piel en un estado de hidratación apropiado.

(19 y 27)

El FHN está constituido por:

- Acido pirrolidón carboxílico (ácido piroglutámico)
- Mucopolisecáridos: ácido hialurónico, condroitina y sulfato de Dermatán
- Polipéptidos: residuos de colágeno, proteoglicanos y glucoproteínas
- Hexosaminas: N-Acetil-D-glucosamina, N-Acetil-D-Galactosamina
- Pentosas: D-Ribosa, 2-Desoxi-Ribosa
- Iones inorgánicos: Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^-
- Urea
- Lactato

Estas sustancias son consideradas como las responsables de la capacidad que tiene el estrato córneo para retener el agua.

El sistema de membrana semipermeable está constituido por las membranas celulares del estrato córneo, las cuales son de naturaleza lipoprotéica (lípidos libres y unidos a la queratina u

otras proteínas). Este sistema permite el paso de agua, pero no de las sustancias que integran el FHN , y evita que aquellas sean arrastradas cuando la piel es sumergida en agua.

Los lípidos de la superficie de la piel forman una capa de carácter hidrofóbico que ayuda a retener la salida de agua, y al mismo tiempo opone resistencia a la entrada.

(4, 15, 16 y 38)

2.5) ENVEJECIMIENTO

No es ninguna novedad que el ser humano se interroge sobre porqué envejece, qué se puede decir del envejecimiento, cuáles son las causas y cómo es que ocurra éste proceso.

Se sabe a ciencia cierta que el envejecimiento es un proceso natural de los seres vivos animales y vegetales y, por lo tanto inevitable.

Propiamente se puede definir como: el deterioro inherente, progresivo e irreversible de todas las funciones del ser humano, que no solamente ocurre en los organismos superiores, sino también en los inferiores. Cada parte del organismo sufre un cambio progresivo con la edad y cada especie presenta síntomas característicos. En años recientes se han efectuado extensas investigaciones sobre las causas del envejecimiento del ser humano, concluyéndose que varias escapan del control humano (como ciertos factores hereditarios, el medio ambiente, las condiciones climatológicas) mientras que otras, por el contrario, sí son susceptibles de regulación voluntaria (alimentación y cosméticos).

En éste renglón es de mencionarse muy especialmente los efectos de la exposición desmedida al sol. Los rayos UV-B llegan a la epidermis produciendo quemaduras y el bronceado; sin embargo, son más dañinos los UV-A que llegan más profundamente hasta la dermis, originando degeneración celular que no es perceptible de inmediato y que, con el paso del tiempo pueden causar envejecimiento acelerado de la piel y, en ocasiones, hasta melanoma maligno.

(12 y 32)

2.5.1)CAMBIOS FISIOLÓGICOS QUE SE PRESENTAN EN LA PIEL CON EL ENVEJECIMIENTO

Se ha reconocido que las principales funciones de la piel se ven afectadas con la edad , ya que una piel envejecida sufre modificaciones significativas en su fisiología, las cuales se atribuyen a ciertas alteraciones funcionales y estructurales que se presentan en dicho órgano con el paso del tiempo y aquellas provocadas por la exposición al medio ambiente, en donde las radiaciones juegan un papel importante.

Los cambios fisiológicos que se han podido identificar y asociar con éstas reducciones son :

- La síntesis y, por lo tanto, la presencia de la mayoría de los elementos que constituyen la piel disminuye.
- Adelgazamiento generalizado de la epidermis y separación de la dermis, provocando la flacidez de la piel.
- Disminución del crecimiento de las faneras (pelo y uñas).
- Declinación de la reparación del tejido epitelial (cicatrización).
- Presencia de canas como resultado de una pérdida progresiva y, en algunas ocasiones total de los melanocitos del bulbo capilar.
- Disminución de la inmunidad celular. La reducida inmunocompetencia da lugar a una alteración en las reacciones de hipersensibilidad y un aumento en el riesgo de carcinogénesis.
- Incremento de la susceptibilidad hacia infecciones de la piel.
- El contenido de 7-hidrocolesterol y la liberación de vitamina D hacia la sangre se reduce un 75 %.
- La exposición crónica a la luz incrementa la formación de radicales libres, presentándose así cambios estructurales y fisiológicos.

A este tipo de radicales se les ha definido como átomos y moléculas con un par de electrones sin compartir, lo cual les confiere inestabilidad y, por lo tanto, una alta reactividad.

Se generan principalmente en las células aeróbicas como productos normales del metabolismo, sin embargo, ciertos factores ambientales como la exposición a los rayos UV, incrementan los niveles intracelulares de éstos radicales.

Su fuente fundamental es el oxígeno, destacándose sobre todo la acción de los radicales superóxido (O_2^-), hidroxil (OH^\cdot) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Por ser altamente reactivos, dañan a todas las moléculas que se encuentran a su alrededor y, en la piel, tienden a alterar sus principales componentes : membranas lipídicas de la epidermis y macromoléculas responsables de las propiedades mecánicas de la dermis: colesterol, colágeno, ácido hialurónico, entre otros.

Todas estas alteraciones provocan que la piel se inflame y envejezca , lo cual reduce la humedad, firmeza y elasticidad de la misma.

(7 y 31)

2.6) GENERALIDADES SOBRE LIPOSOMAS

La palabra " Liposoma " proviene del griego que significa " Cuerpo graso ", pero una definición más precisa los describe como estructuras huecas constituidas por fosfolípidos, justamente las mismas moléculas que forman las membranas biológicas, lo que les permite mezclarse con las células y los tejidos de nuestro cuerpo.

El liposoma es, por naturaleza, una forma galénica al igual que lo es una emulsión, una solución, una barra de labios o un comprimido.

Presentan otra cualidad, por ser estructuras lipídicas huecas pueden ser llenados por una multitud de sustancias interesantes. (fig.1 y 2)

La similitud que guardan con las membranas celulares y su habilidad para transportar sustancias, constituyen la base de sus aplicaciones industriales y científicas.

Fueron descubiertos en el año de 1965 por el científico británico Alec Bangham, al observar por microscopía electrónica una suspensión de fosfolípidos de origen celular, después de su aislamiento y purificación y se les denominó Bangasomas en su honor.

En el curso de sus investigaciones sobre los efectos de los fosfolípidos (surfactantes de las membranas de las células vivas) sobre la coagulación de la sangre, Bangham vio que éstos formaban pequeños sacos de capas bimoleculares que, al dispersarse en agua, creaban vesículas mismas que desde entonces, se han utilizado ampliamente como modelos de membrana. Posteriormente fueron ensayados terapéuticamente, sin embargo, debido a su limitada estabilidad las aplicaciones prácticas en cosmética y farmacia eran sumamente difíciles; pero ahora, con el uso de la lecitina, extraída del frijol de soya y de la yema de huevo, la estabilidad de los liposomas se ha visto enormemente aumentada, sobre todo cuando se utiliza la lecitina hidrogenada.

(21)

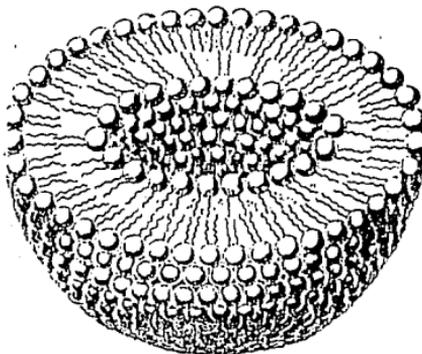


Fig 1 . Estructura liposomal
Corte transversal que muestra los vacíos internos acuosos.

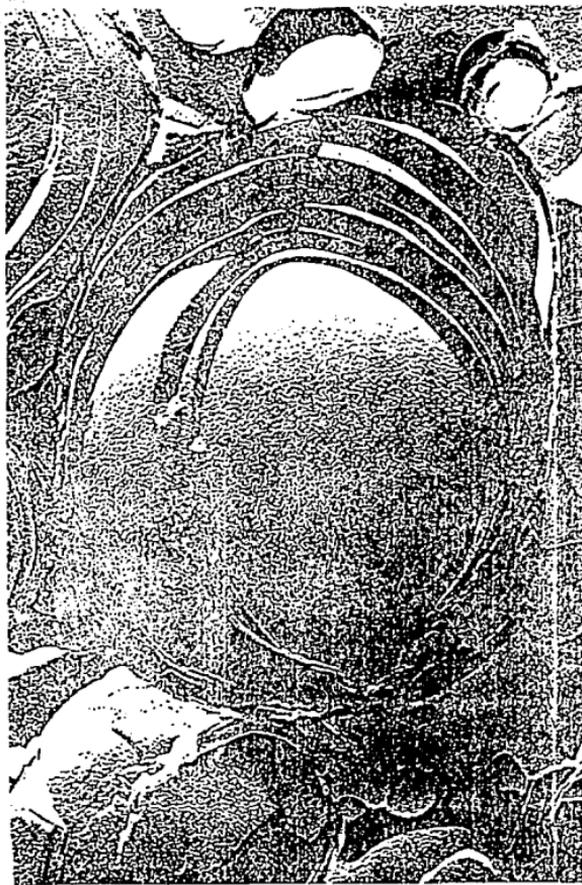


Fig 2 . Microfotografía electrónica de un liposoma que muestra las diferentes capas de fosfolípidos que constituyen la membrana liposomal así como su interior, después de que éste ha sido congelado y fragmentado.

2.6.1) ESTRUCTURA

Los liposomas propiamente son vesículas artificiales sintetizadas en el laboratorio, constituidas por una gran variedad de sustancias anfífilas de naturaleza fosfolípídica, las cuales se distribuyen entre sí

en bicapas cuando se encuentran en solución acuosa, formándose así la membrana lipídica de los liposomas.

(21 y 28)

Dichos fosfoglicéridos están costuidos por dos cadenas de ácidos grasos, las cuales esterifican las funciones alcohol del glicerol en las posiciones 1 y 2. Por lo regular se localizan en la posición 1 ácidos grasos saturados y en la posición 2 ácidos grasos insaturados. La función alcohol en la posición 3 también se esterifica por un grupo polar como es el fosfato. La naturaleza de éste último define a los diferentes tipos de fosfoglicéridos, siendo los más frecuentes la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamida. (Fig.3)

Cada tipo de fosfoglicéridos difiere dependiendo de la naturaleza de los ácidos grasos.

Por lo expuesto anteriormente, los fosfoglicéridos poseen dos cadenas alifáticas altamente hidrofóbicas, las cuales constituyen la " fracción o cola no polar de los fosfoglicéridos".

También poseen una cabeza ionizada, o al menos fuertemente polar, que forma la " fracción o cabeza polar ". (Fig 4)

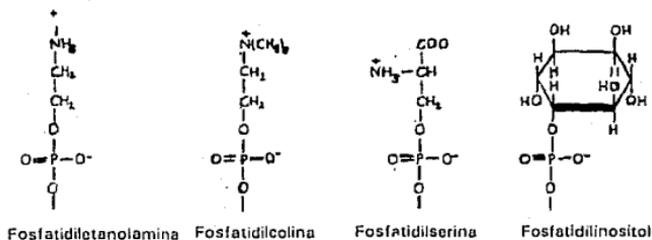


Fig 3 . Grupos de cabeza polar de los fosfoglicéridos

Fracción no polar

Fracción polar

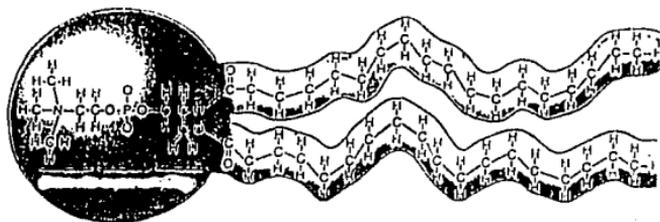


Fig 4 . Estructura general de los fosfolípidos en forma tal que pone de manifiesto su naturaleza anfipática

Consecuentemente, cuando los fosfolípidos son dispersados en agua, solamente una pequeña fracción (la polar) se disuelve para formar una solución molecular verdadera, debido a la presencia de la fracción no polar.

A cierta cantidad, la concentración micelar crítica, los fosfolípidos se asocian para formar una estructura, la bicapa. (Fig 5).

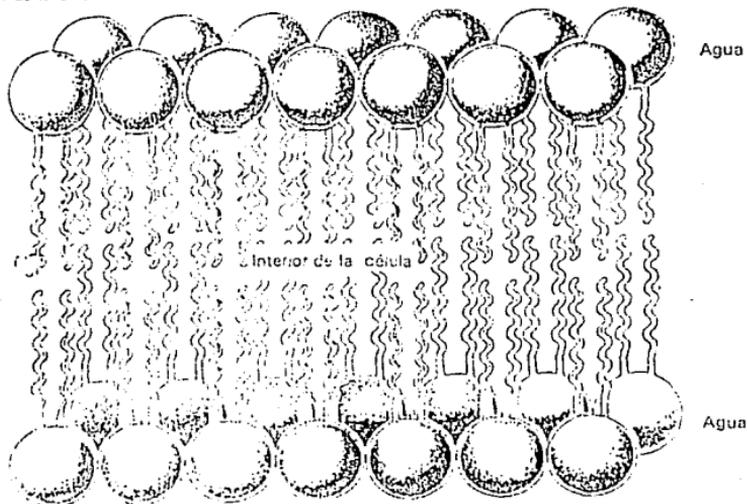
(5, 10, 22 y 31)

Dicha bicapa no es estable bajo la simetría planar que presenta, ya que sus extremos están expuestos al agua y, como resultado, tiende a cubrirse así misma adquiriendo una estructura esférica. (21)

Como su nombre lo indica, está formada por dos capas de fosfolípidos cuyos extremos no polares se ocultan del derredor acuoso y dan origen a la fase interna hidrofóbica, mientras que las cabezas polares se exponen a la superficie teniendo contacto con la fase acuosa.

(5, 22 y 31)

Exterior de la célula



Exterior de la célula

Fig 5 . Bicapa lipídica

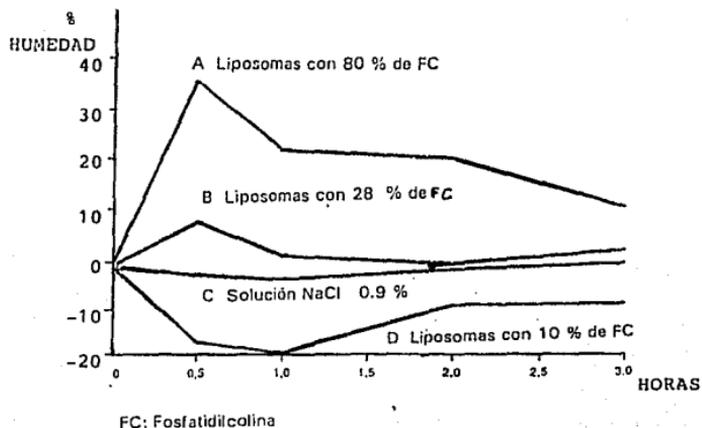
Bajo el efecto de ciertos agentes químicos, se puede facilitar el que las membranas integradas por dichas bicapas puedan cerrarse así mismas, dando lugar a los liposomas.

(21 y 31)

Para su formación se emplean una gran variedad de fosfoglicéridos de origen natural o sintético, o bien, mezclas de ellos. Generalmente se emplea una mezcla de fosfatidilcolina y ciertas sustancias que ayudan a aumentar su estabilidad como algunos fosfolípidos cargados (fosfatidilserina y fosfatidilglicerol), los cuales evitan la aglutinación de las vesículas; así como colesterol, el cual reduce la permeabilidad de los liposomas hacia iones y pequeñas moléculas que se encuentren en el medio.

(21 y 28)

En una investigación referente a la influencia de la composición fosfolipídica de los liposomas sobre la hidratación de la piel humana al medirse la resistencia capacitante de la piel, se encontró que los diferentes tipos de fosfolípidos de soja influyen sobre dicho efecto hidratante, destacándose que el contenido de fosfatidilcolina incrementa el grado hidratante de los liposomas, lo cual puede observarse en la siguiente gráfica.



