



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**NANOTECNOLOGÍA Y POLÍMEROS EN PRODUCTOS  
DEL CUIDADO PERSONAL**

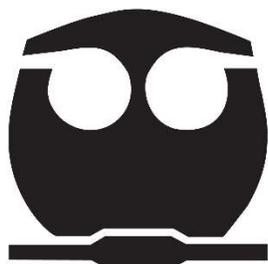
**TRABAJO MONOGRÁFICO DE  
ACTUALIZACIÓN**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO**

**P R E S E N T A:**

**ALONDRA LIZETH ROCHA SOTO**



**CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX. 2023**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE: Prof: MÉNDEZ STIVALET JOSÉ MANUEL**  
**VOCAL: Prof: ROMERO ÁVILA MARGARITA**  
**SECRETARIO: Prof: ZELADA GUILLÉN GUSTAVO ADOLFO**  
**1er. SUPLENTE: Prof: DEL RÍO PORTILLA JOSÉ FEDERICO**  
**2° SUPLENTE: Prof: ESCÁRCEGA BOBADILLA MARTHA VERÓNICA**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO 207, DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA,  
EDIFICIO B**

**ASESOR DEL TEMA:**

---

**Dr. GUSTAVO ADOLFO ZELADA GUILLÉN**

**SUSTENTANTE:**

---

**ROCHA SOTO ALONDRA LIZETH**

## CONTENIDO

GLOSARIO .....	1
AGRADECIMIENTOS .....	4
DEDICATORIAS .....	¡Error! Marcador no definido.
OBJETIVOS .....	5
ANTECEDENTES .....	6
CAPÍTULO 1 .....	8
1.1 TENDENCIA DE LOS PRODUCTOS DEL CUIDADO PERSONAL .....	9
CAPÍTULO 2 .....	11
2.1 PRODUCTOS COSMÉTICOS.....	12
2.3 NANOMATERIALES EN FILTROS SOLARES.....	13
2.3.1 Nanopartículas de dióxido de titanio (NP TiO <sub>2</sub> ).....	13
2.3.2 Nanopartículas de óxido de zinc (NP ZnO).....	17
2.3.3 Nanocristales de filtros orgánicos.....	20
2.3.3.1 Nanocristales de celulosa (CNC).....	22
2.3.3.2 Nanocristales de metilen bis-benzotriazolil tetrametilbutilfenol (MBBT).....	27
2.3.3.3 Nanocristales de tris-bifenil triazina (TBPT).....	31
2.3.4 Nanodiamantes (ND) .....	37
2.4 NANOMATERIALES HIDRATANTES Y ANTIENVEJECIMIENTO .....	43
2.4.1 Liposomas hechos de fosfolípidos insaturados y saturados. ....	43
2.4.2 Nanopartículas de lípidos sólidos (SLN).....	53
2.4.3 Portadores de lípidos nanoestructurados (NLC).....	62
2.4.4 Fullerenos.....	78
CONCLUSIONES.....	90
REFERENCIAS .....	91

## GLOSARIO

DPPH	2,2-difenil-1-piridilhidrazinilo
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio
8-OHdG	8-hidroxi-2'-desoxiguanosina, marcador de daño del ADN
EO	Aceite esencial de <i>Eugenia caryophyllata</i>
SA	Ácido esteárico
ATP	Adenosín Trifosfato
FDA	Administración de Drogas y Alimentos
IARC	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
BALF	Análisis del lavado broncoalveolar
BEMT	Anisotriazina
AVO	Avobenzona / 4-terc-butil-4'-metoxidibenzoilmetano
CBB	Azul brillante de Coomassie
MB	Azul de metileno
MTT	Bromuro de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolio
PBS	Buffer fosfato salino
DCS	Calorimetría diferencial de barrido
EPI-CM $\beta$ Cd	Carboximetilado- $\beta$ -Cd-epiclorhidrina
LC	Células de Langerhans
HaCaT	Células de queratinocitos humanos
C <sub>6</sub>	Células gliales de rata
FCM	Citometría de flujo
TTMHP	Citrato de tris(tetrametilhidroxipiperidinol)
SCCS	Comité Científico de Seguridad del Consumidor
MBC	Concentración bactericida mínima
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
Dex	Dextrano
DCFH-DA	Diacetato de dicloro-dihidro-fluoresceína
DBT	Dietilhexil butamido triazona

XRD	Difracción de rayos X
LD	Difracción láser
SCE	Epidermis del estrato córneo
ROS	Especies reactivas de oxígeno
DLS	Espectroscopia de correlación de fotones
PCS	Espectroscopia de correlación de fotones
FTIR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier
FAME	Éster metílico de ácidos grasos
HET-CAM	Estudio de la membrana corioalantoica del huevo de gallina
EHMCR	Etilhexil metoxicrileno
EHT	Etilhexil triazona
SPF	Factor de protección solar
UVA-PF	Factor de Protección UVA
AG	Glicirricinato de amonio
PdI	Índice de polidispersidad
Keto	Ketoprofeno
UL	Liposomas ultradeformables
P7	Manteca de karité
MF	Melamina-formaldehído
OMC	Metoxicinamato de octilo
MP	Microscopía de excitación de dos fotones
AFM	Microscopía de Fuerza Atómica
FLIM	Microscopía de Tiempo de vida de Imagen Fluorescente
Cryo-TEM	Microscopía de transmisión de electrones criogénicos
SEM	Microscopía electrónica de barrido
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
MLCF	Microscopía Láser Confocal
GMS	Monoestearato de glicerilo
GMS	Monoestearato de glicerilo
CNC	Nanocristales de celulosa

MBBT	Nanocristales de metilen bis-benzotriazolil tetrametilbutilfenol
TBPT	Nanocristales de tris-bifenil triazina
CNF	Nanofibra de celulosa
NP TiO <sub>2</sub>	Nanopartículas de dióxido de titanio
SLN	Nanopartículas de lípidos sólidos
NP ZnO	Nanopartículas de óxido de zinc
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NMP	N-metilpirrolidona
ODO	Octoato de glicerilo
RP	Palmitato de retinilo
PEG	Polietilenglicol
NLC	Portadores de lípidos nanoestructurados
P	Precirol
MIC	Prueba de concentración mínima inhibitoria
OTC	Tomografía de coherencia óptica
GIT	Tracto gastrointestinal
Δ E.I.	Variación del índice de eritema
PI	Yoduro de propidio
EPI-βCd	β-Cd-epiclorhidrina

## **AGRADECIMIENTOS**

A los programas DGAPA-PAPIIT de la UNAM (No. IN100720) y Ciencia Básica SEP-CONACYT (No. 283975).

## **OBJETIVOS**

1. Llevar a cabo una investigación bibliográfica extensiva sobre el rol histórico y moderno de los nanomateriales y los polímeros en los productos del cuidado personal.
2. Presentar las nuevas tendencias en el uso de los nanomateriales y los polímeros en los productos del cuidado personal.
3. Identificar los efectos que han tenido los nanomateriales con los polímeros como materia prima en los productos y definir si es seguro para el consumidor el uso de la nanotecnología en los productos del cuidado personal.
4. Identificar los métodos preparativos y de caracterización más comunes en los nanomateriales y polímeros empleados dentro de los productos del cuidado personal.

## ANTECEDENTES

El cuidado personal es uno de los aspectos fundamentales en un estilo de vida saludable, se encuentra relacionado con una buena alimentación, ejercicio físico y la salud mental. Al tener en cuenta estos aspectos se llega a prevenir la aparición de enfermedades, además de mantener independencia a medida que se envejece; por ello, se han fabricado productos que ayuden a facilitar y mejorar el cuidado personal, al rejuvenecer la apariencia de la piel, dar firmeza al cabello, disminuir las imperfecciones, proteger de los rayos solares, además de ser productos para la higiene. <sup>[1]</sup>

Un producto cosmético es una sustancia destinada a aplicarse en las superficies externas del cuerpo humano como la epidermis, cabello, uñas, labios, en los dientes y membranas mucosas de la boca con la finalidad de limpiarlos, perfumarlos, protegerlos, modificar su apariencia, mantenerlos en buen estado y/o corregir los olores que emanan de ellos. Sin embargo, los productos que se utilizan en la epidermis se denominan específicamente productos para el cuidado de la piel y su efectividad depende de los ingredientes y la tecnología utilizada para prepararlos. <sup>[2]</sup> Al tener la facilidad de emplear una gran serie de componentes como ingredientes dentro de dichos productos, se han considerado nuevos materiales para mejorar su eficacia.

Actualmente se han utilizado los polímeros dado que se busca aprovechar las propiedades de estos para impartir beneficios únicos a las formulaciones, son clasificados por su origen o su utilidad, incluso dentro de una determinada clase de polímeros, las variaciones estructurales también dictan el tipo de propiedades que se obtienen, características como el grado de polimerización, la cantidad de ramificación y la proporción de unidades dentro de un copolímero pueden tener impacto en los atributos de desempeño. Las aplicaciones de los polímeros en los productos del cuidado de la piel se presentaron como formadores de película, emulsionantes, espesantes, modificadores, barreras protectoras y potenciadores estéticos. <sup>[3]</sup>

Así mismo, otro de los componentes a estudiar son los nanomateriales, los cuales son materiales naturales y/o sintéticos que contienen partículas con una o más dimensiones en el rango de nanoescala. Los nanomateriales agregados a los productos ofrecieron ventajas en su uso como el mejoramiento en la textura, la estética, su protección UV, una mayor resistencia a las manchas y un aumento en su vida útil brindando beneficios tanto para la salud como al medio ambiente.

Para manejar de forma adecuada los nanomateriales, es necesario trabajar con la nanotecnología, dado que es una técnica multidisciplinaria cuyo objetivo es entender, caracterizar, manipular y explotar las características físicas de la materia a la nanoescala para generar innovaciones tecnológicas teniendo en consideración su impacto social y ambiental. <sup>[4]</sup>

Por ello, es necesario un estudio de investigación de las posibles implicaciones del manejo de los nanomateriales con polímeros en los productos del cuidado personal, a fin de mejorar sus capacidades e identificar los métodos de preparación, además de determinar si es seguro el uso de dichos componentes para el consumidor.

## **CAPÍTULO 1**

## 1.1 TENDENCIA DE LOS PRODUCTOS DEL CUIDADO PERSONAL.

La innovación en los productos va de la mano de una economía circular con un desarrollo sostenible, las Naciones Unidas (Comisión Brundtland) lo definió como una prosperidad económica que "*satisface las necesidades del presente sin comprometer la capacidad de las generaciones futuras para satisfacer sus propias necesidades*". [5] Teniendo como objetivo una economía competitiva con un desempeño de recursos y energía eficiente con un mínimo de desechos y una reducción de la contaminación por el efecto invernadero, de modo que los productos de hoy sean también las materias primas del mañana. [6]

En este sentido, la nanotecnología se abre paso ante la aplicación de los principios de la química verde, mediante la fabricación de nanomateriales menos peligrosos o con procesos de síntesis que utilizan materiales de partida, reactivos y disolventes más seguros y renovables. Al hablar de una seguridad en los nanomateriales implica que los materiales no son peligrosos tanto para los seres humanos como el medio ambiente, la producción obtiene como objetivo nuevas rutas eficientes de reciclaje y eliminación.