2.6.2) CLASIFICACION

Los liposomas se han clasificado en tres categorías dependiendo de su tamaño y al número de capas :

a) Liposomas Unilamelares Pequeños (SUV o SMALL UNILAMELAR VESICLES)

Están formados por una bicapa sencilla y su cavidad interna contiene a la fase acuosa. El diámetro que poseen oscila entre 25-65 nm .

b) Liposomas Unilamelares Grandes (LUV o LARGE UNILAMELAR VESICLES)

Su estructura es idéntica a la anterior categoría pero, según su método de fabricación, su diámetro se encuentra entre 100-200 nm o 600-1000 nm.

c) Liposomas Multilamelares (MLV o MULTILAMELAR VESICLES)

Su estructura conlleva a muchas estructuras ensambladas una sobre otra, originándose varios compartimentos concéntricos.

Su diámetro es similar a los anteriores encontrándose entre 400 a 10 000 nm según su procedencia. A parte de su cavidad central, en cada bicapa existe un intersticio que puede albergar sustancias hidrofílicas. (Fig. 6)

(21, 28 y 31)

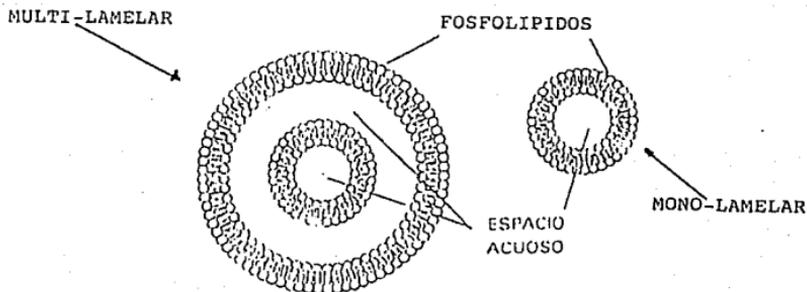


Fig 6 . Clasificación de los liposomas considerando su tamaño y número de bicapas lipídicas.

2.6.3) MECANISMOS DE LIBERACION DE SUSTANCIAS ACTIVAS EN COSMETICA

Diferentes mecanismos contribuyen a la liberación de sustancias activas, destacándose los siguientes :

- Los fosfolípidos que constituyen la membrana de los liposomas son susceptibles de disolverse por interacción con el medio ambiente, abriéndose el liposoma y, por consiguiente, liberándose la sustancia activa.
- Las enzimas que desdoblan las grasas (lipasas) pueden alterar a los fosfolípidos, por lo que el liposoma se revienta y su contenido se vierte en el ambiente.

(31)

2.6.4) PENETRACION DE LOS LIPOSOMAS EN EL ESTRATO CORNEO

Debido a que los liposomas están constituidos por fosfolípidos y, éstos a su vez, forman parte del estrato córneo, se podrá esperar que su penetración a través de ésta capa no tenga mayores dificultades.

Esto fue demostrado por Handjani-Vila et.al. en sus investigaciones sobre el poder de penetración de un tipo de liposomas no iónicos en el estrato córneo, las cuales confirmaron el hecho de que las sustancias transportadas por los liposomas se depositan realmente en dicha capa de la piel.

Para ello, analizaron comparativamente la penetración de las mismas sustancias hidrofílicas incorporadas en tres vehículos diferentes : liposomas, emulsiones Ac / Ag y soluciones acuosas; las cuales previamente fueron marcadas (por fluorescencia o por isótopos radiactivos), con el fin de monitorear su trayectoria. Los resultados mostraron que el mayor poder de penetración se presentó en las sustancias transportadas por los liposomas, e incluso , tendían a acumularse. Por lo que respecta a las emulsiones, se vió que tuvieron mayor efecto

penetrante que las soluciones acuosas, lo cual se mejoró al emplear emulsiones Ag / Ac; sin embargo, aún continuaba siendo más bajo del que presentaban los liposomas. (fig 7, 8, 9 y 10)

Posteriormente se añadió un colorante hidrofílico a los liposomas y a las emulsiones Ac / Ag , a manera de medir la intensidad del color 5 horas después de haber aplicado dichos productos y que la piel fuera lavada con agua y jabón. En éste caso se vió que la coloración de los liposomas era más intensa y resistía al lavado, mientras que la manifestada por las emulsiones desapareció casi por completo.

(13)

Cabe destacar que ciertas observaciones histológicas de la piel tratada con liposomas a su vez también demuestran que, a pesar de que los solutos se difunden en la totalidad del estrato córneo , no alcanzan en ningún momento las capas subyacentes a la epidermis. Además, para evitar posibles reacciones inmunológicas, deberán pasar una serie de pruebas de laboratorio que aseguren lo contrario. Ambas aclaraciones son importantes desde el punto de vista legislativo, pues ante todo, el producto no debe de atentar contra la salud del consumidor.

(31)

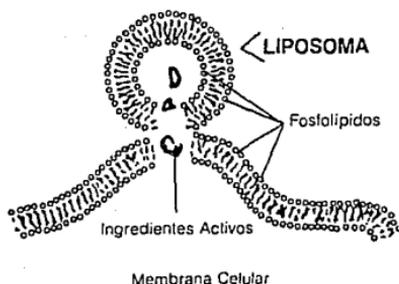


Fig 7 . Figura que muestra la manera en que se libera el contenido del liposomas en las células.

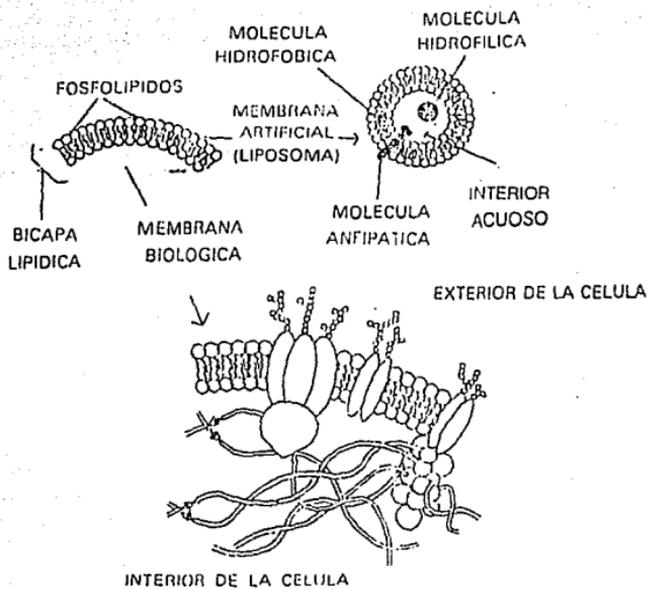


Fig 8 . Figura que muestra la estructura liposomal y celular confirmando la compatibilidad entre éstas.

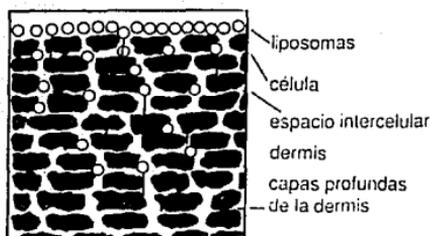


Fig 9 . Figura que muestra la penetración de los liposomas en el estrato córneo.

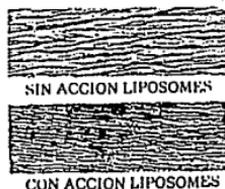


Fig 10 .Las propiedades de la acción de los liposomas han sido demostradas por pruebas que aseguran, bajo control científico, su eficacia reestructurante antienvjecimiento. Dichas pruebas evalúan: la reestructuración de la piel , la prevención envejecimiento, eficacia hidratante así como el mejoramiento de la actividad celular.

2.6.5) APLICACIONES DE LOS LIPOSOMAS EN COSMETICA

Los liposomas no son sustancias activas, en realidad representan un sistema de transporte de todo tipo de sustancias altamente eficaz en comparación con los diferentes productos existentes (emulsiones, geles, ampollas, etc).

(26)

Debido a que dichas estructuras están conformadas por una fase acuosa atrapada en vesículas lipídicas, son capaces de contener en su interior tres tipos de sustancias:

- 1) Hidrofilicas 2) Hidrofólicas 3) Anfífilicas

Las sustancias hidrofilicas quedarán incluidas en la zona acuosa, las hidrofólicas encontrarán alojamiento en la cubierta de lípidos, mientras que las sustancias anfífilicas se podrán depositar en cualquiera de las dos, o bien, parcial o totalmente en el interior o exterior de la superficie liposomal. La fig. 11 muestra lo anterior .

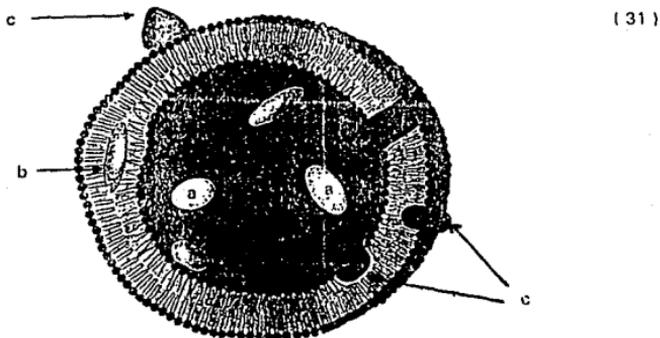


Fig 11 . La figura muestra la capacidad de los liposomas para transportar tres tipos de sustancias así como su localización en el interior de las vesículas
a) Hidrofilica
b) Hidrofólicas
c) Anfífilicas parcial o totalmente en el interior o exterior de la superficie liposomal.

La habilidad de los liposomas para liberar su contenido en las capas superficiales y profundas de la piel los convierte en herramientas importantes en la industria cosmética. De ésta forma se han encapsulado infinidad de sustancias con reconocidas propiedades como : lípidos hidratantes, azúcares, aminoácidos, vitaminas, proteínas; péptidos como : colágeno, elastina; extractos de tejido animal : timo, bazo y extractos vegetales como : aloe - vera, manzanilla; ácido hialurónico, sustancias con actividad antirradicales libres. Recientemente se está trabajando con combinaciones especiales de sustancias para diversos tratamientos como acné, crecimiento del pelo, higiene bucal, desodorantes y bloqueadores solares (protectores solares).

Algunos fabricantes están desarrollando actualmente perfumes liposomales cuyo efecto podría incrementar la duración de las fragancias

(1, 21 y 26)

La efectividad de éstos tratamientos, sin embargo, es materia de controversia. Mucha de la demanda comercial no se ha sometido a experimentos científicos rigurosos; por ejemplo, es difícil interpretar algunos resultados que sugieren que los ingredientes activos han sido liberados en el sitio deseado. De igual manera no se ha aclarado como los liposomas pueden pasar a través de los poros de la piel cuyo tamaño es relativamente pequeño. Sin embargo, los efectos en cosmética son evidentes , siempre y cuando el uso de los productos que los contengan sea constante.

De ésta forma, las ventajas que los liposomas ofrecen en comparación con los productos convencionales son las siguientes:

- Poseen gran afinidad por las membranas de las células.
- Presentan mayor capacidad de penetración.
- Infiltración precisa en lugar de una dispersión amplia.
- Toxicidad reducida.
- Se dice que promueven la función humectante de la piel; aún más, los liposomas mismos no sólo retienen la humedad, sino que también trabajan para proporcionar humedad a la piel.

- Pueden encapsular tanto sustancias solubles en agua como en aceite.
- Ciertas sustancias que normalmente no podrían absorberse por la piel se pueden absorber mediante los liposomas.
- Logran proteger sustancias activas insolubles.
- Desarrollan mayor eficiencia con la misma o menor concentración de sustancias.

(26)

2.6.6) METODOS DE PREPARACION

Los liposomas pueden tener diversas aplicaciones, por lo que es preferible emplear el tipo adecuado para ello. De ésta forma se tienen distintas maneras de prepararlos.

(28)

En realidad lo más importante durante su preparación es el lograr tres atributos:

- 1) Composición definida de la capa lipídica
- 2) Distribución homogénea del tamaño
- 3) Número de capas definido

(21)

Cabe señalar que hasta el momento sólo se sabe generalidades sobre los métodos de preparación, ya que las condiciones precisas de cada de ellos son absolutamente confidenciales. Por otro lado todos los liposomas, después de su preparación, deberán someterse a un proceso de esterilización y mantenerse a 4° C o congelados a -180° C para asegurar su preservación indefinidamente.

En general, para cada categoría de liposomas se tienen los siguientes métodos de preparación:

1) LIPOSOMAS MULTILAMELARES (MLV)

El procedimiento que se ha seguido desde su descubrimiento por Bangham no ha sufrido modificaciones y se considera el más sencillo.

La técnica consiste en la agitación mecánica de una suspensión acuosa que contiene a los solutos que irán a ser encapsulados después de que se ha añadido a la fase fosfolipídica.

El tiempo de hidratación y las condiciones bajo las cuales se lleve a cabo el proceso, son parámetros importantes para que se obtenga la máxima encapsulación del material.

Posteriormente la preparación se somete a una sonicación o filtración a través de membranas de policarbonato, lo cual permitirá obtener vesículas pequeñas de tamaños homogéneos.

La reducción del tamaño mediante sonicación dependerá del tiempo y de la frecuencia que se emplee, por lo que es difícil estandarizar el método; por otro lado, las técnicas de filtración son más sencillas y proporcionan preparaciones con tamaños homogéneos.

2) LIPOSOMAS UNILAMELARES GRANDES (LUV)

Para éste tipo de liposomas se tienen diferentes técnicas de preparación:

a) Evaporación de éter: Los fosfolípidos se disuelven en éter o una mezcla de éter-metanol y después se incorporan a una solución acuosa que contendrá el soluto a ser encapsulado. Es indispensable calentar a 55 - 66° C o a 30° C a presión reducida.

Después de la evaporación del solvente, se obtendrán finalmente los liposomas.

Una desventaja que presenta éste método es el emplear solventes orgánicos y temperaturas relativamente altas para evaporarlos, lo cual puede desnaturar a ciertas moléculas e inactivarlas, al mismo tiempo pueden encontrarse ciertas trazas de solvente, representando una contaminación para las vesículas.

b) Fusión inducida por calcio: Este método consiste en añadir calcio a una preparación de liposomas unilamelares pequeños. De ésta manera se logran obtener por fusión estructuras cilíndricas grandes. La adición de EDTA a la preparación da lugar a vesículas esféricas unilamelares grandes.

Gran variedad de fosfolípidos ácidos, tal como el ácido fosfatídico, fosfatidilserina y aún cardiolípidos, se emplean con frecuencia.

La preparación de liposomas LUV bajo éste método comienza utilizando liposomas unilamelares pequeños, previamente preparados con fosfatidilserina, los cuales serán mezclados

con calcio. Este puede ser sustituido por un proceso de diálisis o por la adición de CaCl_2 . En ambos casos, los liposomas se funden para formar estructuras cilíndricas y, como consecuencia, aparecerá un precipitado blanco que puede ser recuperado por centrifugación.

Para formar proplamente a los liposomas LUV, el precipitado se resuspenderá en un mínimo de agua, la cual contendrá el material que será encapsulado; la sal EDTA se añadirá hasta lograr una suspensión dispersa. El pH se neutralizará con la adición de una solución de NaOH.

Por último, los liposomas obtenidos pueden separarse del material no encapsulado por centrifugación o ultracentrifugación.

Un inconveniente de éste método es el hecho de que solamente puede utilizarse si se emplean fosfolípidos acídicos o mezclas que los contengan.

c) Evaporación de un solvente en fase reversa: Este procedimiento emplea emulsiones constituidas por una fase acuosa dispersa en una fase orgánica en exceso que contendrá a los fosfolípidos, seguido de una evaporación del solvente a presión reducida.

Básicamente los fosfoglicéridos se disuelven en solventes orgánicos tales como: éter, éter-diisopropílico o mezclas de: éter diisopropílico-cloroformo (1:1).