En el mercado global, los productos del cuidado personal y belleza mostraron una tendencia de crecimiento con ventas de \$483 mil millones en 2020 a \$511 mil millones en 2021, con una predicción que supere los \$716 mil millones para 2025, a su vez, los países que ofrecen mayores oportunidades a las empresa nacionales e internacionales para comercializar productos de mayor calidad se encontró principalmente en la región Asia-Pacífico con 46 % y América del Norte con 24 %. [7, 8]

Así mismo, dentro de los productos del cuidado personal, los productos del cuidado de la piel representaron el 40% del mercado, seguido del cuidado del cabello y los cosméticos en 2019. Marcando una tendencia de crecimiento en dichos productos, con un potencial para las subcategorías de protección solar y los productos antienvjecimiento para el cuidado de la piel, por lo tanto, en la industria se ve la necesidad de mejorar los niveles de calidad de los productos que complazcan las nuevas demandas de los consumidores. [9]

En la actualidad, la pandemia de COVID-19 y los eventos globales asociados, han marcado nuevas tendencias de mercado, puesto que la demanda se ha dirigido a productos limpios, naturales, seguros y transparentes. <sup>[10]</sup>

## **CAPÍTULO 2**

## 2.1 PRODUCTOS COSMÉTICOS

Un producto cosmético está compuesto por principios activos que le dan la función principal al producto que le atribuyen una acción específica para un efecto determinado, el excipiente o vehículo le da la estructura adecuada al producto para transferir el ingrediente activo al sitio idóneo de aplicación y asegura que permanezca el tiempo necesario para surtir efecto, los aditivos son sustancias que evitan el deterioro del producto dándole una mayor conservación, agregan color y mejora el aroma, los correctores estabilizan la fórmula cosmética, mejoran las propiedades, el aspecto y presentación del cosmético. [7]

Por otra parte, mediante la aplicación de nanopartículas se busca mejorar las formulaciones cosméticas referente a la penetración en la piel, la estabilidad y la liberación eficaz de los ingredientes activos, el aumento de la dispersabilidad del producto y la calidad de la textura, contribuyendo a obtener efectos mejorados.

## 2.3 NANOMATERIALES EN FILTROS SOLARES

Existen diversos nanomateriales como principios activos en cosmética, los utilizados en los filtros UV tienen la característica particular de ofrecer una aplicación suave y una apariencia clara con una importante protección UV de amplio espectro. <sup>[10]</sup>

### 2.3.1 Nanopartículas de dióxido de titanio (NP TiO<sub>2</sub>)

Las nanopartículas de dióxido de titanio (NP TiO<sub>2</sub>) presentan tres tipos de estructuras cristalinas rutilo, anatasa y más raramente, brookita, es un aditivo pigmentado blanco de alta opacidad con propiedades de recubrimiento. Las nanopartículas utilizadas en cosméticos son de rutilo y anatasa, sin embargo, la anatasa es más químicamente reactiva y es su forma más tóxica. Por tanto, el rutilo es la opción preferida para la síntesis de filtros solares, aun así, en los estudios se presentó solo el uso de anatasa en los productos o con una porción de ambos (Figura 1). <sup>[11, 12, 13]</sup>

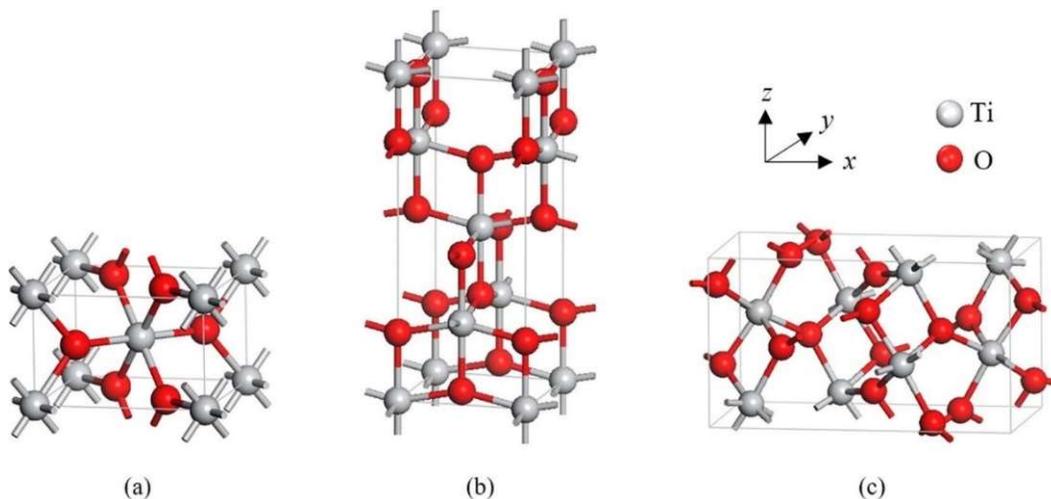


Figura 1. La celda unitaria primitiva de TiO<sub>2</sub> (a) rutilo, (b) anatasa y (c) brookita. Reimpreso, *Results in Physics*, **6**, Samat MH A. *et al.* Hubbard U calculations on optical properties of 3D transition metal oxide TiO<sub>2</sub>, pp. 891-896, Copyright (2016). Con permiso de Elsevier, <https://doi.org/10.1016/j.rinp.2016.11.006>. <sup>[13]</sup>

A su vez, las NP TiO<sub>2</sub> son utilizadas en diferentes áreas como la medicina, agricultura, industria alimentaria y cosmética, es preferido por su efecto antibacteriano de amplio espectro que prolonga la vida útil de los productos

alimenticios. <sup>[11]</sup> En filtros solares, constituyen el 10 % en masa y tienen mayor capacidad protectora que las partículas micrométricas, al ser utilizadas en la vida diaria, es importante aclarar su impacto con regulaciones en futuras investigaciones. <sup>[14]</sup>

En las NP TiO<sub>2</sub> por el tamaño de las partículas, la estructura cristalina y el recubrimiento, se ve afectada la carga superficial, la aglomeración, la sedimentación, siendo estas características clave en los efectos tóxicos para las células humanas. Los datos disponibles sobre la toxicidad de las NP TiO<sub>2</sub> para los seres humanos es limitada, por lo que el riesgo potencial aún está en duda. Por esa razón, se utilizó numerosos modelos toxicológicos, como células humanas, de animales y de organismos acuáticos. <sup>[12]</sup>

Una mejora en las investigaciones es el implemento de técnicas de modelado molecular computacional, aportando mayor conocimiento en las propiedades de las moléculas utilizadas contra los efectos perjudiciales de los rayos solares, contribuyendo al desarrollo de protectores solares más efectivos. Walters C. *et al.* presentaron el uso del modelado molecular como parte de su investigación, utilizando el algoritmo ZINDO de moléculas CAChe™, software que ayuda a predecir los espectros ultravioletas de los compuestos elegidos con picos en la región UV, este nuevo giro permitió explorar compuestos que tienen el potencial de funcionar en los protectores solares antes de realizarlo experimentalmente, ayudando a minimizar costos y tiempo en investigación. <sup>[15]</sup>

Por otro lado, en ausencia de agentes estabilizantes, las NP TiO<sub>2</sub> tienden a aglomerarse e interactuar con los medios circundantes, para evitar la aglomeración de las nanopartículas, se recomendó el recubrimiento con polietilenglicol (PEG) debido a las propiedades dispersivas del polímero sobre el TiO<sub>2</sub>. Lyndon N. *et al.* presentó una evaluación de la distribución espacial de las interacciones de NP TiO<sub>2</sub> con sustratos de PEG/H<sub>2</sub>O en función de las energías de interacción obtenidas mediante simulaciones Monte Carlo. <sup>[14]</sup>

Este estudio lo realizaron con el fin de brindar una mejor comprensión de los fenómenos superficiales, algo que no se deduce fácilmente experimentalmente, obteniendo como resultado que las moléculas de agua podrían adsorberse en

TiO<sub>2</sub>, en presencia de PEG, se mejoró en gran medida las propiedades de adsorción de NP TiO<sub>2</sub> por el recubrimiento que dio mayor estabilidad, además de ser clave para suprimir los efectos adversos en la superficie que eventualmente producirá filtros solares más seguros, sin embargo, también se demostró que los recubrimientos de PEG no tienen un espesor uniforme.

En la actualidad, está en polémica si el uso de las NP TiO<sub>2</sub> son tóxicas para el ser humano, MacNicol A. *et al.* investigó la absorción y biodistribución de NP TiO<sub>2</sub> como de mayor tamaño utilizando un modelo *in vitro* de epitelio intestinal e *in vivo* en ratas, en los resultados del estudio *in vivo* la administración oral de 5 mg/kg de peso corporal de NP TiO<sub>2</sub> o de mayor tamaño no condujo a ninguna translocación significativa de TiO<sub>2</sub> en sangre, orina o en varios órganos de ratas en cualquiera de los intervalos de tiempo estudiados (96 h en total) después de la administración. La evidencia de los estudios *in vivo* e *in vitro* no respaldó que la ingestión oral de nanopartículas o partículas más grandes de TiO<sub>2</sub> produjera una exposición interna significativa en el consumidor. <sup>[16]</sup>

Para asimilar las nanopartículas en el cuerpo humano, se debe pasar por las regiones del tracto gastrointestinal (GIT), sin embargo, esto puede alterar sus propiedades y cambiar su toxicidad potencial. El grado de absorción depende de factores como el tipo de partículas, el tamaño, la dispersabilidad y la carga de partícula, se presentaron una serie de variables que causan demasiadas incógnitas al momento de querer regularizar el uso de NP TiO<sub>2</sub>. <sup>[11]</sup> El mecanismo detrás de la toxicidad de las NP TiO<sub>2</sub> se presenta teóricamente por el estrés oxidativo, sin embargo, se necesita mayor investigación para encontrar la causa y hasta cierto punto evitarla. Se ha sugerido que las nanopartículas pueden ser más tóxicas que las partículas más grandes de la misma composición química debido a su mayor reactividad química, su área de superficie y su facilidad en la penetración celular. <sup>[16, 17]</sup>

De manera experimental los efectos perjudiciales se muestran especialmente cuando se tiene una mayor exposición a través de la inhalación y la penetración de la piel. Dado que, el suministro regular de NP TiO<sub>2</sub> en pequeñas dosis puede afectar la mucosa intestinal, el cerebro, el corazón y otros órganos internos, lo que

puede conducir a un mayor riesgo de desarrollar diversas enfermedades, tumores o acelerar procesos cancerígenos existentes. [11, 12]

Sayes C. *et al.* realizó la caracterización de la toxicidad de nanomateriales en condiciones ambientales sobre cultivos celulares, donde a concentraciones altas (100 µg/mL) se presentó citotoxicidad e inflamación, estos efectos fueron aumentando con el tiempo de exposición, sin embargo, no se presentó variación en los efectos de toxicidad por el cambio de tamaño de las nanopartículas, pero si fue afectada significativamente cuando se cambió la composición de TiO<sub>2</sub>, dado que la anatasa fue 100 veces más tóxica que una muestra equivalente de rutilo, además de ser más efectiva en generar especies reactivas de oxígeno (ROS). Estos datos sugirieron que las muestras de NP TiO<sub>2</sub> optimizadas para la producción de ROS en fotocatalisis también tienen más probabilidades de generar ROS dañinas en cultivos celulares. [18]

Existen otros estudios donde se confirma que las NP TiO<sub>2</sub> son la razón principal de enfermedades crónicas en los seres humanos como Athinarayanan J. *et al.* informó “...estas partículas pueden causar daño a la membrana mitocondrial celular que conduce a otras enfermedades crónicas como la diabetes y el cáncer”, [17] mientras que la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) clasificó al TiO<sub>2</sub> en forma de nanopartículas como “...un posible carcinógeno para los seres humanos”. [17, 19]

A su vez, otra problemática es la presencia de NP TiO<sub>2</sub> no descrita en los diferentes productos comerciales, por ello se plantea en un futuro investigar nuevas técnicas de caracterización que ayuden a evaluar la presencia de las nanopartículas antes de ser aprobada la comercialización de los productos, con el fin de regularizarlos y proteger su sobreexposición. [15] La realidad es que el uso de nanopartículas está aumentando por los diversos beneficios que dan a los productos, lo que se necesita es una regulación en los requisitos de etiquetado, donde los lineamientos estipulen la concentración permitida en los productos que mantenga a salvo a los consumidores y de un margen de maniobra a los investigadores, por lo tanto, la utilización de estas nanopartículas requiere mayor cuidado, especialmente en alimentos y cosméticos.