La fase acuosa se añade directamente a la orgánica en diferentes proporciones dependiendo del solvente o mezcla de solventes empleados.

La preparación posteriormente se somete a una ligera sonicación de manera que se obtenga una emulsión homogénea.

El solvente orgánico se logra remover en dos etapas:

- 1) Evaporación a 200-400 mm Hg hasta que la emulsión se convierta en gel.
- 2) Evaporación a 700 mm de Hg hasta obtener una dispersión homogénea de liposomas.

Después de lograr el último paso, se aconseja remover posibles trazas residuales de solvente, ya sea por medio de diálisis o por cromatografía. Esta etapa, en donde las moléculas de soluto no encapsuladas se pueden separar, además logra prevenir la agregación de los liposomas recientemente formados.

La mayor desventaja que se observa en ésta técnica es la posible desnaturalización del material a encapsular al exponerse a solventes orgánicos, a pesar de su alta eficacia para encapsular a la fase acuosa.

3) LIPOSOMAS UNILAMELARES PEQUEÑOS (SUV)

Este tipo de liposomas pueden estar constituidos por dos o una bicapa lipídica y se tienen diferentes métodos para su formación:

a) Sonificación: Consiste en someter a un proceso de sonificación una preparación de liposomas multilamelares bajo una atmósfera inerte de nitrógeno o argón, utilizándose la frecuencia del ultrasonido para desintegrar vigorosamente a los liposomas MLV y dar origen a los SUV.

El tamaño de los liposomas obtenidos por éste método oscila entre 215-500 Å

Debido a que la curvatura de éstos liposomas es muy pronunciada, poseen un alto porcentaje de fosfolípidos en su monocapa externa (60 - 70 %) comparada con su monocapa interna, lo que puede causar una distribución asimétrica de los fosfolípidos cuando se emplea una mezcla de ellos.

La ventaja de éste método de preparación es su facilidad para separar a los liposomas SUV de aquellos que les dieron origen; siendo una desventaja su bajo poder de encapsulación y, si se emplea una mezcla de fosfolípidos, su distribución asimétrica.

b) Remoción de detergentes: Este método, frecuentemente utilizado para preparar a los liposomas SUV, se basa en la remoción de un detergente, mismo que se encarga de solubilizar a los fosfolípidos que se han seleccionado para emplearse.

La remoción de colato y deoxicolato mediante diálisis de una mezcla de lípidos y proteínas, las cuales habían sido solubilizadas por el detergente, da por resultado la formación de las vesículas.

El detergente puede ser removido por otros métodos más recientes como es la centrifugación y la filtración en gel.

c) Incorporación de etanol: En éste caso los lípidos, disueltos en solución etanólica, son rápidamente incorporados a una solución acuosa en donde los liposomas SUV se formarán rápidamente.

Este método es rápido y sencillo, sin embargo, su mayor desventaja estriba en la disolución considerable de los liposomas obtenidos; resultando así una baja encapsulación de la fase acuosa.

Los liposomas pueden concentrarse por filtración al vacío.

d) Extrusión por prensa francesa: Los liposomas multilamelares pueden reducirse de tamaño mediante extrusión bajo presión alta empleando una prensa francesa; teniéndose como resultado liposomas unilamelares de tamaños heterogéneos. Sin embargo, sí se realizan progresivamente múltiples pases a través de la prensa, se reduce dicha heterogeneidad.

(21y 28)

2.6.7) FORMACION DE LAS VESICULAS

Se han propuesto dos maneras bajo las cuales se forman los liposomas :

- 1) Una pequeña sección de la bicapa horizontal se puede romper y cerrarse así misma.
- 2) Parte de la bicapa se obliga a brotar hacia fuera del agregado de manera que se curve .

(Fig. 12)

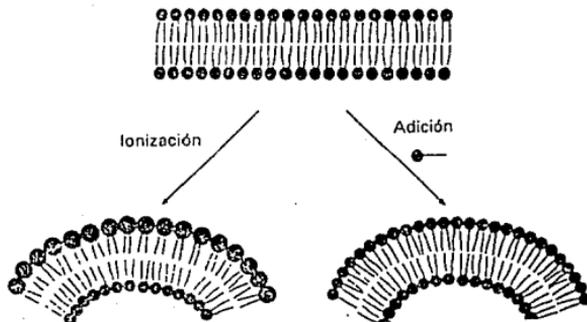


Fig 12 . La formación de los liposomas a partir de la bicapa lipídica se logra por la adición de agentes que incrementan el área de la monocapa externa.

Es posible que se forme una curva en la bicapa mediante la introducción de agentes que incrementen el área de la monocapa lipídica externa en relación con el área de la monocapa lipídica interna. Una manera de llevar a cabo lo anterior es incrementar el tamaño de las cabezas polares de los lípidos externos; por ejemplo, la ionización de la capa externa atrae moléculas hidrofílicas que se unen a las cabezas polares, aumentando efectivamente su tamaño.

El área de la monocapa externa también pueda incrementarse al intercalar ciertas moléculas anfifílicas entre los lípidos existentes como, por ejemplo, un detergente.

Ambos procesos deben realizarse relativamente rápido; de lo contrario, la monocapa interna empezará a incorporar ambos tipos de moléculas, hidrofílicas e hidrofóbicas, y como consecuencia, la simetría planar retornará finalmente.

(21)

2.6.8 } CONTROL DE CALIDAD

Los liposomas se someten a un riguroso control analítico que abarca los siguientes aspectos:

- a) Características organolépticas
- b) Características fisicoquímicas
- c) Estudio morfológico

Dentro de las características organolépticas se toma en cuenta apariencia, color y olor

Las características fisicoquímicas consideran las siguientes determinaciones : pH, densidad, contenido de lípidos (%), contenido de fósforo (% / lípidos) e índice de peróxido ($mEqO_2 / Hg$).

Los fosfolípidos pueden evaluarse tomando en cuenta dos componentes característicos : la fracción lipídica y el grupo fosfato. Con objeto de realizar ésto, es necesario romper la estructura del liposoma de manera que se pueda separar la fracción lipídica del excipiente y después extraer a ésta última.

El estudio morfológico puede llevarse a través de 3 técnicas complementarias :

- 1) Microscopía electrónica después de tinción negativa.
- 2) Microscopía electrónica después de congelación-fragmentación.
- 3) Espectroscopía de fotocorrelación.

Las técnicas que emplean microscopía electrónica poseen la ventaja de proporcionar una visualización de los liposomas, pero la información obtenida es esencialmente cualitativa y solamente la congelación-fragmentación proporciona una estimación del diámetro de las vesículas; sin embargo, ésta técnica es muy complicada.

La espectroscopía de fotocorrelación posee la doble ventaja de ser muy sencilla y proporcionar una estimación de la uniformidad del tamaño de las vesículas . Sin embargo, los resultados no siempre son fáciles de interpretar, además de que para obtenerlos se requieren cálculos muy complejos.

(31)

Las fotografías 13 y 14 muestran a los liposomas utilizando las técnicas 1 y 2.

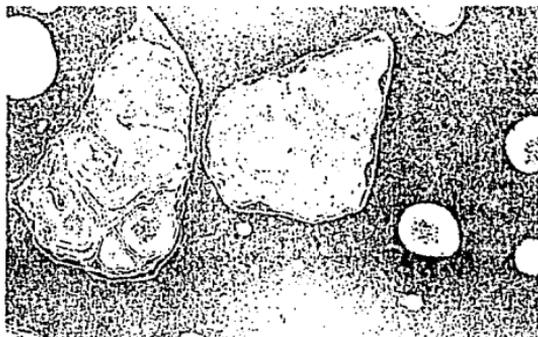


Fig 13 . Observación de los liposomas empleando microscopía electrónica después de tinción negativa.
(X 68,000)

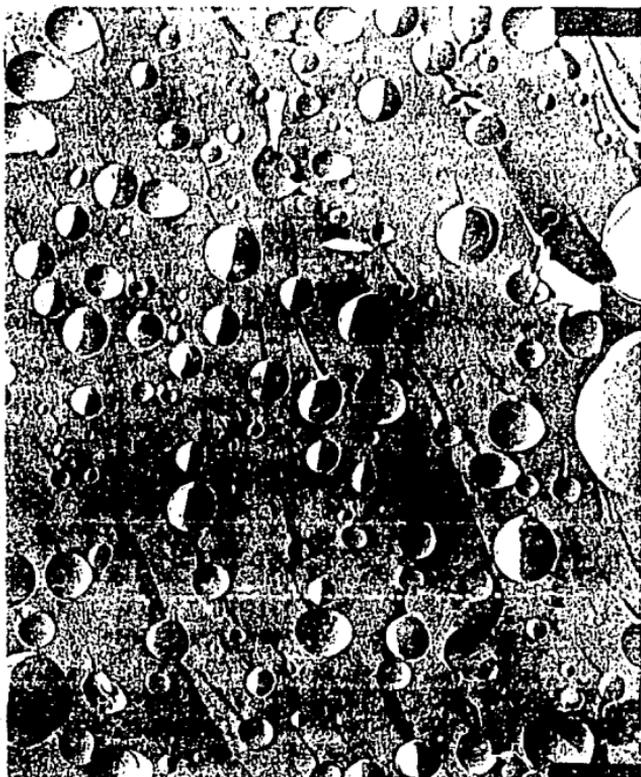


Fig 14 . Observación de los liposomas empleando microscopía electrónica después de un proceso de congelación-fragmentación.
(X 40, 000)

2.6.9) INTERACCION CON LAS CELULAS

Los mecanismos bajo los cuales los liposomas pueden interactuar con las células son muy diversos (fig 15). Las diferentes posibilidades que se han reconocido son las siguientes:

a) Fusión : Debido a la similitud existente entre las membranas biológicas y los liposomas en cuanto a estructura y composición química, puede ocurrir una fusión entre ellos.

De ésta forma, las membranas liposomales se incorporarán al interior de las membranas celulares, llevando directamente su contenido a la célula.

b) Endocitosis o fagocitosis : Algunos liposomas pueden penetrar en su totalidad a través del mecanismo de transporte conocido como endocitosis. Así, muchas estructuras permanecerán envueltas en una invaginación de la membrana plasmática, la cual se transformará en una vesícula endocítica que, en su momento, será degradada por enzimas específicas

c) Adsorción : Ciertos liposomas pueden adsorberse en la superficie de la membrana celular. Dicha adsorción puede ser inespecífica, a través de interacciones electrostáticas, o bien, específica mediante ligandos. Los principios activos pueden descargarse en el exterior para dirigirse a la membrana plasmática y penetrarla, tal como lo harían en la ausencia de los liposomas, o bien, fundirse o ser fagocitados.

Los diferentes mecanismos que son factibles de presentarse no son mutuamente excluyentes. La contribución relativa de cada tipo de interacción está determinada por la composición de los liposomas y el tipo de células. Sin embargo, la cosmética no proyecta efectos sobre las células, sino sobre el tejido de la piel, por lo que la eficacia de los liposomas no está sujeta propiamente a éstos mecanismos. Prácticamente se concretan a llenar los espacios existentes entre las células al quedar libre su contenido.

(1, 26, 28 y 31)

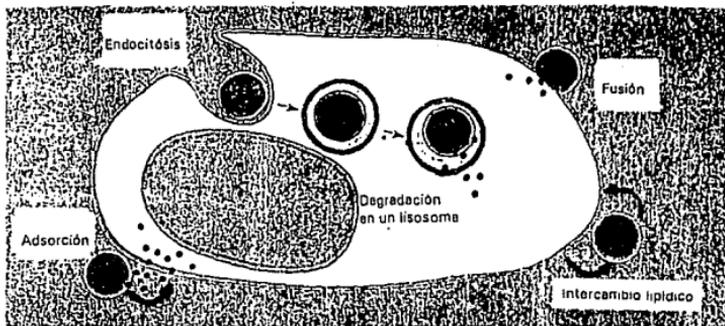


Fig 15 . Interacción de los liposomas con las células.

2.6.10) OTRAS APLICACIONES

Además de sus múltiples aplicaciones en la industria cosmética, los liposomas se están aprovechando en otras áreas de mayor trascendencia como Medicina, Biofarmacia, Inmunología, Biología Celular e Ingeniería Genética.

Por lo que respecta a la Medicina y Biofarmacia, actualmente se están empleando en la investigación de las propiedades de las membranas celulares, con el objeto de liberar principios activos eficiente y específicamente en el sitio de la enfermedad o el desorden . Con ello se pretende, por un lado, atenuar la toxicidad de ciertas sustancias y evitar efectos secundarios adversos y, por otro, aumentar la eficacia de los tratamientos terapéuticos.

(21 y 28)

En éste sentido, uno de los primeros logros explotó a la red corporal de defensa denominada Sistema fagocítico mononuclear, por su capacidad de engullir cualquier partícula extraña al organismo, incluyendo a los liposomas, reportándose gran éxito en el tratamiento de la leishmaniasis y ciertas infecciones fúngicas que atacan principalmente a los órganos de dicho sistema (hígado, bazo y pulmones) (Ver fig 16)

Por otro lado, al representar el sistema fagocítico un obstáculo para la liberación de principios activos hacia otro tipo de células del organismo, ha obligado a que se esfuercen los científicos en desarrollar liposomas capaces de evitar el sistema inmunológico.

(21)

Los intentos más recientes han tenido como objetivo disfrazar a los liposomas como glóbulos rojos, al simular la composición lipídica de las membranas de éstos. Se ha propuesto también que el polietilenglicol, adicionado en la superficie membranosa liposomal, logra evitar la adhesión de las lipoproteínas y osponinas que participan en la identificación de las partículas ajenas al cuerpo. De ésta forma, pasan inadvertidamente al torrente sanguíneo prolongándose su permanencia en éste. (Ver fig 17).

En general, los liposomas con éstas características serán útiles en los casos en se requiere que su contenido circule por períodos relativamente largos, o donde el objetivo sea otro lugar que no sean las células del sistema inmune.

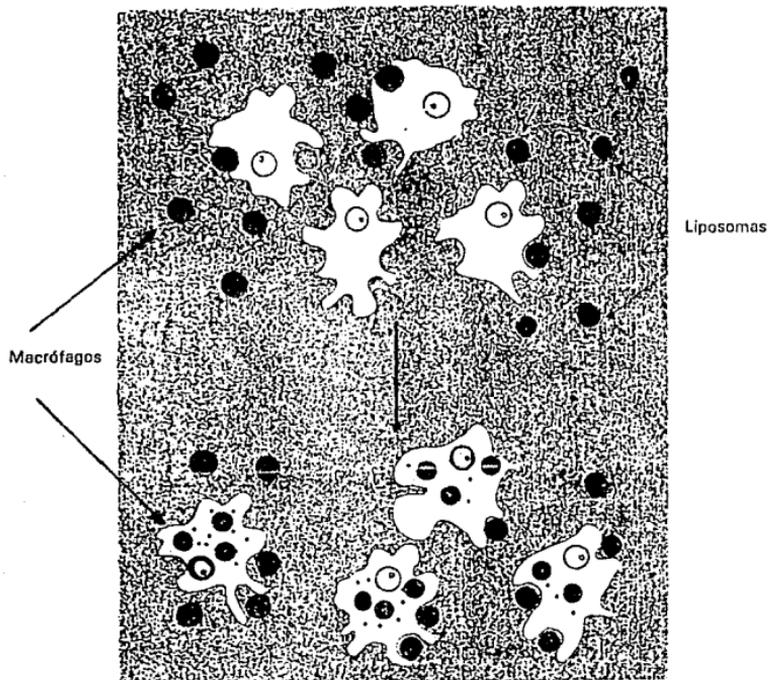


Fig 16. Los macrófagos engullen la mayoría de los liposomas cargados con principios activos, cuando éstos son introducidos en el torrente sanguíneo . La feishmaniasis puede tratarse con liposomas que transportan principios activos antimoniales.

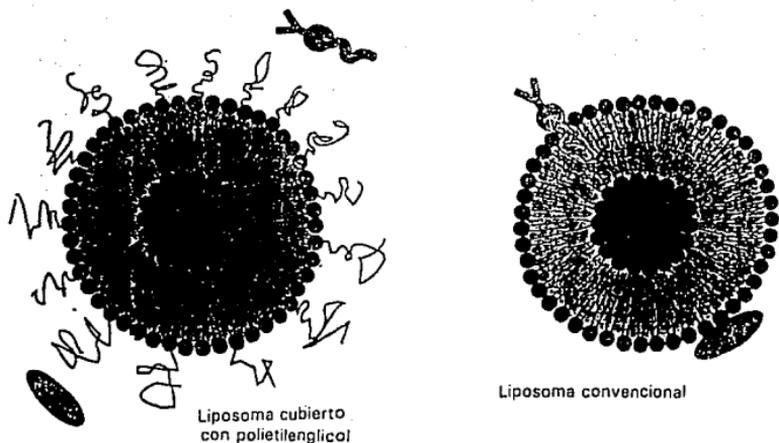


Fig 17 . Los liposomas convencionales y aquellos que logran evadir el sistema inmune difieren en la estructura de sus membranas lipídicas. Las lipoproteínas del plasma destruyen a los primeros, al quedar unidas a sus lípidos. Las moléculas del sistema inmune, denominadas opsoninas, se adhieren a la superficie de los liposomas convencionales, actuando como agentes que identifican a éstos como partículas extrañas, facilitando su ingestión y destrucción por los macrófagos. Los liposomas que logran evadir el sistema inmune están cubiertos con cadenas largas de polietilenglicol, el cual no permite lo anterior.

La aplicación local de principios activos liposomales ha sido útil en el tratamiento del glaucoma y asma.

(21)

La especificidad de los liposomas en su interacción con las células, hasta el momento ha tenido grandes progresos al incorporar ligandos apropiados que reconozcan una estructura membranosa en particular; entre ellos se encuentra la lecitina, proteínas virales, inmunoglobulinas y recientemente anticuerpos monoclonales . Bajo éstas condiciones, los principios activos encapsulados mantienen todas sus propiedades, lo cual no sucede si se emplea otro acarreador, pues es factible que sufran modificaciones químicas. (Ver fig 18)

(21 y 28)

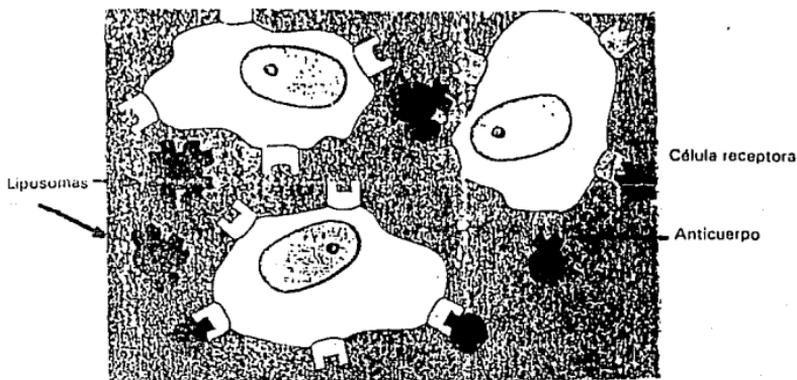


Fig 18 . La liberación de los principios activos en el sitio específico se ha logrado al combinar liposomas y ciertas moléculas que presentan una afinidad particular por receptores celulares; éstas moléculas pueden ser anticuerpos unidos a la superficie liposomal, los cuales se unirán a la célula que exprese el antígeno complementario, y no otro tipo de célula. Esto reduce los efectos tóxicos sobre tejidos y órganos sanos e incrementa la eficacia de los tratamientos terapéuticos.

Otro aspecto prometedor de los liposomas es su uso como adyuvantes y agentes inmunogénicos, lo cual podría significar grandes avances dentro de la inmunología.

La difusión lenta de los antígenos encapsulados o presentados en la superficie en los liposomas, estimula respuestas humorales fuertes sin que se requieran adyuvantes.

Lo anterior puede ser ventajoso en los procedimientos de vacunación, pues se evitarán los problemas que se presentan con el uso de adyuvantes clásicos como el de Freund y el precipitado de Hidróxido de Aluminio, los cuales resultan ser altamente reactogénicos.

La respuesta humoral que se obtiene por exposición del antígeno en la superficie del liposoma es tan eficiente, si no es que mejor en muchos casos, como la que se produce por inmunización con antígenos encapsulados.

Entre la multitud de antígenos estudiados empleando a los liposomas como adyuvantes se tiene:

- Virus de la hepatitis B
- Protozoo de la malaria (*Plasmodium falciparum*)
- Bacteria del cólera (*Vibrio cholerae*)
- Virus de la rubeola
- Virus de la influenza.

(28)

Por último, la habilidad de los liposomas para transportar y proteger las sustancias encapsuladas, puede jugar un papel importante en la Ingeniería Genética para la liberación de ácidos nucleicos en las células.

En años recientes se ha tenido gran interés en incorporar genes nuevos o extraños a las células. En algunos casos, esto permite a los científicos explorar diversas propiedades básicas del gen en cuestión, al investigar cómo su actividad altera a la célula receptora ya que ésta última, en condiciones normales, no expresa dicho gen. En otros, éste esquema prepara el camino para la terapéutica de reemplazo genético o protéico en ciertas enfermedades que se caracterizan por presentar ciertas deficiencias genéticas. La razón fundamental en éste renglón es

el poder compensar el gen faltante al insertarse en la célula el gen funcional, o alternativamente su producto protéico. (28)

Se sabe que la membrana celular representa una barrera natural hacia moléculas grandes como las proteínas y los ácidos nucleicos y una manera de vencer dicha barrera es el inyectarlos directamente en la célula, estrategia que no siempre tiene éxito, o bien, engañar a la célula al empaquetar los genes y las proteínas en el interior de un acarreador, el cual deberá ser reconocido por la célula receptora. Una vez en el interior de ésta, los liposomas vacían su contenido molecular en el citoplasma celular, de aquí que se espere que las moléculas sean transportadas al sitio correcto en la célula y que realicen sus funciones .

(21)

Dependiendo de las características del liposoma, su contenido puede depositarse en vesículas intracelulares enzimáticas conocidas como lisosomas, o simplemente, liberarse en el citoplasma celular.

Se presenta un problema con la liberación del ADN, cuya actividad no se lleva a cabo en los lisosomas ni en el citoplasma, donde la mayor parte es degradado. Se sabe que la incorporación del ADN en el núcleo depende de otro proceso de transporte intracelular que aún no se ha podido controlar; sin embargo, cierta cantidad sí llega a penetrarlo.

En adición de la anticipada utilización de los liposomas para el tratamiento de ciertas enfermedades congénitas, la posibilidad de introducir ARN o ADN en las células por los liposomas, tendrá posiblemente otras consecuencias inmediatas en Biología Celular para el estudio de la relación estructura-función de dichas moléculas, pues las técnicas hasta ahora desarrolladas para introducir material genético a las células son ineficientes, particularmente para las células no fagocíticas. Como muestra de lo anterior, la Biología Celular y la Botánica han tenido algunos éxitos en sus intentos al incluir el plásmido de *E. coli* mismo que tiene la propiedad de resistir a las tetraciclinas, pues han logrado obtener como resultado colonias resistentes a dicho antibiótico.

El mismo método fué empleado para introducir fragmentos de material genético ajeno a las células (protoplastos) de plantas de cultivo, las cuales carecen de pared celular. Los resultados fueron de lo más interesantes, ya que las técnicas existentes no permitían que los ácidos nucleicos se introdujeran en las células. El plásmido Ti de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* permitió a las plantas en estudio asimilar el nitrógeno atmosférico. (21 y 28)

2.7) CARACTERISTICAS ORGANOLEPTICAS Y DE TIPO ESTETICO QUE SE BUSCA EN LA CREMA FORMULAR

Las características que más aprecia el consumidor en una crema emoliente, son las de tipo organoléptico y también las de tipo estético; es por ello que dichas características se deben de tomar muy en cuenta al formular una crema de ésta naturaleza.

De ésta forma, se fabricará un producto que, además de cumplir con las funciones específicas que le caracterizarán, guste al consumidor. Por otra parte, la determinación de las características organolépticas y estéticas de la crema son un factor importante en la selección de excipientes y/o ingredientes.

Las características que se buscan en la crema emoliente y nutritiva a base de liposomas, son las siguientes:

- Color
- Olor agradable
- Fácil aplicación
- Consistencia semifluida
- No deje sensación pegajosa ni grasosa
- No produzca irritación a la piel
- No produzca dermatosis
- Produzca sensación de frescura
- Pueda absorberse fácilmente

- Pueda absorberse fácilmente
- Cumpla con la acción emoliente y nutritiva y mejore el aspecto estético de la piel

(14, 15, 22 y 29)

2.8) SELECCION DE LOS INGREDIENTES

La selección de los ingredientes que integran la formulación se hacen tomando los siguientes factores:

- Compatibilidad
- Estabilidad fisicoquímica
- Estabilidad microbiológica
- Toxicidad
- Disponibilidad en el mercado
- Costo
- Características organolépticas y estéticas deseadas en el producto

(14, 15, 22 y 29)

2.9) FORMULACION

Prácticamente los químicos formuladores de productos para aliviar la piel seca sólo pueden buscar mantener o restaurar la elasticidad y flexibilidad del estrato córneo. Independientemente de cual sea el mecanismo básico que esté operando, sólo hay dos formas cosméticas de tratar una piel seca:

- 1) Hidratarla con agentes miscibles con agua aplicados externamente o lubricarla.
- 2) Ocluir la piel con materiales insolubles en agua.

En función de su uso, a los primeros se les llama humectantes y a los últimos emolientes o acondicionadores.

El término humectante se emplea a menudo simultáneamente con emoliente y se utiliza para describir un material que da a la superficie de la piel un tacto suave y terso. Los mejores

materiales son los humectantes ocluyentes que combinan el efecto suavizante de los emolientes con la acción retenedora de la humedad de los humectantes y la actividad recubriente de los lubricantes. Esta combinación de ingredientes contrarresta el efecto de pérdida de humedad manteniendo a la piel tersa, suave y elástica, por lo que se tomaron en cuenta para el desarrollo de la fórmula.

Debido a que la posibilidad de proveer agua exogénicamente, o desde el exterior, está limitada por la evaporación relativamente rápida; uno de los puntos claves al formular productos humectantes es tratar de retardar la evaporación con el uso de diferentes agentes tales como gomas, arcillas, resinas, humectantes entre otros.

(18)

La preocupación por la piel rugosa o partida debe establecer claramente la diferencia entre la piel seca normal y las patologías dermatológicas.

La piel seca o Xerosis, así como la Psoriasis, son el resultado de un estrato córneo externo defectuoso que permite pérdida excesiva de agua.

(17, 18 y 27)

En ésta formulación realmente se va a considerar la piel seca que se origina por el desengrase y la deshidratación de las capas superficiales superiores del estrato córneo, consistente en una producción excesiva de células de la piel y que, desde el punto de vista fisiológico, presenta un defecto en el cemento intercelular que mantiene unidas a las células del estrato córneo. En éste tipo de piel, las células no se descaman a velocidades normales sino que se juntan por períodos largos, a modo de que la descamación ocurre en forma de placas o sábanas delgadas.

Un estrato córneo saludable depende de un balanceo correcto de lípidos, sustancias higroscópicas solubles en agua y agua con los líquidos intercelulares, que juegan un papel importante en las propiedades de retención de agua. No solamente están presentes lípidos sino también glicoproteínas, desmosomas, productos de degradación de péptidos y productos ecinos y sebáceos, dependiendo del lugar anatómico. Incluso, se ha comprobado que existe una

actividad enzimática que lleva a alteraciones de membrana , mismas que ejercen profundos efectos sobre el metabolismo de los lípidos epidérmicos y la síntesis de ADN.

(18 y 27)

Dicho balanceo, en muchas, ocasiones se altera por ciertos agentes extrínsecos como el agua, jabón, radiaciones solares; o bien, por los efectos de la edad, pues se sabe que muchas de éstas sustancias dejan de sintetizarse en la cantidad requerida para que dicha capa desempeñe sus funciones y luzca suave, tersa y flexible. Por ello, se tomó muy en cuenta la composición del estrato córneo y de los elementos que regulan la humedad de la piel para el desarrollo de la fórmula, ya que el producto intenta proporcionar a ésta capa las sustancias necesarias para reestablecer su apariencia y función protectora, sobre todo en las pieles maltreatadas o maduras.

En base a lo anterior, se consideró la presencia de liposomas, humectantes, emolientes, lubricantes y vitaminas como principios activos en la formulación. Sin embargo, para asegurar la estabilidad de los primeros se hizo una adecuada selección de los tensoactivos, pues se evitó el uso de aquellos que puedan atacar a las vesículas.

A continuación se citarán los criterios que se tomaron para la selección de los ingredientes de la formulación.

LIPOSOMAS

En el presente caso se ha seleccionado de la gran variedad de liposomas que ofrece la compañía SEDERMA, los DERMOSOMAS que son liposomas superhumectantes. Los principios activos que contienen son : fosfolípidos que forman la membrana de los liposomas y agua encapsuladas dentro de las vesículas.

Los liposomas seleccionados restauran la humectación de la epidermis al reformar la película hidrolipídica, refuerzan el indispensable rol protector de la barrera de la piel, pues mejoran la cohesión de la capa córnea al incorporar lípidos adicionales, es decir, proveen al estrato córneo con agua y lípidos que forman un cemento intercelular que mejora su cohesión y retención de agua.

Los liposomas se presentan como un líquido espeso, opaco, de color beige con un ligero olor característico y se preparan a partir de fosfolípidos naturales del frijol de soya. Su estabilidad con el tiempo y su preservación está asegurada por la incorporación de un cierto número de adyuvantes y por una mezcla de parabenos y sorbato de potasio.

Densidad:	1.05
pH:	4.8--5.8
Contenido de lípidos:	1.5 -- 2.3 %
Contenido de Fósforo (% lípidos)	2.5 --- 3.0
Índice de peróxido: (m EqO ₂ / Kg):	menor a 5

Los fosfolípidos se pueden evaluar a través de dos componentes que son la fracción lipídica y el grupo fosfato. Con objeto de realizar ésto, es necesario romper la estructura de los liposomas, de manera que se separe la fracción lipídica del excipiente para después extraerla.

Las vesículas de los liposomas son relativamente frágiles, por lo que deben introducirse a la fórmula cosmética después de haber efectuado la emulsificación (aproximadamente a 75° C) y que la mezcla se haya enfriado hasta 40° C. En éste momento se agregan con agitación suave y se continúa enfriando hasta alcanzar la temperatura ambiente.

Por lo que toca al perfume, se añade a los 30° C con agitación suave y cuidando de que no haya sido disuelto por ningún surfactante. Así mismo se debe cuidar de que no haya cationes divalentes, como Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺, ya que ocasionan la lisis de los liposomas.

Para ratificar que los liposomas están en perfectas condiciones, la compañía manufacturera los controla a niveles químico, organoléptico y morfológico.

En el aspecto organoléptico, al cabo de 120 días de almacenamiento a 20° C no se observó ningún cambio en color, olor o viscosidad.

Químicamente, se llevaron determinaciones de peróxidos por la técnica de titulación sobre muestras almacenadas 120 días a 20 ° C. Bajo éstas condiciones el índice de peróxidos siempre fue inferior a 5 m EqO₂ / Kg.

Morfológicamente se observó, por microscopio electrónico después de una tinción negativa, que la estructura permaneció intacta después de 120 días a 20° C. Sin embargo, como el almacenamiento prolongado a 45° C puede ocasionar cambios en los liposomas, se sugiere como margen adicional de seguridad, se mantengan en cuarto frío (4 °C) y al abrigo de la luz.