### 2.3.2 Nanopartículas de óxido de zinc (NP ZnO).

El óxido de zinc es encontrado de manera natural en el mineral zincita, al ser cristalizado adopta las estructuras: blenda de zinc y wurtzita, siendo la última la más estable. Es una sustancia blanquecina que actúa como catalizador en reacciones de alquilación, oxidación, hidrogenación y desulfuración. Se han empleado en cosméticos con mezclas de polímeros y fotocatalizadores debido a sus excelentes propiedades de protección de los rayos UV. [20] El Informe de Evaluación de Riesgos de la Unión Europea, autorizó el uso de ZnO en materiales compuestos de caucho, productos de vidrio y cerámica, en cosméticos, se utiliza en filtros UV y colorantes aplicados en la piel. [21]

A Iqra R. *et al.* les interesó mejorar el rendimiento de protección de rayos UV y reducir la penetración de las nanopartículas en la piel, por ello propusieron la síntesis de un híbrido-polímero con las NP ZnO, sin embargo, la problemática fue el aumento de tamaño, la agregación y la inestabilidad química del material que al final limitó el rendimiento, en dicha propuesta se probó diferentes polímeros, dando mejores resultados la nanofibra de celulosa (CNF), siendo este un biomaterial natural, hidrofílico y abundante. Al final propuso el híbrido ZnO-CNF sintetizado mediante una reacción sol-gel simple, donde se mejoró significativamente las propiedades de protección UV, la estabilidad de la dispersión, así como el efecto blanqueador y la actividad fotocatalítica reducida. Las partículas de ZnO en el híbrido ZnO-CNF se dispersó uniformemente. [22]

De modo que se han evaluado diferentes métodos de síntesis de NP ZnO utilizados en protectores solares con la finalidad de evaluar sus propiedades, descubrieron que aun si son obtenidos por diferentes métodos, estas estructuras son muy similares y la mayoría de sus propiedades como la distribución del tamaño y la estructura cristalina coinciden entre sí, aun con las partículas más grandes, sin embargo, se ha demostrado que las NP ZnO tienen una tasa de disolución más alta que el ZnO a granel.

Por otro lado, desarrollar métodos analíticos para caracterizar los nanomateriales en los productos se ha vuelto fundamental, Pei-Jia *et al.* analizó seis protectores solares comerciales etiquetados con presencia de nanopartículas mediante

microscopía confocal de barrido láser, microscopía de fuerza atómica, difracción de rayos X (XRD) y microscopía electrónica de transmisión (TEM). Los resultados mostraron que la microscopía confocal de barrido láser evaluó los agregados y las dispersiones de partículas primarias, pero no pudo dimensionar las nanopartículas debido a la resolución limitada de difracción de la microscopía óptica, en las mediciones de microscopía de fuerza atómica no se proporciona su composición elemental, en XRD se proporcionó información sobre el tamaño de las partículas y los cristales sin un tratamiento previo con protector solar. Al utilizar el método TEM, lo combino con la espectroscopia de rayos X de energía dispersiva, proporcionando información sobre el tamaño de las partículas y el análisis de composición, sin embargo, se debe tomar en cuenta los limitantes de los métodos, en TEM se observó las nanopartículas en la matriz, pero las muestras necesitan estar en dilución antes de la observación, esta condición de dilución puede alterar las nanopartículas y no analizar el estado de agregación/aglomeración en los productos finales, por lo tanto, la combinación de XRD y TEM fue adecuada para analizar NP ZnO en filtros solares comerciales. [23]

El uso frecuente de nanopartículas ha dado preocupación por su seguridad al utilizarlos, principalmente en cosméticos y protectores solares, dado que, para afectar a las células, se necesita penetrar las capas epidérmicas más externas de la piel. Las NP ZnO en protección solar se han observado esporádicamente en bajas concentraciones, en capas viables de la piel y especialmente en el caso de exposiciones prolongadas. O'Keefe S. J. *et al.* presentó un estudio *in vivo* en humanos, donde se indicó que al menos algo de Zn, derivado tanto de NP ZnO como a granel se puede encontrar sistémicamente después de la aplicación tópica de protector solar. Esto se verificó al realizar el estudio con voluntarios humanos, donde después de una exposición de 2 h a un filtro solar que contenía NP ZnO, se encontró nanopartículas en las capas más externas de la piel de los voluntarios (por estrato córneo). Incluso en las porciones más profundas de esa capa, la concentración de zinc no era más alta que la que normalmente se encuentra en el cuerpo. El aumento de la exposición, mediante el uso del protector solar durante

48 h, o la eliminación de algunos corneocitos de la piel antes de la aplicación, dio resultados negativos. [24]

Otra prueba fue de Gulson B. *et al.* con voluntarios utilizando protector solar dos veces al día durante cinco días en la playa, el producto que usaron también contenía nitrato de isopropilo que mejora la penetración en la piel, después de usar el protector solar con NP ZnO, las muestras de sangre y orina se analizaron para ver si la composición isotópica de zinc en sus cuerpos estaba alterada. Hubo alguna evidencia de absorción de zinc soluble en la prueba de la playa, pero las cantidades fueron muy pequeñas, dado que la ingesta dietética diaria recomendada de zinc en la literatura es de 8 mg para mujeres y 11 mg para hombres, las cantidades absorbidas del protector solar fueron entre 100 y 1000 veces menores que esto, sin embargo, las mujeres absorbieron un poco más de zinc que los hombres. [25]

En respuesta a la poca, pero posible penetración en la piel por tiempo prolongado, O'Keefe S. J. *et al.* evaluó el peligro potencial en dichas aplicaciones comparando directamente los perfiles de respuesta citotóxica e inmunitaria de las NP ZnO con partículas de ZnO a granel y cinco filtros UV orgánicos convencionales. Su comparación con los filtros orgánicos se consideró acertada dado que son la alternativa viable para los consumidores, sin embargo, en el estudio se demostró que existe una penetración dérmica muy limitada de las nanopartículas en la piel humana en comparación con los filtros UV orgánicos. Además, se presentó el caso hipotético donde la limitante de la piel no ocurre y logra penetrar las capas de piel entrando en contacto con las células inmunitarias y sus alternativas químicas orgánicas, con o sin exposición a los rayos UVA, dando como resultado que las NP ZnO son más solubles en condiciones fisiológicas y menos biopersistentes, combinadas con los efectos inmunomoduladores del zinc, es menos probable que causen inflamación crónica. [24]

En este sentido, la penetración transdérmica del zinc en los filtros UV es al menos un orden de magnitud menor que la de los filtros UV orgánicos, sus perfiles de respuesta a la dosis de bioactividad son similares en las células inmunitarias humanas lo cual indicó que las nanopartículas tienen un menor riesgo potencial de

provocar efectos *in vivo*. Dicho esto, la liberación de las células inmunitarias de la mayoría de las citoquinas investigadas se mantuvo sin cambios después de la exposición a ZnO o compuestos orgánicos.

Por otro lado, diferentes organizaciones clasificaron el uso de NP ZnO, la FDA dicto "... es *generalmente reconocido como seguro*" cuando se usa como filtro UV de acuerdo con las directivas de cosméticos. En la Agencia de Protección Ambiental de EE. UU. y la Comunidad Europea (dentro de la ley de Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de Sustancias Químicas) se siguen tomando medidas para evaluar los riesgos, sin embargo, todavía no existen normas oficiales de seguridad para las nanopartículas en particular. [21, 26, 27, 28]

El mejoramiento de los protectores solares con base en NP ZnO aun requiere el desarrollo en investigaciones para minimizar o eliminar los riesgos y optimizar la eficacia del producto, presentando nuevas técnicas analíticas que controlen el tamaño de las nanopartículas en su síntesis, desarrollando estudios en casos con exposiciones subcrónicos como quemaduras por el sol en la piel, con el fin de dar seguridad a los consumidores. [21, 23] Se debe tener en cuenta que los estudios presentados hasta ahora sobre las NP ZnO no son un referente sobre el comportamiento de todas las nanopartículas del mismo material, no se espera que comporten de la misma manera dado que el entorno, la aplicación y hasta las dosis pueden cambiar, por lo cual en otros casos se necesitara una nueva evaluación de toxicidad para la seguridad del consumidor.

### 2.3.3 Nanocristales de filtros orgánicos.

Los nanocristales son partículas de fármaco puro estabilizadas por tensioactivos sin ningún polímero circundante o matriz lipídica, utilizados para aumentar la solubilidad del ingrediente activo por su biodisponibilidad y penetración a mayores capas de piel, son procesados mediante diversas técnicas como molienda de medios, homogeneización, evaporación de solventes y microfluidización. La nanocristalización es una solución segura porque la formulación final contiene solo el ingrediente activo puro y su estabilizador, que es biodegradable y normalmente aceptado por la piel. [29, 30]

Varias moléculas naturales potentes y filtros orgánicos sufren la limitación de ser poco solubles en agua, dado que la cantidad de fase oleosa es generalmente limitada y en algunos filtros son poco miscibles en aceites siendo su uso no aprovechado, sin embargo, al emplear nanocristales producen una mejora significativa en la solubilidad de los compuestos aumentando el rendimiento de aplicación.<sup>[30]</sup>

Es una tecnología factible industrialmente de rápido crecimiento, donde los activos cosméticos como los flavonoides (antioxidantes), la luteína, el betacaroteno, la coenzima Q10 entre otros, se producen con éxito como nanocristales con características mejoradas.<sup>[29]</sup>

En su producción se emplean técnicas con las tecnologías ascendentes, descendentes y combinadas. Las ascendentes utilizan la cristalización de fármacos o métodos de precipitación controlada para producir nanocristales, mientras que las descendentes reducen las partículas de ingredientes activos de mayor tamaño en partículas más pequeñas por fricción mecánica (molienda de perlas u homogeneización a alta presión), las tecnologías combinadas, como su nombre lo indica, combinan un paso de pretratamiento con un paso de reducción.<sup>[31]</sup> En 2001 surgió la segunda generación de nanocristales, denominados SmartCrystals, con una estabilidad física mejorada y partículas menores de 100 nm. Su ventaja se ve en productos dérmicos con ingredientes activos o excipientes de electrolitos y su fácil producción a gran escala.<sup>[32]</sup>

En 2006 se patentó los nanocristales para uso en formulaciones cosméticas tópicas y su método de producción, en 2007 se presentó los primeros productos cosméticos con nanocristales al mercado por la marca Juvena en Suiza, dicha patente indica la aplicación de una nanosuspensión con un 5 % de rutina como nanocristales no disueltos en la piel con una solución al 5 % de Alpha-G-Rutin PS soluble en agua respecto a la fotoprotección de la piel (basada en la propiedad antioxidante de rutina). En la cual, tiene una concentración 500 veces menor de rutina disuelta en la fase acuosa de la suspensión de nanocristales, sin embargo, es 25 % más eficaz en la fotoprotección. Por lo tanto, la concentración de activos

formulados con nanocristales en la piel fue mayor en comparación con el uso de un derivado soluble en agua o del activo a granel. <sup>[33]</sup>

A pesar de varios estudios que demuestran claras ventajas en la penetración de agentes activos con poca concentración, la falta de aplicación de nanocristales en los filtros solares se debe a que generalmente no alcanzan las etapas de ensayo clínico necesarias para ingresar al mercado debido al alto costo de los estudios de toxicidad, por ello, la falta de información sobre su toxicidad y citotoxicidad son una limitante en su uso. <sup>[31]</sup>

En la actualidad, los estudios en las aplicaciones de los nanocristales demostraron propiedades únicas en comparación con los protectores solares convencionales con un gran potencial en el desarrollo futuro de nuevos productos, pero debido a las incertidumbres sobre sus efectos secundarios en los seres humanos junto con el medio ambiente, se presenta la necesidad de mayores investigaciones para la innovación continua.