(31)

HUMECTANTES

Permiten que la piel madura posea una humedad en equilibrio mayor que lo normal. Los glicoles de menor peso molecular tales como la glicerina, el propilenglicol y el sorbitol, se pensaba que eran lo más cercano a lo ideal como humectantes. Sin embargo, mientras un agente como la glicerina absorbe humedad de la atmósfera cuando ésta tiene alta humedad, retira humedad de las capas inferiores de la piel más que del aire cuando la humedad es baja, contribuyendo así a dar un aspecto seco a la piel.

En cambio, los polietilenglicoles son muy humectantes hasta un peso molecular de 500 .A partir de ahí, disminuye su capacidad para tomar agua.

Los glucósidos que resultan de la etoxilación y la propoxilación de la metilglucosa con 10 y 20 moles de óxido de etileno y de propileno dan humectantes con propiedades emolientes. También se recomienda la MEA (monoetanolacetamida) que, a parte de ser humectante, tiene propiedades anti-irritantes. Por otro lado, considerando el papel que tiene el Factor Humectante Natural (FHN) como uno de los elementos que regulan la humedad de la piel, los agentes tales como el carboxilato de pirrolidona, urea y el ácido láctico siguen teniendo aceptación como humectantes.

El ácido láctico (o lactato de sodio) es parte del FHN , causa reducción en la imperancia eléctrica, indicando humectación mayor.

Takahashi ha demostrado que la flexibilidad del estrato córneo esté relacionada muy de cerca con la absorción de ácido láctico. Este aparenta suavizar al estrato córneo mediante la absorción de grupos polares de las cadenas de queratina y por la reducción de las interacciones entre ellas, sin aumentar el contenido de agua en el estrato córneo.

(18 y 27)

La urea actúa muy diferente. Se puede considerar como un humectante penetrante que tiene un alto efecto osmótico. Al difundirse a través del tejido superior, altera las uniones hidrogenadas. Esto dispersa la continuidad de la queratina epidérmica y expone los lugares que pueden unirse al agua. La solubilización hidrotrópica puede facilitar el camino de la transportación del agua hacia el estrato córneo. Hay que recordar que el producto se debe mantener a pH ácido para evitar que la urea se descomponga en amoníaco.

(18)

EMOLIENTES

Los emolientes incluyen una gran variedad de compuestos que van desde petrolatos, aceites minerales de hidrocarburos relacionados con ellos, hasta ésteres relativamente no grasos como el palmitato y el miristato de isopropilo. Entre los extremos está un gran conjunto de grasas, aceites y ceras incluyendo lanolina, ácidos grasos, alcoholes grasos, ésteres de triglicérido, ésteres de ceras y ésteres de alcoholes polihídricos.

(18)

Mientras que el tacto que dan los emolientes es evidente, el mecanismo de acción emoliente está definido parcialmente. Sería excesivamente sencillo explicar la emolencia de sustancias no oclusivas por medio de un efecto lubricante.

Una sustancia oleosa se puede colocar por sí misma entre las lamelas del estrato córneo, permitiendo que éstas resbalen una sobre otra y que la piel se flexione más fácilmente y sin roturas, pero las grandes diferencias en propiedades fisicoquímicas de una multitud de materiales emolientes, tales como viscosidad, facilidad de extensión, etc; hacen difícil explicar su emolencia simplemente por su papel lubricante.

(18 y 25)

El petrolato es el más eficiente agente ocluyente y emoliente para proteger la piel seca y permitir que se hidrate de nuevo. Estas propiedades derivan de que es una mezcla compleja de

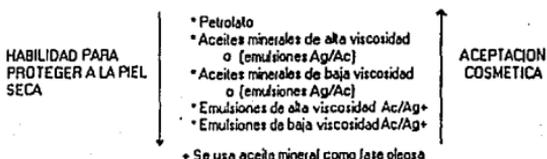
una amplia variedad de aceites y ceras minerales, lo cual lo hace un poco difícil de emulsificar (que a su vez hace pensar en que debe ser más difícil retirarlo de la piel).

(18)

Se han realizado diversos estudios para determinar la efectividad de los productos para corregir los síntomas de la piel reseca y uno de los mejores es el de Kilgman que usa lo que él llama método de regresión, es decir, la medición del tiempo que transcurre antes de que la piel regrese a su condición inicial de sequedad después de haber sido tratada con una sustancia o producto humectante y, en éste estudio, el petrolato mantuvo su posición única como agente ocluyente y farmacológico.

(18 y 20)

CLASIFICACION DE LAS PREPARACIONES EMOLIENTES EN FUNCION DE SU VALOR DE PROTECCION Y ACEPTACION



Probablemente lo más indicativo en éste sentido es el reporte de Ghadially y colaboradores referente a los beneficios que la piel recibe por oclusión. En varios voluntarios, la barrera de la piel fué alterada limpiándola con acetona. Se midió posteriormente la recuperación de la barrera en sitios no tratados y en partes cubiertas con petrolato. Se anticipaba que una

oclusión de éste tipo interfiriera con la recuperación de la barrera pero, en realidad, el petrolato aceleró la recuperación de ésta después del desengrase con acetona. Usando técnicas especiales de tinción, los autores de la prueba pudieron comprobar que el petrolato no se depositó sobre la superficie de la piel, sino que penetró en la fase intercelular y no se integró dentro de las bicapas intercelulares.

(11)

LUBRICANTES

El ácido hialurónico (HA) y sus sales son miembros de los mucopolisacáridos no protéicos .

(MPS) o glicosaminoglicanos, sustancias como geles que se encuentran en la sustancia de la dermis, mismas que rodean las fibras de colágeno y elastina. Alrededor del 70 % de todos los MPS son ácido hialurónico, correspondiendo al resto a sulfatos de condroitina.

El uso de MPS como lubricantes se basa en su acción como plastificantes o lubricantes de las fibras de colágeno, ayudando así a restringir la conversión de colágeno soluble a insoluble .

Mientras que la mayoría de los colágenos y elastinas que existen en el mercado son hidrolizados de bajo peso molecular, el ácido hialurónico se ofrece como un material hidrofílico de alto peso molecular, que funciona como una especie de esponja molecular permitiendo una amplia hidratación. El ácido hialurónico puede actuar también como un sistema de entrega transdérmico para otros ingredientes activos, ya que forma una matriz sobre la piel, permitiendo una mayor penetración debido a la hidratación de la piel.

(18)

VITAMINAS

El ácido retinóico o Vitamina A ácida, ha mostrado efectos concretos en el tratamiento de las arrugas, estimula la síntesis de colágeno, aumenta el flujo sanguíneo, genera la formación de nuevos corpúsculos celulares y normaliza los melanocitos y la estructura de la célula.

Muy recientemente se ha encontrado que, aparentemente, el ácido retinóico aumenta la reparación del tejido conjuntivo dérmico dañado por los rayos ultravioleta , lo que permite esperar que sea útil en retardar el envejecimiento ocasionado por la exposición al sol.

(18 y 24)

TENSOACTIVOS

Este petrolato va a requerir para incorporarse en una emulsión aceite - agua un HLB de 7-8, la cera de abejas requiere 9 y la porción de alcohol cetílico 15. Considerando las proporciones de cada uno que se harán intervenir en la fórmula facial, se va a requerir un valor de 8-9.

Por éste concepto, después de varias mezclas tentativas diferentes, siguiendo el proceso delineado en el manual: Sistema HLB - guía que ahorra tiempo en la selección de emulsificantes, se llegó a los conceptos óptimos con el uso de :

Steareth-10 (lipocol S-10) es el éter del alcohol estearílico con 10 moles de óxido de etileno; es un emulsificante no iónico aceite-agua que se mantiene fijo y estable bajo una gran variedad de pH. Es compatible con surfactantes aniónicos, catiónicos y no iónicos y presenta moderada tolerancia electrolítica al combinarse con Steareth- 2 (lipocol S-2), mismo que es el éter del alcohol estearílico con 2 moles de óxido de etileno (interviene como emulsificante auxiliar y estabilizador), forma sistemas emulsificantes no iónicos, libres de ésteres que, por su versatilidad, se recomiendan para cremas y lociones para el cuidado de la piel y emulsiones con pH alto o bajo. Ayuda también como solubilizador de fragancias y otros aceites polares. Sus propiedades básicas son :

Steareth 10 :	Apariencia a 25° C :	Sólido ceroso blanco
	Olor :	Suave característico
	Valor ácido :	1 máx
	% Hidroxilo :	5 - 90
	% Humedad :	máx
	HLB :	2.4 (carácter no iónico)

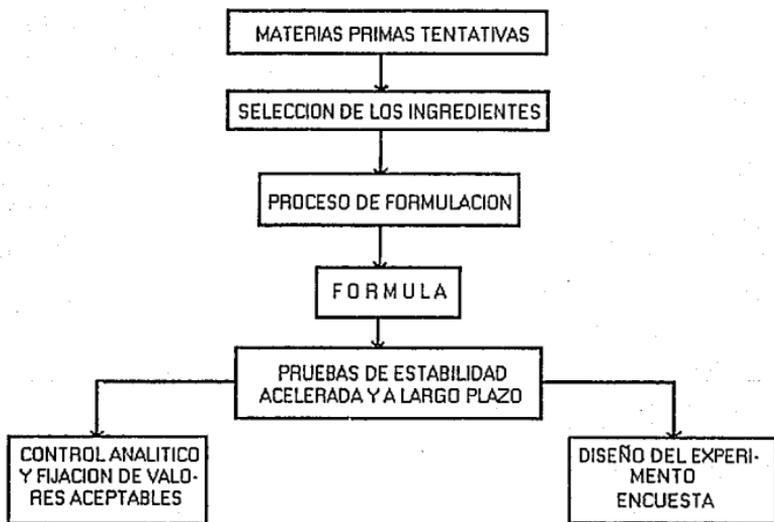
Solubilidad :	Soluble en alcohol isopropílico, dispersable en agua, aceite mineral y aceites vegetales.
Steareth 2 : Apariencia a 25° C :	Sólido ceroso blanco
Olor :	Suave característico
Valor ácido :	1 máx
% de Hidroxilo :	155 - 165
% Humedad :	1 máx
HLB :	49 (carácter no iónico)
Solubilidad :	Soluble en alcohol y miscible en tibio con aceite mineral y aceites vegetales.
	Es insoluble en agua

(23)

CAPITULO III

PARTE EXPERIMENTAL

3.1 | DIAGRAMA DE FLUJÓ



3.2) MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO

EL material que se empleó para el desarrollo del presente trabajo se indica a continuación:

3.2.1) MATERIAL DE LABORATORIO

- Agitadores de vidrio
- Cajas petri
- Espátulas
- Matraces Erlenmeyer de 500 ml
- Pipetas de 1, 2, 5 , 15 ml
- Termómetros (escala 0° a 175° C)
- Vasos de precipitados de 250 y 5000 ml

3.2.2) REACTIVOS

a) Materias primas

- Aceite mineral
- Acido esteárico
- Acido hialurónico
- Acido retinólico
- Agua destilada
- Alantoina
- Alcohol cetílico
- Alcohol cetearílico
- Alcohol estearílico
- Alcohol mirístico
- Antiespumante de silicona
- Antioxidante DBCA
- Arlacel 60/ 80/ 165/ 186
- Carbopol 934

- Cera blanca de abeja
- Cera carnauba
- Cutina cp
- C₁₂ - C₁₅ alcohol benzoato
- Dipropilenglicol
- Emulgade F
- Emulgador 31
- Glicerina
- Hidróxido de sodio
- Kathon CG
- Lanolina
- Liposomas SEDERMA
- Lunacera M/M
- Monoestearato de propilenglicol
- Miristato de isopropilo
- Nipagin
- Nipasol
- Octil dodecil estearato
- Palmitato de isopropilo
- Perfume
- Polietilenglicol
- Polisorbato 20
- Propilenglicol
- Steareth 2
- Steareth 10
- Trietanofamina
- Tween 61

- Vaselina blanca sólida
- Veegum pro/regular

Todas las materias primas empleadas son grado cosmético.

b) Medios de cultivo

- Agar Pseudomonas (Bioxon)
- Agar Sabourad (Bioxon)
- Agar Soya caseína digerida (Bioxon)
- Agar Vogel-Johnson (Bioxon)

3.2.3) EQUIPO

- Autoclave
- Báscula electrónica de 4.200 Kg de capacidad (Sartorius Tipo 1574)
- Batidora de 2 kg de capacidad (Kitchen Aid)
- Campana de flujo laminar
- Estufa calibrada a 40 ° y 53° C
- Reactor y Homogenizadora (Collo Velox)
- Parrilla eléctrica con agitador magnético y magnetos
- Potenciómetro electrónico (Beckman Modelo 123118)
- Penetrómetro (Kontaktor)
- Termobalanza (Ohaus MB 200)

3.3) METODOLOGIA

La metodología seguida en éste trabajo se describe a continuación:

- 1) Seleccionar las materias primas que son indispensables para formular la base de una crema, procurando que se tengan varias opciones.
- 2) Estudiar que clase de liposoma es el más adecuado para lograr el efecto cosmético que se persiguió.

(efecto emoliente y nutritivo) tomándose en consideración los siguientes aspectos: costo, sitio que se pretende alcanzar, compatibilidad con las materias primas y contenido interno de los liposomas.

3) Teniéndose las materias primas que fueron compatibles con los liposomas, según lo especificado por la literatura, comenzar los estudios propios de formulación, donde se decide qué materias primas se utilizarán y en qué proporción.

Para éste tipo de estudios la metodología que se sigue es la de ensayo y error consultándose lo que indique la literatura (apoyo teórico); esto es, si se tiene algún obstáculo se identifica su origen y se modifican las variables que estén influyendo en ello cuantas veces sea necesario hasta alcanzar los propósitos planteados.

4) Una vez que se haya obtenido la fórmula con las características organolépticas, fisicoquímicas y microbiológicas deseadas, establecer cuáles son las pruebas de control de calidad a las que se someterá el producto en su fase granel y final, así como los rangos de aceptabilidad para cada una de ellas. Las pruebas de control de calidad serían: apariencia, color, olor, pH, densidad, consistencia, contenido de agua, presencia de fenoxietanol, estabilidad acelerada, estabilidad a largo plazo y microbiológicas.

5) Indicar la formulación final así como el procedimiento y las condiciones bajo las cuales es recomendable fabricar el producto.

6) Realizar una encuesta en un determinado sector de la población para corroborar si la crema a base de liposomas suaviza los efectos del envejecimiento.

3.4) CONTROL ANALITICO

Las pruebas de control analítico que se harán en el producto terminado se clasifican de la siguiente manera :

- a) Organolépticas o cualitativas
- b) Fisicoquímicas
- c) Microbiológicas
- d) Estabilidad

A continuación se describen las técnicas empleadas en cada una de las pruebas.

* **Organolépticas** : tomar en cuenta apariencia, color, olor y efectos estéticos.

Estas pruebas se realizan observando simplemente las características organolépticas del producto, es decir, atendiendo sólo a la información proporcionada por los órganos de los sentidos.

Los efectos estéticos se evalúan organolépticamente aplicando la crema en la cara de diferentes personas con distintos tipos de piel, las cuales darán su opinión respecto a las características de la crema.

Las principales características de la crema que se toman en cuenta en éste caso son: aspecto, sensación al tacto, absorción y untuosidad.

* **Fisicoquímicas** :

- pH : tomar una muestra de aproximadamente 300 g de la crema y colocar en un vaso de precipitado. Realizar la lectura en un potenciómetro marca Beckman .

- Viscosidad : según sea necesaria de acuerdo a su consistencia.

- Densidad : Para determinar la densidad del producto utilizar un picnómetro pesado previamente, llenarlo homogéneamente con una muestra de la crema; una vez lleno, obtener el peso del picnómetro con la muestra a una temperatura de 25° C.

El cálculo de la densidad se hace con referencia a la densidad del agua, la cual se determina de la misma manera que para la muestra con producto y a la misma temperatura.