En los denominados nanocristales, se encuentran diferentes tipos dependiendo de la materia prima utilizada, se presenta el análisis de los nanocristales de celulosa (CNC) dado que son los nanocristales de filtros orgánicos más estudiados en la actualidad por ser sostenible, biodegradable y amigable con el medio ambiente. <sup>[31]</sup>

A su vez, también se analizan los nanocristales de tris-bifenil triazina (TBPT) y los nanocristales de metilen bis-benzotriazolil tetrametilbutilfenol (MBBT) que son representativos por ser los más utilizados en filtros UV, siendo además autorizados por la Comisión Europea <sup>[28]</sup>, sin embargo, cabe aclarar que no son los únicos en esta categoría.

#### 2.3.3.1 Nanocristales de celulosa (CNC)

Estos nanocristales utilizan la celulosa, que es un material disponible en la naturaleza con la característica de ser renovable, degradable y seguro por sus propiedades no tóxicas, es un biopolímero abundante que se encuentra en las plantas, ya que es uno de sus componentes estructurales, principalmente en algas, algunos animales marinos y bacterias que lo producen, se compone de partes amorfas, sin orden, y de partes cristalinas que tienen un ordenamiento y

forma de prisma rectangular, cuyas dimensiones varían según la fuente de la celulosa. Los nanocristales de celulosa (CNC) son fibras cortas en forma de varilla con un diámetro de 5 nm a 10 nm y una longitud de hasta 100 nm (Figura 2). [34, 35]

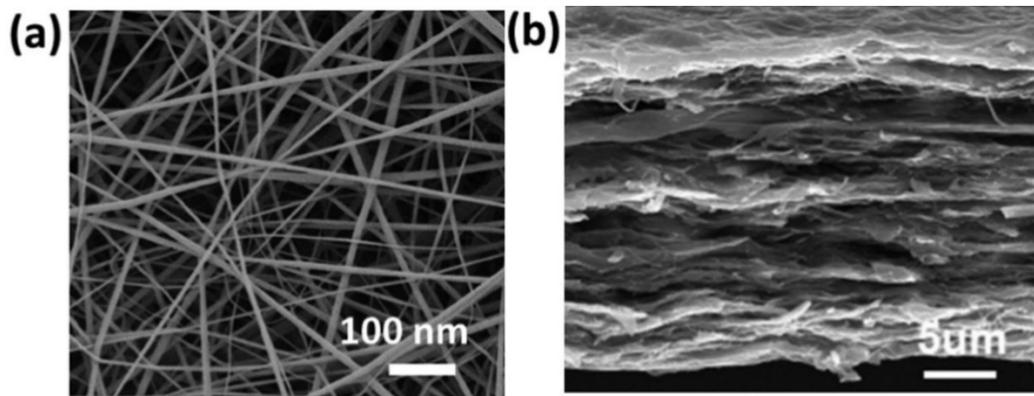


Figura 2. Materiales a base de celulosa observados por SEM o TEM, (a) nanohilos de celulosa (CNYs) por electrohilado a partir de acetato de celulosa, (b) sección transversal de una película de celulosa preparada a partir de nanofibras de celulosa. Reimpreso, *Carbohydrate Polymers*, **278**, Meftahi A. *et al.* Nanocelluloses as skin biocompatible materials for skincare, cosmetics, and healthcare: Formulations, regulations, and emerging applications, pp. 118956, Copyright (2022). Con permiso de Elsevier, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118956>. [35]

Los CNC es aislada por diferentes métodos que son clasificados como mecánico, donde se tritura en un molino de alta energía para remover las partes amorfas y dejar sólo las partes cristalinas, este paso se repite hasta tener cristales uniformes, su desventaja es que cada paso disminuye su porcentaje de cristalinidad; el método químico involucra una digestión de la celulosa con un ácido seleccionado dependiendo la investigación, como el tratamiento con ultrasonido e hidrólisis ácida fuerte con una selección de  $H_2SO_4$  concentrado, HCl, HBr o  $H_3PO_4$ , según las propiedades requeridas. [34, 36, 37] Si los CNC son obtenidos por hidrólisis con  $H_3PO_4$  o  $H_2SO_4$  se dispersan fácilmente en agua debido a la abundancia de grupos fosfato o sulfato altamente polares en su superficie. [37] Por el contrario, los CNC fabricados por hidrólisis con HCl o HBr no

se pueden dispersar fácilmente ya que sus suspensiones acuosas tienden a agregar partículas sólidas en la dispersión coloidal. [36, 38]

Los CNC cuentan con nuevas ventajas prometedoras debido a sus dimensiones, pueden ingresar a los poros de la piel para penetrar a través de la capa lipídica y la epidermis hacia los otros estratos, dando una mejor penetración en la membrana, presentando una alta adhesión, las suspensiones de CNC tienen un pico de absorbancia UV máximo de alrededor de 278 nm, y su intensidad de absorción está influenciada por la duración de la hidrólisis ácida, el rendimiento de bloqueo UV es compatible con los bloqueadores UV convencionales (NP TiO<sub>2</sub> o NP ZnO) que muestran un pico de absorción entre 356 nm y 428 nm, son nanocristales renovables e innovadores, que incorporadas y combinadas con otros materiales pueden permitir desarrollar dispositivos multifuncionales, eficientes y sostenibles. Por lo tanto, los CNC podrían ser una alternativa potencial a las nanopartículas de base mineral en cosmética con funciones de protección UV, reparando el envejecimiento facial por exposición solar. [35, 39]

Al evaluar el impacto ambiental, desde la extracción de las materias primas hasta la eliminación de su vida útil, para los CNC se han presentado estudios con un enfoque hacia los efectos de producción, el potencial cambio climático y el empleo de combustibles fósiles, sin embargo, dado que cuentan con una serie de procesos que demandan energía y materiales de alto impacto ambiental, se estudió la posibilidad sobre el uso de ácidos reciclables para la hidrólisis de la celulosa, haciendo su proceso de producción más rentable y favorable para el medio ambiente. [37, 38, 40] La caracterización de estos materiales es fundamental, ya que la estabilidad y su comportamiento dependen en gran medida de la densidad de carga superficial y el tamaño de las partículas. Por lo cual, es necesario un mejoramiento en los métodos de producción para obtener un material estándar con rendimiento constante. [34]

Las nuevas investigaciones han desarrollado métodos eficientes y ecológicos, Meyabadi T. *et al.* propuso el método que podría reemplazar el tratamiento químico convencional (hidrólisis ácida) para producir nanopartículas de celulosa sin contaminación ambiental, el cual se planteó en aplicarse a otros materiales

fibrosos naturales, se trata de la preparación de CNC mediante hidrólisis enzimática de fibras de algodón de desecho y tratamiento con ultrasonidos. Al caracterizar dieron como resultado un tamaño de partícula promedio menor a 100 nm después del proceso de hidrólisis y sonicación, de modo que mantuvo su estructura cristalina, aunque disminuyó su grado de polimerización. Además, la degradación térmica mostró que la hidrólisis y la sonicación del algodón no tuvo efecto sobre las propiedades químicas de la celulosa, por lo tanto, demostraron un proceso de química verde que reutiliza las fibras de algodón de desecho y las convierte en polvo de celulosa útil sin cambios significativos en sus propiedades beneficiosas y aplicables a otras fibras. [38]

Otra investigación orientada a ser sostenible y respetuosa con el medio ambiente es de Zhang *et al.* desarrollaron CNC funcionalizados por una técnica de esterificación con cloruro de cinamoilo (Cin), obteniendo Cin-CNC a base de agua, con características no blanqueadoras, resistente al agua, sin alcohol, fotoestable y alto factor de protección solar. Se comparó los nanocristales obtenidos con un protector solar comercial con factor de protección solar (SPF) 50, en concentraciones de 5 % en peso, el producto comercial presentó un SPF de 10.0 y el Cin-CNC de 20.3. Por lo tanto, los Cin-CNC sirvieron como protectores UV en matrices de polímeros hidrofílicos e hidrofóbicos, a su vez son nanomateriales prometedores en el campo de la fotoprotección. [41]

Además de poseer los CNC características renovables y degradables, se incrementó el interés en materiales híbridos que adquieren nuevas capacidades como los nanocristales coloidales de ZnO que presentaron inestabilidad durante su almacenamiento por lo que su reactividad superficial se vio reducida. Awan F. *et al.* diseñó y sintetizó un sistema nanohíbrido óptimo y altamente poroso para uso como filtro UV y agente fotocatalítico en la degradación de pigmentos colorantes o contaminantes orgánicos. A través de la estructura de CNC recubierta de melamina-formaldehído (MF) se proporcionó un sustrato rico en nitrógeno mesoporoso para el crecimiento quelado con las NP ZnO en solución acuosa, sin necesidad de calcinación a alta temperatura, tensioactivos o agentes de protección. Logró demostrar que los CNC porosos de superficie modificada en

solución acuosa se pueden utilizar para controlar el crecimiento de nanocristales semiconductores de ZnO, también se obtuvieron ventajas como limitar la energía superficial y el crecimiento de las NP ZnO con alta eficiencia fotocatalítica. Finalmente, se probó la capacidad de aplicarse en productos del cuidado de la piel. [39]

Leão R. *et al.* evaluó la técnica de producción de los CNC a partir de fibras de bagazo de caña de azúcar, para dicho análisis investigó la metodología de obtención, donde los datos abarcaron la plantación de caña de azúcar, el pretratamiento, el blanqueo e hidrólisis para la generación de bagazo. Los doce escenarios de extracción de CNC que se investigaron consistieron en un tratamiento con NaOH o NaClO<sub>2</sub> seguido de la hidrólisis con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Como resultado, todos los escenarios mostraron que la etapa de pretratamiento fue la que más contribuyó al impacto ambiental, los nanocristales obtenidos de dos procesos en particular demostraron el menor impacto ambiental basado en el menor consumo de agua y el potencial de calentamiento global. EL primer proceso trabajo con NaClO<sub>2</sub>/NaOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en 30 min y el segundo proceso con NaClO<sub>2</sub> /NaOH/HNO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en 30 min. Se demostró la obtención de los CNC a partir de la caña de azúcar mediante hidrólisis ácida con potencial como agentes de refuerzo en nanocompuestos. A su vez, contribuyó al uso de fibras naturales como materia prima, siendo una fuente renovable y un precedente a futuros estudios para mejorar el desempeño ambiental de los productos, las nuevas investigaciones deben buscar alternativas para mejorar los rendimientos de los procesos y reducir el consumo de agua, la duración del proceso y el uso de solventes (o el intercambio de estos solventes) durante el pretratamiento. [38, 40]

Por otro lado, está la investigación basada en materiales naturales es la de CNC injertados con dietil-sinapato (CNC-DES), que demostró ser eficaz en bloquear los rayos UV, el injerto DES es insoluble en agua, sin embargo, al combinarse son CNC, se dispersa en formulaciones a base de agua y en glicerol al 10 %. Se estudio la estabilidad coloidal y el rendimiento de bloqueo UV de CNC-DES en glicerol acuoso (un humectante común en formulaciones cosméticas sin petróleo) y en una crema humectante comercial. Una crema facial mezclada con 1.5 % en

peso de CNC-DES exhibe un SPF 5.03, que es más alto que un protector solar comercialmente disponible con la misma concentración de ingrediente activo (SPF 3.84). Las mediciones de citotoxicidad revelaron que el CNC-DES no causó una citotoxicidad significativa en las células de fibroblastos después de 24 h de exposición. Las dispersiones de glicerol que contienen 0.1 % a 1.5 % en peso de CNC-DES mostraron una actividad anti-UV muy alta. En general, CNC-DES exhibe fuertes propiedades anti-UV con antioxidantes, dispersable en agua, biocompatible, no graso y liviano, teniendo potencial como filtros UV en la próxima generación de formulaciones cosméticas, incluidas las destinadas a piel sensible. [42]

En la actualidad el desafío es desarrollar síntesis ecológicas y respetuosas con el medio ambiente garantizando la sostenibilidad, por lo que se necesita un enfoque de diseño ecológico seleccionando procesos con perspectiva de implementación a escala industrial y escenarios con bajo impacto ambiental. [34, 41] El manejo de los CNC en productos cosméticos y filtros UV podrían ser una alternativa potencial por su penetración en la piel, su dispersión en formulaciones base agua, su alta disponibilidad en la naturaleza con características de renovables, degradables y no tóxicas.