La densidad de la crema se calcula aplicando la siguiente fórmula :

$$\text{peso de la muestra} = \frac{\text{peso del pic. con muestra} - \text{peso del pic. vacío}}{\text{peso del pic. con muestra de agua} - \text{peso del pic. vacío}}$$

- Consistencia : Tomar una muestra suficiente de producto para llenar al ras una lata de 300 g procurando presionar lo más que se pueda al momento de colocar la crema, a manera de que no queden espacios con aire. Posteriormente tomar la lectura en un penetrómetro .

- Contenido de agua: El método que se sigue es el de arrastre de vapor con Xilol; sin embargo, debido a que se emplean solventes volátiles resulta muy problemático, por lo que se debe tomar como método alternativo la determinación en termobalanza, la cual consiste en colocar aproximadamente 1g de muestra y calentar a 95° C por espacio de 10 minutos. El aparato proporciona automáticamente el porcentaje de agua en la muestra.

- Presencia de fenoxietanol : realizar por cromatografía en capa fina y examinar la placa bajo luz UV una vez que el solvente se haya evaporado totalmente. Su valor Rf es de 0.47 y la marca se observa fluorescente.

Por lo general, la presencia de éste preservativo se determina mediante comparación con las manchas y los valores Rf de la solución de referencia y debe corresponder a los de la solución de comparación en tamaño e intensidad.

* Solución de prueba : 1 % (p/v) en etanol 96 % (v/v).

* Solución de referencia : solución del preservativo al 1 % (p/v) de un lote previo impecable en etanol al 96 % (v/v)

* Microbiológicas : Las pruebas microbiológicas que se realizan en el producto terminado son : cuenta total de mesófilos aeróbios, identificación de *Staphylococcus aureus* , identificación de *Pseudomona aeruginosa* y cuenta total de hongos y levaduras.

Las técnicas seguidas para cada prueba son las siguientes :

A) Cuenta total de mesófilos aerobios :

Tomar asépticamente en campana de flujo laminar 10 g de muestra de la crema y suspender en agua estéril con ayuda de polisorbato 20, agitando mecánicamente y calentando a 42° C.

Aforar la muestra anterior 100 ml con solución buffer de fosfatos a pH= 7.2. Pipetear 2 ml de ésta solución y colocar cada uno en cajas petri estériles. Adicionar a éstas aproximadamente 15 ml de medio Agar Soya Caseína digerida, previamente fundido y enfriado a 45° C.

Tapar las cajas petri y mezclar la muestra con el medio por rotación de las cajas, dejar solidificar el contenido de cada caja a temperatura ambiente; a continuación incubar a una temperatura de 35° C por espacio de 48 horas, junto con un control. Después de incubar, observar las placas para detectar posible crecimiento y contar el número de colonias en las dos cajas.

El resultado se expresa en Número de colonias / g de crema y calcular mediante la siguiente fórmula :

$$\text{No. de colonias/g de crema} = (\text{No. de colonias / ml}) \left(\frac{100\text{ml}}{10 \text{ g}} \right) \times \text{Factor de dilución}$$

B) Identificación de *Staphylococcus aureus* :

De una de las colonias obtenidas en las cajas petri en la prueba para mesófilos aeróbios, tomar una muestra, la cual se siembra en una caja petri conteniendo medio Agar Vogel-Johnson. Incubar a 35° C por 24 hrs junto con un control.

Después de la incubación proceder a la observación macroscópica y microscópica para detectar posible desarrollo de *S. aureus*.

C) Identificación de *Pseudomona aeruginosa* :

De una de las colonias obtenidas en las cajas petri en la prueba para mesófilos aeróbios, tomar una muestra que se siembra en una caja petri conteniendo medio Agar Pseudomonas, incubar a 35° C por 24 hrs junto con un control. Después de la incubación proceder a la observación macroscópica y microscópica para detectar posible desarrollo de *P. aeruginosa*

D) Cuenta total de hongos y levaduras :

De la dilución inicial hecha en la cuenta total de mesófilos aeróbios, pipetear 2 ml en dos cajas petri, 1 ml en cada una, a las cuales adicionar medio Agar Sabourad previamente fundido y enfriado a una temperatura de aproximadamente 45° C.

Tapar las cajas, homogeneizar el contenido e incubar, una a 28° C y otra a 37° C durante 7 días cada una con su respectivo control. Después de la incubación proceder a la observación macroscópica y microscópica del posible desarrollo en las cajas.

El número de colonias se calcula de la misma forma como se calcula para la cuenta total de mesófilos aeróbios.

* Estabilidad acelerada y a largo plazo :

Este tipo de pruebas son importantísimas durante el desarrollo de una formulación, pues proporcionan una valiosa información acerca de la estabilidad química, fisicoquímica y microbiológica del producto desarrollado y predice, en cierto modo, el comportamiento del mismo a través del tiempo.

La manera de evaluar el efecto de la estabilidad acelerada es colocar 4 muestras con 100 g de crema en una estufa a temperatura controlada de 53° C por espacio de 15 horas. Al final de la prueba no debe aparecer rocío en las muestras ni detectarse flujo de aceite.

Para las pruebas de estabilidad a largo plazo se requieren 4 muestras con 100 g de producto, las cuales se colocan en una estufa a temperatura controlada de 40° C por espacio de 6 semanas .

(aproximadamente 1000 hrs) y meter otro grupo de muestras por un plazo similar en refrigerador a 0° C.

La forma en que se evalúa el efecto de ésta prueba es realizar las determinaciones de control analítico antes y después de la prueba, de manera que se detecten posibles cambios en el producto.

En ambos casos, al final de la prueba no debe aparecer agua ni migración de aceite, además de que las pruebas de control analítico antes y después de los tratamientos no deben indicar cambio alguno.

3.5) DISEÑO DEL EXPERIMENTO

Para corroborar si verdaderamente el uso de la crema a base de liposomas produce efectos palpables sobre el usuario, suavizándose los efectos del envejecimiento, realizar una encuesta en determinado sector de la población. Lo anterior se considera una determinación totalmente subjetiva , ya que desgraciadamente no se contó con el equipo que regularmente la cosmética emplea para medir la profundidad de las arrugas.

Las personas que participan en la evaluación del producto se seleccionan de acuerdo a su tipo de piel, lo cual se realiza por una persona calificada para ello. Trabajar con 4 tipos de piel y se requieren 10 personas para cada grupo, de sexo femenino y cuyas edades se encuentren entre 30 y 60 años.

Los tipos de piel se clasifican de la siguiente manera :

Tipo 1 Piel maduras sanas

Tipo 2 Piel maduras maltratadas

Tipo 3 Piel maduras secas y delicadas

Tipo 4 Piel jóvenes sanas

Al inicio del experimento se seleccionaron personas con tipo de piel grasa, sin embargo se observó en un estudio previo que en éste tipo de pieles se manifestaba un rechazo, pues el producto proporciona grasas que definitivamente no necesitan, o bien, no se presentó ningún efecto cosmético. Por éstas razones se consideró dejar a éste tipo de personas fuera de la encuesta, concluyéndose que el producto no va dirigido a pieles de tipo graso.

El objeto de contar con una clasificación de acuerdo al tipo de piel tiene como fin el establecer si existe alguna diferencia en el comportamiento de la crema en los distintos tipos de piel, al comparar los resultados obtenidos entre éstos de acuerdo a sus respuestas a un cuestionario.

A los sujetos que participan se les muestra en una sesión que la aplicación del producto debe ser por las noches en el rostro, procurando que éste se encuentre limpio y libre de impurezas. Se debe indicar que se encargarán de evaluar un nuevo producto, sin mencionar cuál, y se les proporciona una dotación suficiente para un mes, la cual es renovada hasta completar los seis meses de la evaluación.

Al finalizar el experimento, a cada sujeto se les proporciona un cuestionario para ser contestado individualmente sin que exista comunicación, de tal manera que la calificación otorgada a las preguntas no se vea influida por opiniones ajenas.

Dicho cuestionario se basa en los planteamientos de análisis sensorial y, más específicamente, en las pruebas de preferencia y aceptación; así como la observación directa de la persona. En él se consideran las siguientes características: aspecto, sensación al tacto, grado de absorción, untuosidad, mejoría, influencia del tiempo en la mejoría, efectos positivos con el tiempo, efectos irritantes y si al suspender el tratamiento se conserva la mejoría.

Cabe señalar que la motivación es un factor importante en ésta evaluación, pues se considera que un juez es más eficiente si es motivado; por ello, se trata de mantener interesados a los participantes y se les hace sentir que su participación es importante, lo cual proporciona resultados satisfactorios, pues las personas no abandonan el tratamiento.

Posteriormente se procede a agrupar la información obtenida de los cuestionarios para ser evaluada estadísticamente. A continuación se muestra el formato de preguntas empleado durante la encuesta :

1) Aspecto de la crema

Agradable Regular Malo

2) Sensación al tacto

Agradable Regular Malo

3) Absorción

Muy buena Buena Regular Mala

4) Untuosidad

Muy buena Buena Regular Mala

5) ¿ Al aplicar la crema notó mejoría ?

Muy buena Buena Regular Mala

6) Si notó mejoría, ¿ en cuánto tiempo ?

1 semana 2 semanas 1 mes Más del mes

7) Al seguir usando la crema, ¿ se apreciaron efectos positivos mayores con el tiempo ?.

(Contéste sólo en caso de que la respuesta 5 haya sido afirmativa).

Muy buenos Buenos Regulares Ninguno

8) ¿ Notó efectos irritantes ? Específíquelos.

9) Si suspendió el tratamiento, ¿ se conserva la mejoría lograda ?

Las preguntas se calificaron de acuerdo a una escala ordinal correspondiendo a :

Muy buena 4

Buena 3

Regular 2

Mala o nada 1

En el tiempo de mejoría equivale a :

1 semana	4
2 semanas	3
1 mes	2
Más de 1 mes	1

3.6) ANALISIS ESTADISTICO

Los resultados serán analizados estadísticamente de acuerdo a tres criterios estadísticos que permitan aceptar las hipótesis nulas siguientes:

A) H_0 ----- Existe independencia entre los tipos de piel y las respuestas a las características a medir.

Con esto se pretende aceptar si todas las características se presentarán independientemente del tipo de piel.

Para ello se aplicará el método estadístico que incluye a la prueba Ji-cuadrada y el análisis de frecuencias, de manera que se detecte si existe independencia entre las variables estudiadas. Esta se fundamenta en lo siguiente:

Un uso, y quizá el más frecuente de la distribución Ji-cuadrada es probar la hipótesis nula de que dos criterios de clasificación, cuando se aplica al mismo conjunto de entidades , son independientes.

(37)

Muchas veces surge la necesidad de determinar si existe alguna relación entre dos rasgos diferentes en los que una población ha sido clasificada y, en donde cada rasgo se encuentra subdividido en cierto número de categorías.

(6)

Cuando una muestra aleatoria que se obtiene de una población se clasifica de ésta manera, el resultado de las frecuencias observadas recibe el nombre de "Tabla de contingencia" con dos criterios de clasificación.

(37)

La decisión de aceptar o rechazar la hipótesis nula de independencia H_0 , se basa en qué tan bien se ajustan las frecuencias observadas en cada una de las celdas y las frecuencias que se esperarían para cada una, bajo la suposición de que H_0 es verdadera.

(36)

Esto es, bajo la hipótesis nula de independencia, se desea saber si existe una diferencia suficiente entre las frecuencias observadas y las correspondientes frecuencias que se esperan, tal que la hipótesis nula se rechace.

(6)

Así se tendrán que comparar las frecuencias esperadas y las observadas. Si la discrepancia es "pequeña" puede mantenerse la hipótesis nula; si la diferencia es "grande" se rechaza la hipótesis nula y se concluye que los dos criterios de clasificación no son independientes.

(36)

Si el valor de X^2 es mayor que el valor tabulado de X^2 para el nivel de significancia deseado, se rechaza la hipótesis nula a dicho nivel de significancia.

(6, 36 y 37)

B) H_0 ----- El comportamiento de la característica a medir es igual para todos los tipos de piel.

Es decir, si el grado en el que se presenta la característica a medir es igual para todos los tipos de piel.

Se aplicará en éste caso el método de inferencia no paramétrico: Análisis de Varianza con dos criterios de clasificación por rangos de Friedman, cuyo fundamento es el siguiente:

En la mayor parte de los procesos inferenciales el interés se centra en estimar o probar una hipótesis acerca de uno o más parámetros de la población . Los procedimientos no paramétricos no se refieren a parámetros de la población ni dependen del conocimiento de la población muestreada.

Estrictamente hablando, sólo aquellos procedimientos que prueban hipótesis que no son afirmaciones acerca de parámetros de la población, se clasifican como " No paramétricos ".

(37)

En general, los métodos paramétricos se aplican limitadamente a aquellas observaciones que tienen un carácter cuantitativo, es decir, se supone que lo que se observa es una cantidad numérica continua; las observaciones de tipo cuantitativo se definen en forma general sobre un intervalo.

Sin embargo, en muchas situaciones lo que se observa tiene un carácter cualitativo y, por lo tanto, no pueden definirse sobre una escala de intervalos. Tales situaciones se encuentran con frecuencia en las encuestas de mercado, en donde se pretende evaluar las preferencias del consumidor por un determinado producto; donde la escala de calificación es arbitraria, esto es, los números no tienen un significado físico más allá de representar con un número más grande la respuesta más favorable.

(6)

Esto precisamente se presenta en el presente trabajo, en donde la escala de calificación quedará implícita dependiendo de la opción que haya elegido el juez para cada pregunta.

Este método no paramétrico puede aplicarse cuando los datos que se están analizando constan simplemente de categorías o calificaciones; es decir, los datos pueden no estar basados en una escala de medición lo suficientemente sólidas como para realizar las operaciones aritméticas que son necesarias en los procedimientos paramétricos; lo cual también se presenta en éste caso.

(37)

La hipótesis nula para el procedimiento de Friedman es que los efectos atribuidos a los tratamientos son los mismos y, la hipótesis alterna, es que existe una diferencia en los tratamientos.

(6)

Esta prueba se basa en rangos, para cada bloque (renglón) se asigna un rango a las observaciones comenzando por un rango 1 y terminando con un rango K; entonces se suman los rangos del j-ésimo tratamiento (columna). Si la hipótesis nula es verdadera, debe esperarse que la distribución de los rangos observada dentro de cualquiera de las columnas sea el producto de factores aleatorios y, en consecuencia, debe esperarse que los números se presenten aproximadamente con la misma frecuencia en cada columna. Si, por otra parte, la hipótesis nula es falsa, debe esperarse una preponderancia de rangos relativamente altos o bajos por lo menos en una columna. Esta condición se reflejaría en la suma de rangos.

(37)

Las probabilidades para que χ_r^2 se encuentran tabuladas para valores pequeños de n y K, pero si el número de bloques n y el de tratamientos K no es muy pequeño ($n \geq 10$ y $K \geq 4$), la estadística χ_r^2 es en forma apropiada una variable aleatoria ji-cuadrada con $K-1$ grados de libertad.

Se rechaza la hipótesis nula cuando el valor de χ_r^2 es mayor que el valor crítico estipulado en tablas.

(6, 37)

C) Si se rechaza la hipótesis nula anterior, se procede a establecer entre qué tipos de piel existe la diferencia. Así la hipótesis nula formulada es:

H_0 ----- Existe igualdad entre las parejas de tipos de piel a comparar.

Para éste caso se aplicará la prueba de Duncan, la cual realiza comparaciones múltiples basándose en el cuadrado medio del error, de manera que se determine el comportamiento de la crema en los diferentes tipos de piel.

Dicha prueba se basa en lo siguiente:

Quando se realiza un análisis de varianza, como el que se expone en el inciso b, no se especifica qué medias son diferentes, únicamente se establece que por lo menos una es diferente a las otras. El rechazo de una hipótesis nula con base en la estadística de Friedman, no puede emplearse como fundamento para aceptar una hipótesis nula alterna en particular. Por lo tanto, ésta es una razón muy fuerte para que el investigador realice un análisis más completo para explorar las diferencias discernibles entre ciertas medias de la población. Con éste propósito se han propuesto varios métodos, entre ellos se encuentra el procedimiento de rangos estudentizados de Duncan, o prueba de rango múltiple de Duncan.