#### 2.3.3.2 Nanocristales de metilen bis-benzotriazolil tetrametilbutilfenol (MBBT)

Los nanocristales de metilen bis-benzotriazolil tetrametilbutilfenol (MBBT) son compuesto de benzotriazoles fenólicos que le dan la capacidad de actuar como protector solar al ser utilizado como agente absorbente de UV con características de dispersión y reflexión de los rayos UV. Además, se obtuvieron beneficios de los filtros orgánicos e inorgánicos dado por el efecto estabilizador sobre otros absorbentes. Se encuentra en los protectores solares, así como en productos para iluminar la piel y en tintes fotoluminiscentes para aplicaciones orgánicas basadas en electrónica (Figura 3). [43]

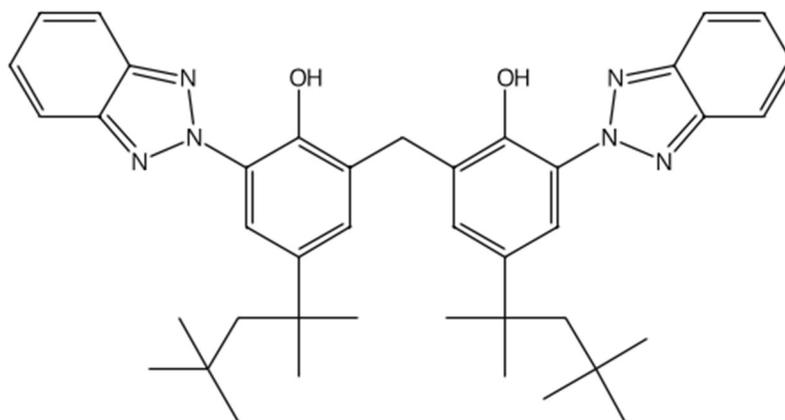


Figura 3. Estructura del 2,2'-metileno-bis-(6-(2 H -benzotriazol-2-il))-4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenol, abreviado como MBBT de Ciba Specialty Chemicals Inc. Reimpreso, *Journal of Colloid and Interface Science*, **276** (2), Herzog B. *et al.* Physical properties of organic particulate UV absorbers used in sunscreens: II. UV-attenuating efficiency as function of particle size, pp. 354-363, Copyright (2004). Con permiso de Elsevier, <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.04.009>. [44]

Anteriormente se carecía de métodos analíticos y toxicológicos para tener un control de calidad en la industria de los productos de protección solar y del cuidado personal que tuvieran como objetivo el comprobar si dichos productos son apegados a las cláusulas establecidas en la legislación de la Unión Europea. Por ello, Orsi D. *et al.* estudió y desarrolló métodos analíticos para la cuantificación de 11 filtros UV de clase UV-A y UV-B, cuyo uso es permitido y se encuentran entre los más utilizados por la industria cosmética. [45, 46]

Dicho análisis se realizó por la técnica analítica HPLC con un cromatógrafo de líquidos que constó de una bomba binaria de suministro de disolvente con desgasificador en línea, un inyector con bucle variable y un detector de matriz de fotodiodos, para MBBT se trabajó con una elución CH<sub>3</sub>OH/C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N 1:1 para la fase móvil, caudal de 1.0 mL/min con un volumen de inyección de 10 µL a 35 °C en columna y con una longitud de onda óptima de 340 nm. Bajo estas condiciones, los tiempos de retención que presentaron los MBBT fueron de 3.4 ± 0.1 min con porcentaje de la desviación estándar relativa de 0.3 %. Se comprobó que estos procesos analíticos se aplicaron con éxito para el tratamiento y análisis de

muestras comerciales, además de ser posible su empleo en el control de calidad para filtros UV de acuerdo con la legislación de la Unión Europea. [45, 46]

En el estudio de Thorel E. *et al.* se buscó la presencia de residuos de productos farmacéuticos y del cuidado personal en medio acuático, dado que se tiene poco control en su liberación y se han acumulado dichas sustancias en las aguas grises afectando a los organismos vivos de los ecosistemas y la salud pública. La toxicidad la evaluaron con organismos clave para establecer estándares de calidad ambiental para los filtros UV, el primero fue con crustáceo marino *Artemia salina*, que se determinó por el conteo de larvas muertas después de una exposición de 48 h, donde a concentraciones altas (2 mg/L) no mostró toxicidad los filtros con MBBT. Seguido se observó los efectos sobre las microalgas *Tetraselmis sp.*, después de 7 días de exposición se analizó mediante citometría de flujo (FCM), donde en la tasa de crecimiento, el impacto de la morfología celular y de la actividad metabólica no fueron afectados por el filtro UV de MBBT, por lo tanto, no son considerados tóxicos para el medio ambiente, sin embargo estos resultados se pueden considerar como datos preliminares y se ve la necesidad de realizar más ensayos en una amplia diversidad de especies para monitorear una gama de ecosistemas. [47, 48]

En 2016 fue regulado el uso de MBBT en nanocristales para filtros UV por el Comité Científico de Seguridad del Consumidor (SCCS), se tuvo en cuenta resultados analíticos y toxicológicos de los estudios de genotoxicidad realizados con formas nano y no nano de MBBT, en el análisis de toxicidad aguda por inhalación de 4 h en ratas, se expusieron a una dilución al 10 % de MBBT. Al final del período de observación (15 días) no observaron signos clínicos, muertes prematuras ni efectos adversos toxicológicamente relevantes sobre el peso corporal. [49]

Así mismo, se estudió la penetración dérmica *in vitro* de MBBT en tamaño nanométrico en piel de ratas y de humanos extraída de la grasa subcutánea, se probó si existía una relación comparable por penetración, a las 24 h la cantidad de muestra en las capas inferiores de la piel humana fue significativamente menor en comparación con las membranas de la piel de rata. Además, en las pruebas con

MBBT micronizado con un tamaño de partícula menor a 100 nm, se observó que la velocidad de penetración fue extremadamente baja y en una medida muy limitada a través de las membranas de piel, siendo mayor en la piel de rata.

A su vez, se buscó el rango de toxicidad en MBBT micronizado en un ungüento base, se aplicó el ungüento con concentraciones crecientes cada 6 h por 3 días, posteriormente, los animales recibieron la dosis más alta (2000 mg/kg de peso corporal) durante 6 h por 14 días, demostrando que aun a esta concentración no tuvieron efectos adversos. En el segundo estudio, se aplicaron dosis dérmicas del filtro UV MBBT suspendido en una pomada hidrófila a 500 mg/kg, 1000 mg/kg y 2000 mg/kg durante 39 semanas en muestras de piel de mini cerdos, se examinaron los efectos sobre la viabilidad, los signos clínicos, el consumo de alimentos y el peso corporal, donde no observaron hallazgos macroscópicos ni microscópicos relacionados en órganos y tejidos.

La SCCS basado en la evidencia que sugiere una absorción muy baja de MBBT en la piel humana y la ausencia de efectos adversos en los mini cerdos, aun con la dosis más alta probada, concluyeron que el uso de MBBT en nanocristales para filtros UV es permitida en una concentración de hasta 10 % en productos cosméticos aplicados por vía dérmica, por otro lado, debido al escaso potencial de biodegradación, no se excluían los efectos a largo plazo o la bioacumulación de MBBT en el medio ambiente, por lo que se clasifico como "*posible potencial de efectos a largo plazo en el medio ambiente acuático*", sin embargo, en análisis recientes de MBBT se vio resultados satisfactorios en los estándares de calidad ambiental por lo que actualmente no son considerados tóxicos para el medio ambiente. [47, 49]

Esto no quiere decir que ha terminado la investigación sobre el MBBT, aún quedan incógnitas por responder como las posibles aplicaciones en filtros UV híbridos, los posibles efectos cancerígenos a exposición prolongada. Estos puntos no son tratados a profundidad en los estudios presentados y lo dejan pendiente para próximos análisis, por ello, se impulsa a progresar y contribuir en mayores investigaciones con el fin de salvaguardar la salud y seguridad de los

consumidores con el medio ambiente sin dejar de lado la innovación y el mejoramiento de los productos.

### 2.3.3.3 Nanocristales de tris-bifenil triazina (TBPT)

Los nanocristales de tris-bifenil triazina (TBPT) se utiliza como materia prima para filtros UV por ser un absorbente UV orgánico micronizado con solubilidad extremadamente baja en aceite y agua, muy fotoestable dado que el SPF y UVA-PF (Factor de Protección UVA) no varían después de 2 h de irradiación en un simulador solar, además tiene potencial como fotoestabilizador para combinaciones de filtros UVA y UVB por ser de amplio espectro. Es el primer filtro que se añadió al Anexo VI del Reglamento (CE) nº 1223/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo por el que se establece la lista de filtros autorizados en productos cosméticos en Europa desde 2013 (Figura 4). [46, 50, 51]

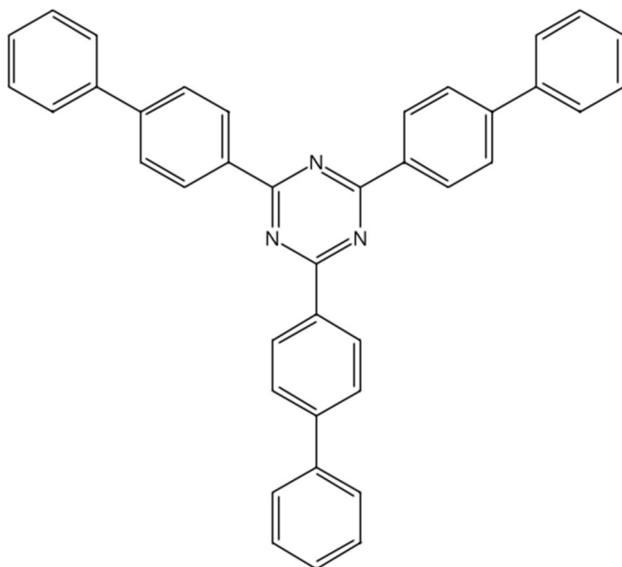


Figura 4. Estructura de 1,3,5-triazina, 2,4,6-tris [1,1'-bifenil]-4-il, abreviado como TBPT, de la base de datos BASF. Reimpreso, *International Journal of Pharmaceutics*, **487**, Couteau C. *et al.* Tris-biphenyl triazine, a new ultraviolet filter studied in terms of photoprotective efficacy, pp. 120-123, Copyright (2015). Con permiso de Elsevier, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.03.077>. [51]

Se han desarrollado productos en aplicaciones de filtros solares añadiendo nuevas características como antienviejecimiento, altos rendimientos y mayor seguridad por

su mejorada estabilidad. Esto lo aplicaron utilizando la avobenzona (4-terc-butil-4'-metoxidibenzoilmetano) (AVO) como base, el cual es el segundo filtro UV orgánico más utilizado por ser uno de los pocos filtros UV capaces de proteger contra los rayos UVA y ser aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA), sin embargo, las limitaciones para su uso es ser fotoinestable con fotodegradación rápida. [50, 52, 53]

Por ello, Scarpin M. S. *et al.* estudió los efectos de tres fotoestabilizadores de avobenzona de uso frecuente: etilhexil metoxicrileno (EHMCR), citrato de tris (tetrametilhidroxipiperidinol) (TTMHP) y tris-bifenil triazina (TBPT), donde analizó su fotoestabilidad y fototoxicidad con la combinación de avobenzona (AVO), metoxicinamato de octilo (OMC) y del derivado de la vitamina A, palmitato de retinilo (RP). La fotodegradación de los filtros UV puede afectar el rendimiento de protección solar y provocar la pérdida de su eficacia, lo que comprometerá la seguridad al aumentar el riesgo de quemaduras solares o incluso producir fotoproductos con potencial alérgico, se estudió la fotoestabilidad de los compuestos después de una irradiación UVA por cromatografía líquida de alta presión (HPLC), donde OMC y AVO no fueron considerados fotoestables en formulaciones sin fotoestabilizadores y el RP se consideró fotoinestable aun en presencia de fotoestabilizadores. [47, 50]

En este sentido, el AVO se analizó sin fotoestabilizador y se mostró una fotodegradación del 87 % de recuperación, al combinarlo con diferentes fotoestabilizadores se obtuvo un aumento significativo en su fotoestabilidad, donde la adición de EHMCR, TBPT y TTMHP presentó una recuperación del 94 %, 98 % y 100 % respectivamente. Al combinar el AVO con RP y un fotoestabilizador, los resultados fueron similares, donde el EHMCR, TBPT y TTMHP dio una recuperación del 99 %, 92 % y 97 %. Por lo tanto, todos estos fotoestabilizadores son efectivos para AVO en formulaciones que contienen RP. El OMC sin estabilizadores presentó una recuperación del 90 %, con la adición de RP-TBPT dio 87 %, por lo que en ambos casos si se presentó una clara fotodegradación. Sin embargo, se observó una mejora significativa con las formulaciones OMC-TTMHP, OMC-EHMCR Y OMC-TTMHP-RP con una recuperación de hasta 98 %. En

cuanto a RP, sin estabilizadores se obtuvo una recuperación del 44 %, las formulaciones con los fotoestabilizantes EHMCR, TBPT y TTMHP dio del 70 %, 58 % y 53 %.

Además, para la fototoxicidad se realizó el ensayo fototóxico de captación de rojo neutro 3T3, adicionando EHMCR, TBPT y TTMHP en las formulaciones con o sin RP, para el fotoestabilizador TBPT se mostró el potencial fototóxico con una respuesta dependiente de la dosis, en el ensayo de cultivo celular, TBPT probablemente es capaz de inducir la formación de productos fototóxicos o la generación de ROS, por lo tanto, a pesar de su baja fotodegradación, no pudo estabilizar los filtros UV reduciendo la respuesta fototóxica, sin embargo, es necesario mayores estudios sobre su penetración cutánea dado que para inducir un efecto fototóxico *in vivo*, el TBPT probablemente tenga una biodisponibilidad reducida a través de la barrera del estrato córneo (capa más externa de la epidermis) y no entre en contacto con la epidermis viable para producir un efecto fototóxico, demostrando que es necesario mayores investigaciones sobre los posibles efectos de los productos en aplicaciones de filtros solares con una mayor importancia en los ensayos de fototoxicidad complementarios.

Añadiendo nuevas herramientas de investigación para comprender las propiedades de las moléculas que protegen la piel de los rayos solares se presentó el estudio de Santos B. A. *et al.*, donde a partir de modelados moleculares de los derivados de triazina y benzotriazol permitidos como filtros UV, se reúnen características útiles para desarrollar protectores solares. Dicho estudio se centró en etilhexil triazona (EHT), dietilhexil butamido triazona (DBT), anisotriazina (BEMT) y tris-bifenil triazona (TBPT), donde se presentó la comparación de los resultados teóricos del espectro de absorción UV obtenidos con los datos de espectros experimentales, a fin de validar la precisión del modelado molecular y la confiabilidad de la reproducción de las principales características experimentales (Figura 5).<sup>[54]</sup>

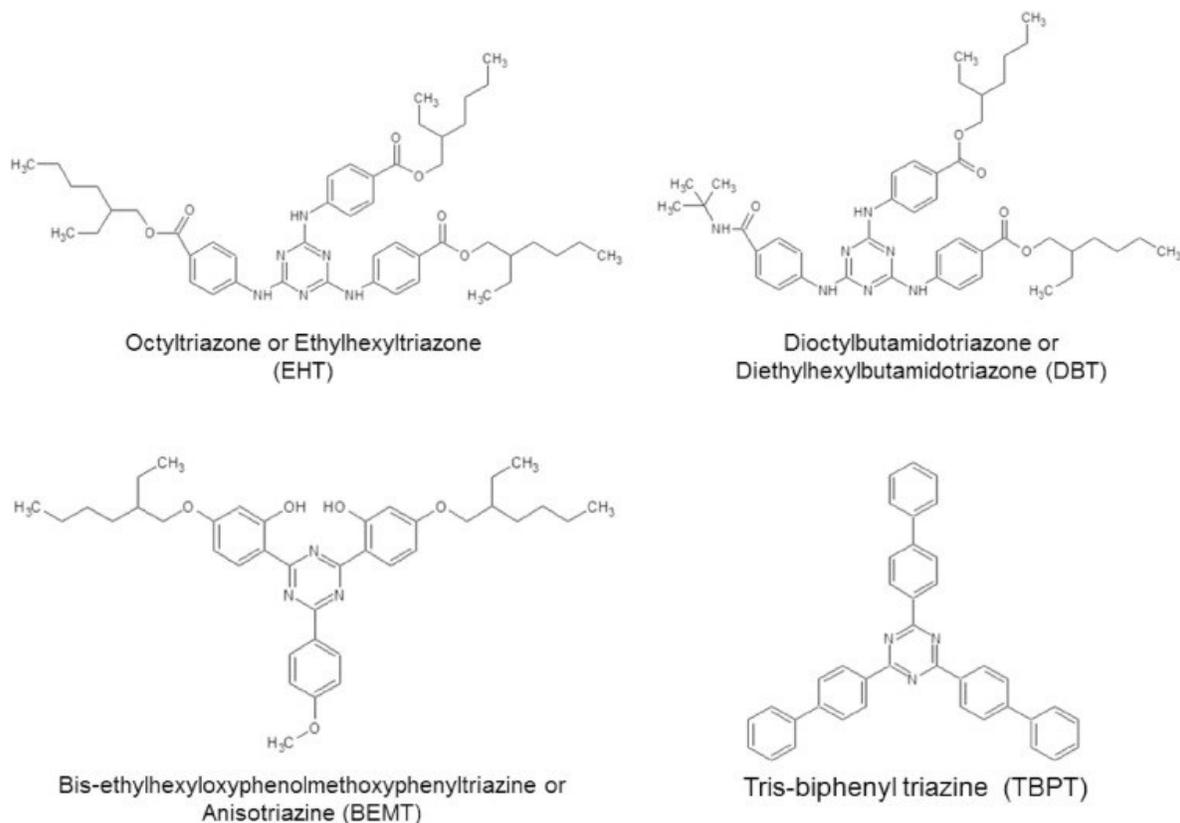


Figura 5. Derivados de triazina de filtros UV orgánicos, etilhexil triazona (EHT), la dietilhexil butamido triazona (DBT), la anisotriazina (BEMT) y tris-bifenil triazina (TBPT). Reimpreso, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **356**, Santos B. A. *et al.* Molecular modeling for the investigation of UV absorbers for sunscreens: Triazine and benzotriazole derivatives, pp. 219-229, Copyright (2018). Con permiso de Elsevier, <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2017.12.036>. [54]

De modo que realizaron la búsqueda conformacional aleatoria utilizando el software SPARTAN<sup>10</sup> con el campo de fuerza MMFF94. Para la distribución del conformero TBPT dio como resultado una conformación estable de baja energía única debido a su sustitución de bifenilo en el núcleo de triazina. Posteriormente optimizaron la geometría con el enfoque semiempírico PM6 (Método paramétrico 6) seguido de DFT/B3LYP con el conjunto de base 6-31G(d). Se optimizó la estructura de los electrones centrales del compuesto con los cálculos DFT funcionales híbridos B3LYP y el conjunto base 6-31G(d), describiendo así el sistema electrónico más probable y la respectiva densidad de estado fundamental,

dicha investigación la enfocaron en la predicción e interpretación cualitativa de las propiedades del estado excitado considerando únicamente el filtro UV en vacío. Se comparó los espectros de absorción UV teóricos con los experimentales en fase gaseosa, los datos de referencia fueron de la base de datos BASF Sunscreen, que es una herramienta simuladora de protección solar con datos experimentales, y realizaron la normalización de la absorbancia de acuerdo a la intensidad máxima de cada espectro (Figura 6). Donde el coeficiente de correlación entre los resultados experimentales y teóricos fue de 0.8636 mostrando así confiabilidad de los resultados, sin embargo, los cálculos fueron realizados pensando en filtros UV aislados (en vacío), por lo que al compararlos con espectros de absorción experimentales medidos en solventes, demostraron que el método computacional funciona, e identificaron las desviaciones entre los cálculos en vacío y en solvente.

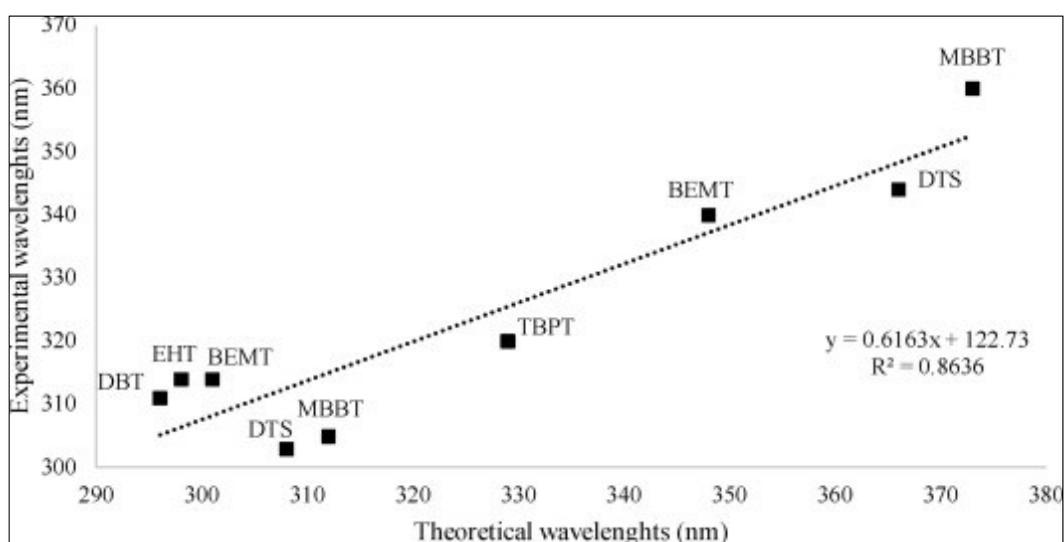


Figura 6. Comparación entre las longitudes de onda teóricas y experimentales de los máximos de absorción. Reimpreso, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **356**, Santos B. A. et al. Molecular modeling for the investigation of UV absorbers for sunscreens: Triazine and benzotriazole derivatives, pp. 219-229, Copyright (2018). Con permiso de Elsevier, <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2017.12.036>.<sup>[54]</sup>

En este sentido, referente a su interpretación cualitativa, se sabe que el TBPT contiene el núcleo de triazina y grupos arilo combinados que influyen en la absorción de alta intensidad en el espectro (máximo de absorción calculado a 329 nm), además, es un filtro extremadamente fotoestable debido a sus grupos arilo que permiten la dispersión de electrones y la conversión interna. Por lo tanto, este método computacional abre una nueva gama de posibilidades, donde es posible reproducir la absorción UV experimental de un conjunto de derivados de triazina y benzotriazol con la confianza de la precisión y la velocidad computacional, además, si en un futuro se presenta la posibilidad de crear nuevos productos, dicha herramienta ayudará a predecir sus propiedades intrínsecas y definir si será útil el filtro UV en su aplicación antes de sintetizarlo, disminuyendo a su vez costos y ahorrando tiempo.