(6 y 36)

Se tiene que calcular el rango menos significativo R_p o la diferencia significativamente pequeña D , cuyo valor es el que efectúa las comparaciones con cada una de las medias.

Se rechaza la hipótesis nula cuando la diferencia entre las medias es mayor a R_p ó D al nivel de significancia deseado, con lo cual se especifica que la diferencia entre las medias bajo estudio es significativa (*) o altamente significativa (* *) según sea el caso.

(6 y 36)

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1) FORMULACION FINAL

DESCRIPCION	CONCENTRACION	FUNCION
Petrolato blanco tipo nieve	6.00 %	Emoliente-ocluyente
Cera de abejas	2.00 %	Emoliente
C ₁₂ - C ₁₅ alcohol benzoato	7.00 %	Emoliente
Octil dodecil estearato	5.00 %	Emoliente
Alcohol cetearílico	2.00 %	Emoliente
Polietilenglicol	2.00 %	Humectante
Dipropilenglicol	2.00 %	Humectante
Urea	0.05 %	Humectante
Solución de líposomas	10.00 %	Superhumectante
Acido hialurónico	0.03 %	Lubricante de fibras de colágeno
Acido retinóico	0.05 %	Vitaminas antiarrugas
Metil-propil-butilparabenon fenoxietanol	0.60 %	Conservador de amplio espectro que no genera formaldehído
Hidróxido de Sodio	0.14 %	Saponificante (para formar el hialuronato de sodio)
Steareth 10	0.50 %	Emulsificante primario
Steareth 2	0.50 %	Emulsificante secundario
Carbopol 934	0.25 %	Espesante
Trietanolamina	0.30 %	Para hidratar al carbopol
Perfume	0.15 %	Aromatizante
Agua desmineralizada libre microorganismos	css 100	

CAPITULO IV

4.2) METODO DE PREPARACION

El método de preparación que se siguió para el desarrollo de la formulación fue el siguiente:

• FASE A

Petrolato blanco tipo nieve

Cera de abejas

C₁₂ -C₁₅ Alcohol benzoato

Octil dodecil estearato

Alcohol cetearílico

Steareth 2

• FASE B

Metil- propil-butil paraben en fenoxietanol

Propilenglicol

Dipropilenglicol

Urea

Acido hialurónico

Carbopol 934

Steareth 10

Hidróxido de Sodio

Agua desmineralizada

• Después de la emulsificación agregar :

Trietanolamina

Solución de liposomas

Acido retinóico

Perfume

Procedimiento:

- 1) Calentar la fase A a 75° C procurando evitar el enfriamiento con la adición de cada material con fin de evitar posibles cristalizaciones y sin dejar de agitar.
- 2) En reactor a parte, se calienta a ebullición agua desmineralizada y a 80° C adicionar cada uno de los materiales de la fase B, teniendo en cuenta lo señalado en el punto anterior.
Aquí se considera un exceso de agua (agua de compensación) para recompensar posibles pérdidas por evaporación y por la toma de muestras para control analítico.
- 3) Adicionar la fase A a la B a 75° C lentamente y con agitación rápida y constante para lograr una homogeneización completa.
- 4) Enfriar gradualmente la emulsión hasta 55° C y agregar la trietanolamina con agitación lenta por espacio de 10 minutos. Para que dicho enfriamiento sea gradual, se inunda progresivamente la chaqueta del reactor, se abre la válvula de entrada de agua y se cierra la de salida. El efecto que se consigue con ello es darle más cuerpo a la crema.
- 5) Continuar con el enfriamiento gradual y adicionar la solución de liposomas a 40° C con agitación suave.
- 6) A 30° C agregar el ácido retinóico y el perfume sin dejar de agitar suavemente.

4.3) CARACTERISTICAS DEFINIDAS DEL PRODUCTO

Con el fin de dejar completamente definido el producto desarrollado, a continuación se resumen sus principales características :

• Organolépticas :

- Apariencia : muy buen aspecto, brillante, suave, sin grumos.
- Color : blanco
- Olor : floral-herbal

Estas tres características se realizaron comparando con un estándar de no más de 3 meses de antigüedad.

- Sensación al tacto : agradable, fresca
- Absorción : buena
- Untuosidad : buena
- Facilidad de aplicación : buena
- Físicoquímicas :
 - pH (25° C) : 5.9 - 6.4
 - Densidad (25° C) : 0.970 ± 0.005
 - Consistencia : 4 - 8
 - Contenido de agua : 64 - 67 %
 - Presencia de fenoxietanol : positiva
 - Estabilidad acelerada : No debe aparecer rocío ni detectarse flujo de aceite.
 - Estabilidad a largo plazo : a 40° C y 0° C no debe aparecer rocío ni migración de aceites.

Ninguna de sus propiedades organolépticas, físicoquímicas y microbiológicas deben modificarse.

- Microbiológicas : Mesófilos aeróbios : menos de 100 colonias
- Hongos y levaduras : ausencia,
- Patógenos : ausencia (*S. aureus* y *P.aeruginosa*)

4.4) ENCUESTA

Las preguntas No. 1 y 2 todos los jueces las calificaron de agradables (aspecto y sensación al tacto), que al tener un carácter cualitativo no fueron incluidas en el análisis estadístico.

La evaluación estadística se concentró, por tanto, en las preguntas 3 a la 7, las cuales fueron asignadas de la siguiente manera :

Absorción	I
Untuosidad	II
Mejoría	III
Tiempo de mejoría	IV
Influencia del tiempo en la mejoría	V

La información obtenida se muestra en la tabla siguiente:

DATOS CONCENTRADOS

TIPO DE PIEL	CARACTERÍSTICA				
	ABSORCION	UNTUOSIDAD	MEJORIA	TIEMPO DE MEJORIA	INFLUENCIA DEL TIEMPO
1	36	37	32	26	28
2	35	36	33	35	24
3	36	37	38	35	29
4	36	36	18	17	15

TIPO 1 : PIELES MADURAS SANAS

TIPO 2 : PIELES MADURAS MALTRATADAS

TIPO 3 : PIELES MADURAS SECAS Y DELICADAS

TIPO 4 : PIELES JOVENES SANAS

Los tratamientos estadísticos fueron tres, los cuales aportaron los criterios suficientes para evaluar las siguientes hipótesis nulas :

A) H_0 ----- Existe independencia entre los tipos de piel y las respuestas a las características a medir.

Para ello se aplicó el método estadístico que incluye a la prueba Ji-cuadrada y el análisis de frecuencia, pues detecta si existe independencia entre las variables estudiadas.

El estadístico de prueba es :

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^k \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

donde :

O_i = Frecuencias observadas

E_i = Frecuencias esperadas

Grados de libertad = $(r - 1) (c - 1)$

r = renglones

c = columnas

Para calcular las frecuencias esperadas se aplica :

$$F_{\text{esp}} = \frac{(T_c) (T_r)}{G_t}$$

donde :

T_c = Total de columnas

T_r = Total de renglones

G_t = Gran total

La decisión se toma al hacer comparaciones entre el valor calculado de χ^2 con respecto al valor tabulado de χ^2 a los niveles de confianza (α) de 0.95 y 0.99 %, es decir , si χ^2 obtenida es mayor que $\chi^2_{0.95} (4, 3)$ o $\chi^2_{0.99} (4, 3)$ se dice que es significativa o altamente significativa la prueba y se rechaza la hipótesis propuesta.

Los datos se muestran en la tabla de contingencia.

TABLA DE CONTINGENCIA

TIPOS DE PIEL	F	CARACTERISTICA				
		ABSORCION	UNTUOSIDAD	MEJORIA	TIEMPO DE MEJORIA	INFLUENCIA DEL TIEMPO
1	O _i	36	37	32	26	29
	E _i	(37.5024)	(37.5024)	(31.0808)	(29.0258)	(24.6591)
2	O _i	35	36	33	35	24
	E _i	(37.6559)	(38.4459)	(31.8627)	(29.7561)	(25.2795)
3	O _i	36	37	38	35	29
	E _i	(40.4281)	(41.2763)	(34.2084)	(31.9467)	(27.1405)
4	O _i	36	36	18	17	15
	E _i	(28.1042)	(28.7754)	(23.8481)	(22.2714)	(18.9208)

F = FRECUENCIAS
 O_i = FRECUENCIAS OBSERVADAS
 E_i = FRECUENCIAS ESPERADAS

$$\chi^2 = \sum \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i} = 11.4321$$

$$\text{Grados de libertad : } (r - 1)(c - 1) = (4 - 1)(5 - 1) = 12$$

$$(0.95) \chi^2_{(12)} = 21.026$$

$$(0.99) \chi^2_{(12)} = 26.217$$

11.4321 < $\chi^2_{(0.95)}$ < $\chi^2_{(0.99)}$ * * NO SE RECHAZA LA HIPOTESIS

B) H_0 ----- : El comportamiento de la característica a medir es igual para todos los tipos de piel.

Se aplicó en éste caso el método de inferencia no paramétrico: Análisis de Varianza con dos criterios de clasificación por rangos de Friedman.

Esta prueba considera una asignación de rangos cuyo fin es dar una mejor estructura a la información obtenida en los cuestionarios al repartir los valores de una forma más uniforme.

La estadística de Friedman está dada por :

$$X_r^2 = \frac{12}{nk(k+1)} \sum_{j=1}^k (R_j)^2 - 3n(k+1)$$

dónde :

n = número de renglones (bloques)

k = número de columnas

R_j = sumas de rangos dentro de cada columna (tratamiento)

La toma de decisión es :

Si el valor de X_r es mayor que el valor crítico estipulado en tablas a los niveles de confianza (α) 0.95 y 0.99 %, se rechaza la hipótesis :

$$X_r^2 \text{ obt} > (0.95) X^2_{(3)} > (0.99) X^2_{(3)} \text{ Se rechaza la hipótesis}$$

Las probabilidades para X_r^2 se encuentran tabulados para valores pequeños de n y k, pero si el número de bloques n y el de tratamientos k no es muy pequeño ($n \geq 10$ y $k \geq 4$), la estadística X_r^2 es en forma apropiada una variable aleatoria ji-cuadrada con k-1 grados de libertad.

La información recopilada aparece en el análisis adjunto.

**PRUEBA DE FRIEDAMAN
PARA LA CARACTERISTICA ABSORCION**

PARTICIPANTES	TIPOS DE PIEL							
	1		2		3		4	
	VALOR	RANGO	VALOR	RANGO	VALOR	RANGO	VALOR	RANGO
1	3	1.5	3	1.5	4	3.5	4	3.5
2	4	2.5	4	2.5	4	2.5	4	2.5
3	4	3	4	3	4	3	3	1
4	4	3.5	3	1.5	3	1.5	4	3.5
5	4	3.5	3	1.5	3	1.5	4	3.5
6	3	1	4	3	4	3	4	3
7	4	4	3	2	3	2	3	2
8	4	3	4	3	3	1	4	3
9	3	1.5	4	3.5	4	3.5	3	1.5
10	3	2	3	2	4	4	3	2

Tipo 1 : Pieles Maduras sanas

Tipo 2 : Pieles Maduras maltratadas

Tipo 3 : Pieles Maduras secas y delicadas

Tipo 4 : Pieles Jóvenes sanas

$$X_r^2 = \frac{12}{10(4)(4+1)} (2503.0) - 3(10)(4+1)$$

$$X_r^2 = 0.1800$$

$$(0.95) X_r^2 (3) = 7.815$$

$$(0.99) X_r^2 (3) = 11.345$$

$0.1800 < X_r^2 (0.95) < X_r^2 (0.99)$ • • NO SE RECHAZA LA HIPOTESIS

**PRUEBA DE FRIEDMAN
PARA LA CARACTERISTICA UNTUOSIDAD**

PARTICIPANTES	TIPOS DE PIEL							
	1		2		3		4	
	VALOR	RANGO	VALOR	RANGO	VALOR	RANGO	VALOR	RANGO
1	3	1.5	4	3.5	4	3.5	3	1.5
2	4	3	4	3	4	3	3	1
3	4	3.5	3	1.5	3	1.5	4	3.5
4	3	2	4	4	3	2	3	2
5	4	3	3	1	4	3	4	3
6	4	3	3	1	4	3	4	3
7	4	3	3	1	4	3	4	3
8	4	3	4	3	3	1	4	3
9	3	1.5	4	3.5	4	3.5	3	1.5
10	4	2.5	4	2.5	4	2.5	4	2.5

Tipo 1 : Piel Maduras sanas
 Tipo 2 : Piel Maduras maltratadas
 Tipo 3 : Piel Maduras secas y delicadas
 Tipo 4 : Piel Jóvenes sanas

$$Xr^2 = \frac{12}{(10)(4)(4+1)} (2504) - 3(10)(4+1)$$

$$Xr^2 = 0.2400$$

$$(0.95) Xr^2_{(3)} = 7.815$$

$$(0.99) Xr^2_{(3)} = 11.345$$

0.2400 < $Xr^2_{(0.95)}$ < $Xr^2_{(0.99)}$ • NO SE RECHAZA LA HIPOTESIS

PRUEBA DE FRIEDMAN
PARA LA CARACTERISTICA MEJORIA

PARTICIPANTES	TIPOS DE PIEL							
	1		2		3		4	
	VALOR	RANGO	VALOR	RANGO	VALOR	RANGO	VALOR	RANGO
1	4	3	4	3	4	3	2	1
2	4	3	4	3	4	3	2	1
3	3	2.5	3	2.5	4	4	2	1
4	3	3.5	2	2	3	3.5	1	1
5	3	3	2	1.5	4	4	2	1.5
6	3	2.5	3	2.5	4	4	2	1
7	4	3	4	3	4	3	2	1
8	3	3	3	3	3	3	2	1
9	3	2	4	3.5	4	3.5	1	1
10	2	1.5	4	3.5	4	3.5	2	1.5

Tipo 1 : Piel Maduras sanas
 Tipo 2 : Piel Maduras maltratadas
 Tipo 3 : Piel Maduras secas y delicadas
 Tipo 4 : Piel Jóvenes sanas

$$Xr^2 = \frac{12}{(10)(4)(4+1)} (2796.50) - 3(10)(4+1)$$

$$Xr^2 = 17.79$$

$$(0.95) \quad Xr^2_{(3)} = 7.815$$

$$(0.99) \quad Xr^2_{(3)} = 11.345$$

17.79 > $Xr^2_{(0.95)}$ > $Xr^2_{(0.99)}$ • • SE RECHAZA LA HIPOTESIS

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

PRUEBA DE FRIEDMAN
PARA LA CARACTERISTICA TIEMPO DE MEJORIA

PARTICIPANTES	TIPOS DE PIEL							
	1		2		3		4	
	VALOR	RANGO	VALOR	RANGO	VALOR	RANGO	VALOR	RANGO
1	3	2	4	3.5	4	3.5	2	1
2	3	2.5	4	4	3	2.5	2	1
3	2	1.5	4	3.5	4	3.5	2	1.5
4	2	2	3	3.5	3	3.5	1	1
5	2	1.5	4	3.5	4	3.5	2	1.5
6	3	3.5	2	1.5	3	3.5	2	1.5
7	3	2.5	3	2.5	4	4	1	1
8	3	2.5	4	4	3	2.5	2	1
9	3	3	3	3	3	3	1	1
10	2	1.5	4	3.5	4	3.5	2	1.5

Tipo 1 : Piel Maduras sanas

Tipo 2 : Piel Maduras maltratadas

Tipo 3 : Piel Maduras secas y delicadas

Tipo 4 : Piel Jóvenes sanas

$$Xr^2 = \frac{12}{(10)(4)(4+1)} (2795.50) - 3(10)(4+1)$$

$$Xr^2 = 17.73$$

$$(0.95) Xr^2 (3) = 7.815$$

$$(0.99) Xr^2 (3) = 11.345$$

$$17.73 > Xr^2_{(0.95)} > Xr^2_{(0.99)} \cdot \cdot \text{SE RECHAZA LA HIPOTESIS}$$

CUADRO RESUMEN DE LA PRUEBA DE FRIEDMAN

CARACTERISTICA	X_i^* OBTENIDA	$0.95 X_i$	$0.99 X_i^2$	CONCLUSION
		TABLAS		
ABSORCION	0.1800	7.815	11.345	NO SE RECHAZA H_0
UNTUOSIDAD	0.2400	7.815	11.345	NO SE RECHAZA H_0
MEJORIA	17.79	7.815	11.345	SE RECHAZA H_0
TIEMPO DE MEJORIA	17.73	7.815	11.345	SE RECHAZA H_0
INFLUENCIA DEL TIEMPO	15.39	7.815	11.345	SE RECHAZA H_0

H_0 : EL COMPORTAMIENTO DE LA CREMA ES IGUAL PARA TODOS LOS TIPOS DE PIEL.