En 2011, el SCCS presento la opinión sobre 1,3,5-triazina, 2,4,6-tris[1,1'-bifenil]-4-ilo, conocido como TBPT de tamaño nanométrico, donde se realizaron estudios de toxicidad oral aguda, por inhalación y dérmica aguda, además analizaron la irritación en la piel, la absorción dérmica/percutánea y la fototoxicidad del material a tamaño nanométrico. En la toxicidad oral aguda, no se observó mortalidad ni signos clínicos de toxicidad en ninguno de los animales de estudio, en la toxicidad aguda por inhalación, se presentó un aumento en el número de neutrófilos en los análisis del lavado broncoalveolar (BALF) en el segundo día de la prueba, lo que es indicativo de una reacción inflamatoria, además, en el día 15, algunos parámetros confirmaron la reacción adversa después de la inhalación de TBPT. Para la absorción dérmica/percutánea, el elemento de prueba absorbido fue de 1.38 % y 0.06 % de la dosis aplicada para piel de rata y humana, respectivamente, por lo que, la tasa de penetración percutánea en la piel humana y de rata fue muy por debajo de las concentraciones cuantificables confiables. <sup>[55]</sup>

Así mismo, la fototoxicidad es una respuesta cutánea aguda provocada por sustancias fotoreactivas en presencia de la luz solar, que se pueden categorizar como fotoirritación, fotoalergia y fotogenotoxicidad. Los resultados presentados por SCCS del TBPT en tamaño nanométrico con y sin radiación UV, indicaron que no se afectó negativamente la formación de edemas, arrugas o el grosor de los

pliegues de la piel, por lo que no se generó formas tóxicas alternativas ni se aumentó los efectos adversos por radiación UV, dando un efecto protector eficaz, por lo tanto, es seguro su aplicación en productos cosméticos de un máximo de concentración del 10 %.

Finalmente, en dichas investigaciones se comprobó que los TBPT son capaces de mejorar las limitantes en los productos ya existentes con mayores rendimientos, a su vez, se mostraron herramientas capaces de comprender las propiedades de las moléculas cuyo objetivo es proteger la piel de fuentes externas, abriendo así nuevas posibilidades que ayudarán a predecir sus propiedades y definir si serán útiles en los filtro solares, con la cualidad de reducir costos de producción aún menor tiempo, sin embargo, se ve la necesidad de mayores investigaciones sobre los posibles efectos de toxicidad en la piel, para proteger a los seres vivos y su interacción con el medio ambiente.

#### 2.3.4 Nanodiamantes (ND)

Los nanodiamantes (ND) son nanomateriales ampliamente investigados debido a su excelente biocompatibilidad, factor importante para su aplicación en el cuidado de la piel, son partículas policristalinas con una forma y tamaño variable no uniforme, además de potentes antioxidantes que pueden ser utilizados como aditivos, en filtros UV son eficaces dado que protegen las células del daño de los rayos UVB atenuando la irradiación a través de la absorción y la dispersión con características fotoestables, al no tener actividad fotocatalítica, es propuesto como solución para la toxicidad de otros nanomateriales en filtros solares. [10, 56]

Sin embargo, para que se pueda utilizar como antioxidantes, debe retener la generación de las especies ROS durante períodos prolongados, que son producidas por el metabolismo aeróbico fisiológico de forma natural, que a grandes concentraciones puede alterar la función celular y promover el daño celular, por ello se presentó la encapsulación en filtros UV, donde las nanopartículas bioadhesivas pueden evitar la penetración en la piel de productos químicos nocivos y al mismo tiempo bloquean los rayos UV de forma eficaz utilizando dosis más bajas. [56, 57]

En la investigación de Lin Q. *et al.* presentaron una propuesta para mejorar la toxicidad de las NP TiO<sub>2</sub>, dado que se conoce que sus nanopartículas fotoactivadas generan especies ROS y provocan daños celulares, por ello, evaluaron las ventajas de incorporar ND en los protectores solares como aditivos en presencia de TiO<sub>2</sub> con implicaciones para otros productos para el cuidado de la piel. [56]

Por ello, para medir el impacto de la irradiación solar en las propiedades antioxidativas realizaron el experimento DPPH 100 μM, donde el aumento de la actividad antioxidante de los ND después de la irradiación se observó incluso en presencia de NP TiO<sub>2</sub>, mostrando potenciales de barrido mejorados después de la irradiación, donde al momento de la irradiación los grupos reactivos se debilitan permitiendo reaccionar fácilmente con otros radicales y obtener una mayor capacidad antioxidante. Para medir las propiedades anti-UV, se mostraron los espectros de transmitancia UV de ND y NP TiO<sub>2</sub> suspendidas en agua desionizada a 25 μg/mL, se dio un desplazamiento ascendente mínimo en los espectros de ND después de 3 h de irradiación continua, esto confirmó que son aditivos estables para aumentar las propiedades anti-UV del TiO<sub>2</sub> en los protectores solares.

Además, presentaron prototipos de cremas de protección solar y compararon sus propiedades de fotoestabilidad y antioxidantes, dichos prototipos contenían 0.5 % en peso de ND y 8.75 % en peso de NP TiO<sub>2</sub>, estas cremas fueron estables sin observar separación de fases después de una semana inerte, los estudios de fotoestabilidad se realizaron irradiando películas delgadas y registrando los espectros cada hora, donde la incorporación de ND en la crema base produjo cremas con potencial de eliminación mejorado, después de la irradiación, estas cremas exhibieron un aumento adicional significativo en los potenciales de barrido, se confirmó que las propiedades antioxidantes de ND se mantienen durante períodos prolongados de tiempo dado que son filtros UV altamente fotoestables y efectivos capaces de eliminar las especies ROS generadas por las NP TiO<sub>2</sub> fotoactivadas *in situ*, proporcionando así una protección adecuada contra el estrés

oxidativo intracelular. Por lo tanto, en los protectores solares es recomendado utilizar ND como aditivos para el principio activo.

Meng-Si W. *et al.* evaluó si los ND no muestran una actividad fotocatalítica después de la irradiación, se analizó cuatro nanomateriales mediante experimentos de degradación con azul de metileno (MB), donde los ND a 5 nm y 10 nm no exhibieron actividad fotocatalítica obvia en comparación con el grupo MB control, por otro lado, las muestras de rutilo y anatasa (NP TiO<sub>2</sub>) degradaron considerablemente MB. Por ello, estos resultados dan más confianza en que los ND no presentan actividades fotocatalíticas por UVB, no inducen a la generación de ROS o a daños celulares. [57]

Se necesita a su vez visualizar los efectos que tendrían los ND en el ser humano, Perevedentseva E. *et al.* presentó varios métodos de evaluación para analizar la interacción de los ND con la piel murina *in vitro* a diferentes tamaños de partícula, así como estimar su penetración y distribución en las capas de la piel. Primero se analizó los ND por diferentes técnicas de síntesis, los obtenidos con alta temperatura y presión tuvieron un tamaño de 100 nm (100 ND) y 50 nm (50 ND), los ND por detonación fueron de un tamaño promedio de entre 3 nm a 10 nm (DND), las imágenes por SEM mostraron que los ND son partículas policristalinas con forma y tamaño no uniforme, las suspensiones 50 ND y DND tuvieron grandes dispersiones entre los agregados, mientras que los tamaños de los ND y sus estructuras se confirmaron mediante los espectros Raman (Figura 7). [58]

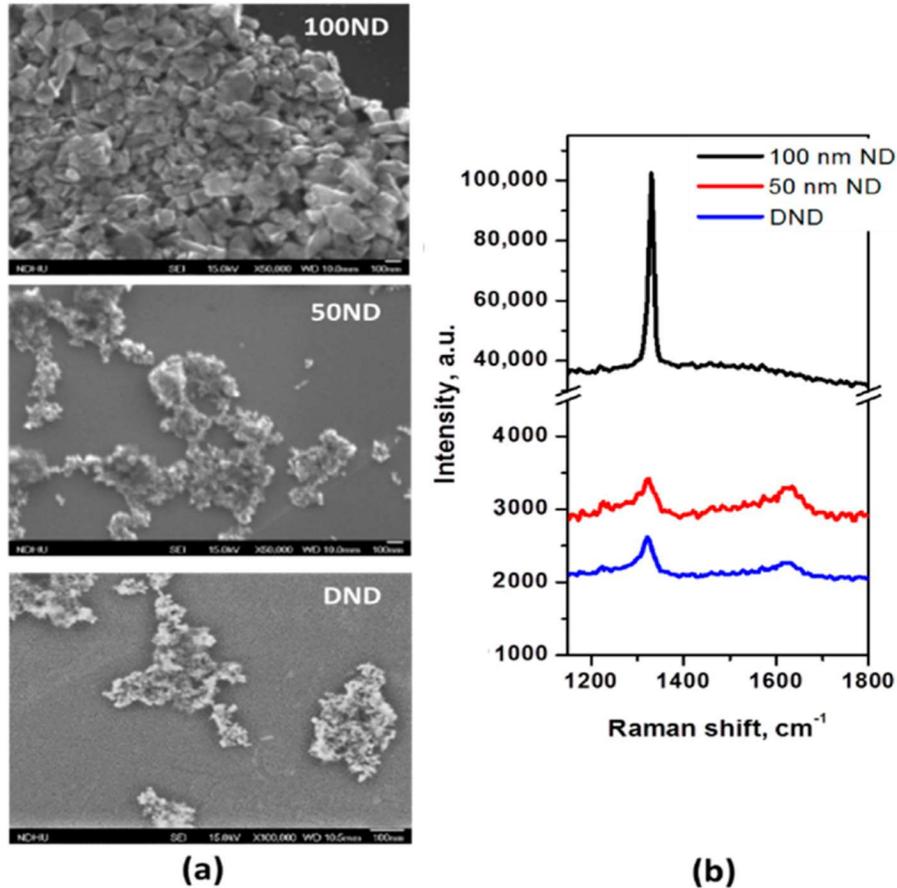


Figura 7. Caracterización de ND. (a) imágenes SEM de ND secados en un sustrato de Si; (b) espectros Raman de ND en sustrato de Si. Reimpreso, *Materials*, **12** (22), Perevedentseva E. *et al.* Optical Studies of Nanodiamond-Tissue Interaction: Skin Penetration and Localization, pp. 3762, Copyright (2019). Con permiso de MDPI. <https://doi.org/10.3390/ma12223762>. [58]

Al estudiar su aplicación en la piel, se mezclaron suspensiones acuosas de ND en la solución fisiológica PBS (buffer fosfato salino) a una concentración de 1 mg/mL. Se analizó por tomografía de coherencia óptica (OTC) obteniendo imágenes 2D que ilustró la interacción entre la piel murina y los ND, en la muestra control se apreció la estructura de la piel, con la suspensión de 100 ND y DND no se mostró diferencias significativas en su estructura, sin embargo, en la capa externa de la piel se presentó una mayor reflexión, por lo que, es posiblemente que sea la presencia de ND adheridos en el estrato córneo junto con queratinocitos muertos (Figura 8).