Las hipótesis nulas que fueron rechazadas para cada una de las características, obligaron a que se estableciera entre qué tipos de piel existía diferencia, por lo que se formularon otras hipótesis que serían evaluadas con la prueba de rango múltiple de Duncan.

C) H_0 : Existe igualdad entre las parejas de tipos de pieles a comparar.

Como se señaló, ésta hipótesis fue analizada con la prueba de rango múltiple de Duncan, la cual realiza comparaciones múltiples basándose en el cuadrado medio del error y determinó el comportamiento de la crema en los diferentes tipos de piel.

El estadístico que realiza las comparaciones múltiples entre cada una de las medias es :

$$D = (Q) (SX)$$

donde:

Q = rango estudentizado menos significativo

$$SX = \sqrt{S / n}$$

S = cuadrado medio del error

n = número de repeticiones

La regla de decisión es :

Se rechaza la hipótesis nula cuando la diferencia absoluta entre las medias ($T_i - T_j$) es mayor que D al nivel de significancia 0.95 y 0.99, con lo cual se especifica que la diferencia entre las medias es significativa (*) o altamente significativa (**).

Se tuvieron 6 comparaciones por cada característica y siguiendo éste análisis se llegó a las siguientes discusiones:

Como las preguntas I y II no fueron rechazadas en la prueba de Friedman, las comparaciones múltiples de la prueba de Duncan se realizaron a partir de la pregunta III.

PREGUNTA III : MEJORIA

T₁ = Piel madura sana

T₂ = Piel madura maltratada

T₃ = Piel madura seca y delicada

T₄ = Piel joven sana

Promedios de los datos obtenidos :

T₁ = 3.20 T₂ = 3.30 T₃ = 3.80 T₄ = 1.80

Comparaciones múltiples entre la diferencia de las medias y el valor D al 0.95 y 0.99 % :

DIFERENCIAS	D	
	0.95	0.99
T ₃ Vs T ₄ = (3.8 - 1.8) = 2.00 *	> 0.5865	> 0.7757
T ₃ Vs T ₁ = (3.8 - 3.2) = 0.6000 *	> 0.5695	< 0.7549
T ₃ Vs T ₂ = (3.8 - 3.3) = 0.5000	< 0.5411	< 0.7227
T ₂ Vs T ₄ = (3.3 - 1.8) = 1.5000 *	> 0.5695	> 0.7549
T ₂ Vs T ₁ = (3.3 - 3.2) = 0.1000	< 0.5411	< 0.7227
T ₁ Vs T ₄ = (3.2 - 1.8) = 1.4000 *	> 0.5411	> 0.7227

DISCUSIONES:

Se encontró diferencias significativas entre las pieles jóvenes sanas con los tres tipos de pieles maduras; sin embargo, las pieles maduras entre sí no tuvieron diferencias significativas a excepción de la piel seca y delicada con respecto a la piel sana madura, donde se tuvo una diferencia significativa.

Lo anterior era de esperarse al considerar la característica mejoría, pues de acuerdo a las condiciones en las que se encuentre la piel, el efecto sería más notorio.

PREGUNTA IV : TIEMPO DE MEJORIA

T_1 = Piel madura sana

T_2 = Piel madura maltratada

T_3 = Piel madura seca y delicada

T_4 = Piel joven sana

Promedios de los datos obtenidos :

$T_1 = 2.60$ $T_2 = 3.50$ $T_3 = 3.50$ $T_4 = 1.70$

Comparaciones múltiples entre la diferencia de las medias y el valor de D al 0.95 y 0.99% :

DIFERENCIAS	D	
	0.95	0.99
T_3 Vs $T_4 = (3.5 - 1.7) = 1.80^{**}$ >	0.5537	> 0.7323
T_3 Vs $T_1 = (3.5 - 2.6) = 0.9000^{**}$ >	0.5376	> 0.7126
T_3 Vs $T_2 = (3.5 - 3.5) = 0$ <	0.5108	< 0.6823
T_2 Vs $T_4 = (3.5 - 1.7) = 1.80^{**}$ >	0.5376	> 0.7126
T_2 Vs $T_1 = (3.5 - 2.6) = 0.9000^{**}$ >	0.5108	> 0.6823
T_1 Vs $T_4 = (2.6 - 1.7) = 0.9000^{**}$ >	0.5108	> 0.6823

DISCUSIONES :

Nuevamente se presentó una diferencia altamente significativa entre las pieles jóvenes sanas y las maduras, lo que también era de esperarse, ya que los efectos del tratamiento se presentarían en corto o en largo plazo dependiendo de las condiciones en las que se encontraba la piel (grado de sequedad y deterioro de la piel con el envejecimiento). A su vez, se detectó diferencia altamente significativa entre las pieles maduras sanas con respecto a las pieles maduras maltratadas y las secas y delicadas, no así entre las pieles secas y delicadas y las maltratadas, lo que se atribuye a las razones anteriormente citadas.

PREGUNTA V : INFLUENCIA DEL TIEMPO

T_1 = Pieles sanas maduras

T_2 = Pieles maduras maltratadas

T_3 = Pieles secas y delicadas

T_4 = Pieles jóvenes sanas

Promedios de los datos obtenidos :

$T_1 = 2.80$ $T_2 = 2.30$ $T_3 = 2.90$ $T_4 = 1.50$

Comparaciones múltiples entre la diferencia de las medias y el valor D al 0.95 y 0.99 % :

DIFERENCIAS	D	
	0.95	0.99
T_3 Vs $T_4 = (2.9 - 1.5) = 1.40 * *$	$> .5915$	> 0.7823
T_3 Vs $T_2 = (2.9 - 2.3) = 0.6000 *$	$> .5743$	< 0.7613
T_3 Vs $T_1 = (2.9 - 2.8) = 0.1000$	< 0.5457	< 0.7289
T_1 Vs $T_4 = (2.8 - 1.5) = 1.3000 * *$	> 0.5743	> 0.7613
T_1 Vs $T_2 = (2.8 - 2.3) = 0.5000$	< 0.5457	< 0.7289
T_2 Vs $T_4 = (2.3 - 1.5) = 0.8000 * *$	> 0.5457	> 0.7289

DISCUSIONES

Existió de nueva cuenta una diferencia altamente significativa entre las pieles jóvenes sanas y las maduras, no así entre las pieles maduras, a excepción de la piel madura seca y delicada y la maltratada, donde se encontró una diferencia significativa

En general se observa una tendencia de las pieles maduras a mejorar con el tratamiento.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

El desarrollo de la crema emoliente y nutritiva a base de liposomas siguió una secuencia selectiva, de tal manera que al final se tuvo un producto con las características organolépticas, fisicoquímicas y de estabilidad deseadas para su uso y comercialización.

Una etapa decisiva fue la selección de los ingredientes que integran la formulación, pues ante todo se aseguró que existiera compatibilidad entre éstos y los liposomas para no alterar su estabilidad. La crema emoliente y nutritiva a base de liposomas tiene como fin proporcionarle a la piel madura y envejecida el contenido normal de nutrientes, y agua que requiere y que ha perdido con el paso del tiempo, aprovechando el poder de penetración de dichas vesículas dada la alta compatibilidad que manifiestan con las membranas celulares. Como resultado, se tiene que la piel se torna más suave, flexible, se restablece el funcionamiento normal de la piel tratada; además de que se mejora su aspecto estético al disminuir los efectos del envejecimiento ya que los liposomas, al penetrar, refuerzan la cohesión celular epidérmica y mejoran la calidad del cemento intercelular.

Se observa que la crema actúa en todos los tipos de piel estudiados en este experimento, sin embargo el comportamiento del producto no es igual en todos ellos.

Las características Absorción y Untuosidad (I y II respectivamente) se comportaron igual en los diferentes tipos de piel, lo cual era de esperarse, ya que las respuestas están en función y corresponden básicamente a la aceptación del producto como tal; no así en el resto de las características evaluadas, por lo que al determinar entre qué tipos de piel estuvo la diferencia, se encontró lo siguiente :

* Característica III Mejoría :

Se encontró una diferencia entre las pieles jóvenes sanas con respecto a los tres tipos de pieles maduras, lo que demuestra que el producto sí tuvo un efecto cosmético en éstas últimas.

Por su parte, existió solamente diferencia entre las pieles maduras secas y las delicadas con las pieles maduras sanas, lo que nos indica que el efecto cosmético entre las pieles maduras fue más evidente en la piel seca y delicada, donde los efectos del envejecimiento eran más agudos.

• Característica IV Tiempo de mejoría :

Las diferencias se presentaron entre la piel joven sana y las maduras, y aún entre éstas, por lo que los resultados fueron muy heterogéneos. Esto indica que los efectos se presentan en corto o largo plazo en función del grado de humectación y deterioro de la piel por el envejecimiento.

• Característica V Influencia del tiempo sobre la mejoría :

Nos indica que son las pieles maduras nuevamente las que tienen mayores resultados, confirmando así el efecto cosmético de la crema.

En estudio previo se observó que las pieles grasas, al poseer una secreción excesiva de lípidos, mismos que funcionan como una capa hidrofóbica que impide que el agua sea eliminada con facilidad, no toleraban el producto pues proporcionaba elementos que no le eran necesarios; por lo que se concluyó que la crema solamente era requerida y se recomendaba a aquellas pieles maduras con una deficiente capacidad de retención de agua y que presentan un aspecto deteriorado por los efectos del envejecimiento.

Aquellas personas que por alguna circunstancia, abandonaron momentáneamente el tratamiento, manifestaron que, en pocos días empezaron a observar efectos regresivos en su piel, es decir, que ésta tendía a adquirir su aspecto inicial, por lo que se concluye que el tratamiento deberá ser constante si se desea mantener su efecto cosmético.

Ninguna persona sufrió de dermatitis ni irritación alguna de la piel, por lo que el producto cosmético es seguro.

La crema no presenta efectos cosméticos evidentes y no es recomendable para personas con pieles de tipo graso, pues proporciona grasas que definitivamente no requieren.

B I B L I O G R A F I A

- (1) Artmann C. Roeding J. Ghyczy M. Pratzel H.G .Influencia de las Diferentes Preparaciones de Liposomas sobre la humedad de la piel. Perfumeria und Kosmetik, Vol 5 ; 324, (1990).
- (2) Balsam S M. Gershon SD. Rieger MM. Sagarin E.Strianes S.J. COSMETIC SCIENCE AND TECHNOLOGY. Wiley-Interscience, (1982).
- (3) Blank I H. Shappirio E B. The Water Content of the Stratum Corneum. J. Invest. Dermatol ; December (1981).
- (4) Blank I H.Factors which Influence the Water Content of the Skin.J. Invest. Dermatol ; June (1982).
- (5) Bohinski C Robert. BIOQUIMICA ; Ed. Adison - Wesley Iberoamericana ; 2ª edición ; México, (1987).
- (6) Canavos George C. PROBABILIDAD Y ESTADISTICA, APLICACIONES Y METODOS ; Ed Mc Graw-Hill ; México, (1989).
- (7) Cerimele D. Celleno L. Serry F. Physiological Changes in Ageing Skin. British Journal of Dermatology. Supplement 35 ; 13-20, (1990).
- (8) Frazier, C. N. ; Blank, H.I. ; A FORMULARY FOR EXTERNAL THERAPY OF THE SKIN ; Charles C. Thomas, Springfield, Ill, (1983)
- (9) Gaul L. Underwood G B. Relation of Dew Point and Barometric Pressure to Chapping of Normal Skin . J. Invest. Dermatol , July (1981).
- (10) Gennaro Alfonso R ; REMINGTON FARMACIA ; Tomos 1 y 2 ; 17ª edición Ed. Panamericana ; Buenos Aires, Argentina, (1987).
- (11) Gherdielly R. J. Invest. Derm .Vol 96; 582, (1991).

(12) Goldstein Samuel MD. The Biology of Ageing . The New England Journal of Medicine. Vol 285; 1120-1124, (1971).

(13) Handjani Vila et al. Int. J. Cosmet.Sci, 1, 303-304, (1979)

(14) Harry G Ralph. HARRY 'S COSMETOLOGY ; Leornard Hill Books an Intertext Publisher (1980).

(15) Helman José. FARMACOTECNIA TEORICA Y PRACTICA ; Tomo VII ; Ed. CECSA ; México (1984).

(16) Idson Bernard. Natural Moistures for Cosmetics . Drugs & Cosmetics Industry. December, (1984).

(17) Idson Bernard. Ibid Vol 102, 26, (1987).

(18) Idson Bernard PA.D. Dry Skin, Moisturizing and Emolliency. Cosmetics & Toiletries. July, Vol 107; 69 - 78, (1992).

(19) Jacobi O K. Amer. Cosm. Perf. (1978).

(20) Klugman A M. Cosmetics & Toiletries, 93, 4, 37, (1978).

(21) Lasic Danilo. Liposomes . American Scientist, January-February .Vol 8 ; 20-30, (1992).

(22) Lehninger L Albert. BIOQUIMICA, LAS BASES MOLECULARES DE LA ESTRUCTURA Y FUNCION CELULAR ; Ediciones Omega ; 2a edición ; Barcelona, España, (1987).

(23) Manual LIPOCHEM.

(24) Manual de ROCHE.

- (25) Mausner J. Cosmetics & toiletries. Vol 96 (5) 27 (1981).
- (26) Metje Silvia. Dr Bronke Doseldolf A. Liposomen in der Kosmetik ; Kosmetik Journal. Vol 7; 14-20, (1991).
- (27) Navarre Maison G .THE CHEMISTRY AND MANUFACTURE OF COSMETICS ; Volume III ; Second edition ; New, York, (1975).
- (28) P M Elfas.Composition, Properties and Preparation of Liposomas . Journal of Dermatology. January-February, Vol 20; 8-24, 32-36, 166-172, (1981).
- (29) Poucher W.A. PERFUMES, COSMETICS AND SOAPS ; Eight edition ; Modern Cosmetics ; Vol III, Chapman and Hall.
- (30) Scott Van T, Yu R.J . Arch Der 110 586 (1974).
- (31) SEDERMA LIPOSOMES.
- (32) Sonneborn Tracy M. THE ORIGIN, EVOLUTION, NATURE AND CAUSES OF AGEING ; A. Publication of American Institute of Biological Science ; Edited by John A. Behnke ; Ed. Biosciencia, New York, USA. 361-374, (1978).
- (33) Takahashi M. J.Soc. Cosm.Chem . Vol 36 ; 177, (1985).
- (34) Tortora Gerard J. Anagnostakos Nicholes P. PRINCIPIOS DE ANATOMIA Y FISILOGIA ; 3a. edición , editorial Harle, (1984).
- (35) USP XXI
- (36) Walpole Meyers. PROBABILIDAD Y ESTADISTICA, APLICACIONES Y METODOS; Graw-Hill; 4a edición ; México, D.F, (1992)
- (37) Wayne W Daniel. BIOESTADISTICA ; Ed LIMUSA ; 3a edición ; México, D.F, (1989).