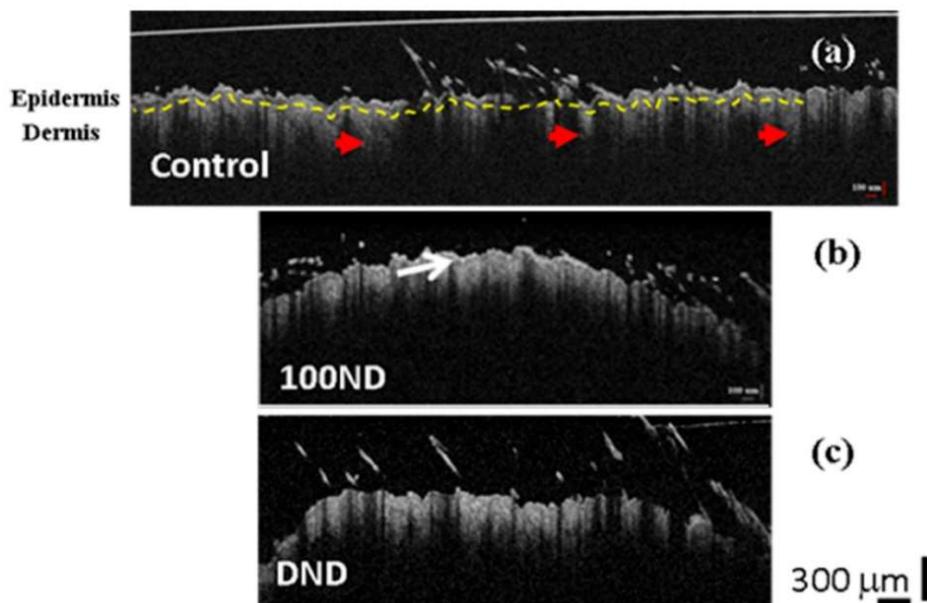


Figura 8. Imágenes 2D OCT. Muestras de piel murina (a) control compuesta por la epidermis, la dermis separada por una capa basal (línea amarilla) y los folículos pilosos (puntas de flecha rojas), (b) 100 ND y (c) DND, con capa del estrato córneo a mayor reflexión (flecha blanca). Reimpreso, *Materials*, **12** (22), Perevedentseva E. *et al.* Optical Studies of Nanodiamond-Tissue Interaction: Skin Penetration and Localization, pp. 3762, Copyright (2019). Con permiso de MDPI. <https://doi.org/10.3390/ma12223762>. [58]

Por otro lado, se analizó por microscopía láser confocal (MLCF) y microscopía de excitación de dos fotones (MP) para observar la distribución de los ND en la piel y analizar su penetración; por microscopía de tiempo de vida de imagen fluorescente (FLIM) se analizó la distribución de la vida útil. Finalmente encontraron que la señal de los ND se localiza predominantemente en los folículos pilosos, aunque los datos presentados sugirieron que pueden penetrar en células endoteliales vasculares cultivadas y en apéndices con aberturas en la superficie, por ejemplo, las glándulas sebáceas o los poros de las glándulas sudoríparas, proporcionando vías alternativas, sin embargo, el comportamiento de los ND en la piel depende en gran medida de su tamaño, por lo tanto los mecanismos aún no están claros y necesitan más investigación.

Se evaluó la seguridad de los ND en filtros solares por el modelo de cultivo celular, comparando los NP ZnO, NP TiO<sub>2</sub> y ND de 5 nm y 100 nm a diferentes

concentraciones, donde a una concentración mayor ( $2 \text{ mg/cm}^2$ ) todas las nanopartículas protegieron a los queratinocitos humanos inmortalizados (HaCaT) y a los fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) del daño de los rayos UVB principalmente los ND de 100 nm fueron óptimos para la protección aun después de 20 min, superando a los ND de 5 nm, sin embargo, a bajas concentraciones ( $1 \text{ mg/cm}^2$ ) todas las nanopartículas no ofrecieron una protección adecuada, por otro lado, debido a que el modelo de cultivo celular puede no reflejar de manera integral la complejidad de la piel humana, se diseñó un modelo animal para estudiar la eficiencia del bloqueo de UVB de los ND a partir de ratones, estos se sometieron a irradiación UVB por 20 min durante tres días, los ratones que recibieron NP  $\text{TiO}_2$  y los ND de 100 nm ( $2 \text{ mg/cm}^2$ ) solo mostraron lesiones leves en comparación con los cubiertos con el control, además el daño de la piel se desarrolló a partir del tercer día.

Además, se analizó el papel protector de los ND en las funciones de barrera epidérmica, por el experimento de exclusión de colorantes, obteniendo que la radiación UVB dañó la función de barrera epidérmica de los ratones experimentales, lo que provocó niveles más altos de retención de tinte en los tejidos de la piel. Por el contrario, las muestras de piel protegidas con NP  $\text{TiO}_2$  y ND de 100 nm, tendieron a mantener una función de barrera epidérmica relativamente intacta, siendo más efectiva que los grupos de control. Por lo tanto, los ND atenuaron la intensidad de los rayos UVB, se aumentó la viabilidad de las células de queratinocitos humanos (HaCaT) y MEF, además de mejorar las respuestas inflamatorias de la piel del ratón a exposición a los rayos UVB, sin generar ROS, siendo su eficacia comparable a las NP  $\text{TiO}_2$  y NP ZnO.

En general, las nuevas investigaciones se van orientando a nuevas aplicaciones que se van descubriendo sobre los ND en presencia de otras nanopartículas con el fin de obtener mejores productos a menores costos de producción, para eso se toma en cuenta las propiedades de las partículas como si conducen a variaciones en su penetración y su distribución, sin embargo, los mecanismos aún no están claros y necesitan mayor investigación.

## 2.4 NANOMATERIALES HIDRATANTES Y ANTIENVEJECIMIENTO

La piel está expuesta a muchos factores en el transcurso del día incluyendo la contaminación, la exposición a los rayos solares ultravioleta, el humo del cigarrillo, etc. Estos son responsables de la producción de especies ROS, cuyo exceso induce el estrés oxidativo que daña las células, el ADN y las proteínas provocando el envejecimiento de la piel. Por ello, los cosméticos son dirigidos a proteger la piel proporcionando una fuente adicional de antioxidantes, entre ellos existen diferentes ingredientes a considerar como encapsular el agente activo en liposomas de alta penetración en la piel, consiguiendo mayor potencial antioxidante, así como un aumento de la síntesis de colágeno. Además, se pueden incorporar diversas sustancias antioxidantes que ayudan a neutralizar los daños celulares provocados por los radicales libres. [59, 60, 61]

### 2.4.1 Liposomas hechos de fosfolípidos insaturados y saturados.

Los liposomas están compuestos por una capa bilipídica de fosfolípidos que son anfipáticos (con parte hidrófoba e hidrofílica) en medio acuoso y adquieren una estructura esférica, estos son capaces de actuar como nanoesferas y nanocápsulas. Las nanoesferas son sistemas que incluyen las sustancias activas entre las redes de los polímeros que la conforman, mientras que las nanocápsulas encierran en el interior de su estructura a la sustancia activa (Figura 9). [59]

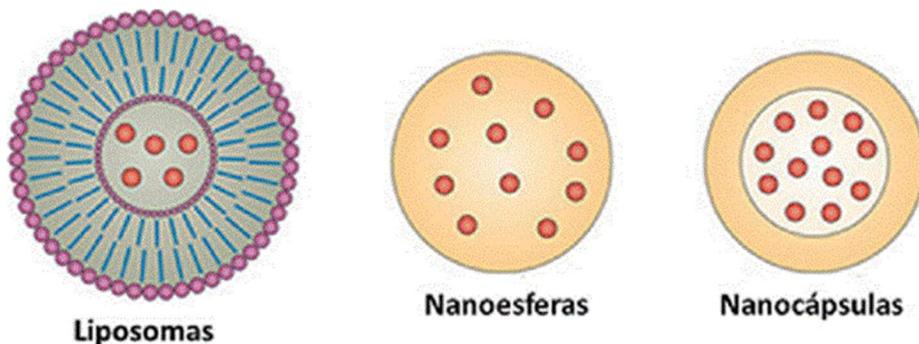


Figura 9. Estructura de las nanopartículas. Reimpreso, *Nature Reviews Neurociencia*, **10**, Orive G. *et al.* Biomateriales para promover la protección, reparación y regeneración cerebral, pp. 682-692, Copyright (2009). Con permiso de Nature Reviews Neurociencia. <https://doi.org/10.1038/nrn2685>. [62]

Los liposomas son clasificados por su tamaño y número de bicapas, sin embargo, el tamaño adecuado para propósitos de administración cosmética varía entre 50 nm y 200 nm, son utilizados preferentemente por su capacidad de controlar la liberación del núcleo, aplicar el ingrediente activo en un sitio específico, por su biocompatibilidad, biodegradabilidad, su baja toxicidad, además de ser atraídos naturalmente por la piel junto con la capacidad de encapsular ingredientes activos hidrófilos como lipófilos, sin embargo, presentan desventajas que incluyen baja estabilidad, alto costo de producción, son termodinámicamente inestables que tienden a agregarse, fusionarse, degradarse o hidrolizarse, lo que da como resultado la fuga de los ingredientes activos, con una vida útil corta y una rápida eliminación de la circulación sanguínea, aun así, son los nanoportadores más utilizados en cosmética. [59, 63]

Chen-Tan *et al.* presentó la problemática al utilizar los liposomas dado que son termodinámicamente inestables. Por ello, idearon nuevas estrategias para mejorar el rendimiento de los liposomas con la integración de sistemas híbridos de biopolímero-liposoma con propiedades clave de biocompatibilidad y biodegradabilidad, los sistemas más estudiados son los liposomas de superficie modificada, compuestos de polímeros recubiertos o injertados en las superficies de los liposomas, dando como resultado una estabilidad biológica mejorada, un direccionamiento específico al sitio y una propiedad de circulación a largo plazo. [64]

El estudio realizado para la aplicación de liposomas en las formulaciones es presentado en 2021 por Allaw M. *et al.* donde utilizaron el arbusto *Pistacia lentiscus* para obtener el aceite de lentisco, el cual tiene un alto contenido de bioactivos e incluye una fracción insaponificable responsable del efecto en la cicatrización de la piel lesionada, en este caso prepararon vesículas a partir de lecitina de soya natural con un método de química verde y libre de solventes orgánicos, obteniendo así vesículas esféricas homogéneamente dispersas. El aceite de lentisco se analizó a concentraciones crecientes, estudiando sus principales propiedades fisicoquímicas, la eficiencia de atrapamiento, estabilidad de almacenamiento y capacidad de penetración en la piel, obteniendo a su vez

una evaluación preliminar de sus capacidades biológicas, como biocompatibilidad y protección contra daños oxidativos. [61]

Así mismo, al caracterizar estas vesículas se realizó el análisis de microscopía de transmisión de electrones criogénicos (Cryo-TEM), donde el diámetro promedio, el índice de polidispersidad y el potencial Z lo determinaron mediante el método de espectroscopia de correlación de fotones (DLS). Para la cuantificación del aceite de lentisco se midió el éster metílico de ácidos grasos (FAME) por cromatografía de gases acoplada en un detector de ionización de llama. Se observó en las imágenes de Cryo-TEM que el aceite de lentisco a grandes concentraciones (40 mg/mL y 50 mg/mL) provocó la formación de vesículas grandes, altamente polidispersas e inestables, mientras que a una concentración de 10 mg/mL, 20 mg/mL y 30 mg/mL las vesículas presentaron un menor tamaño, homogéneamente dispersas con forma esférica y uniformes, esto se comprobó con los resultados de los análisis de DLS (Figura 10).

Por otro lado, los liposomas sin aceite tuvieron un tamaño promedio de 122 nm, fueron ligeramente polidispersos y cargados negativamente, al agregar el aceite, a 10 mg/mL se presentó una disminución significativa de tamaño a 104 nm, con 20 mg/mL y 30 mg/mL se produjo la formación de vesículas ligeramente más grandes con un diámetro similar al de las vacías, por lo tanto, la homogeneidad se vio afectada por la cantidad de aceite de lentisco incorporado, posteriormente se almacenaron a temperatura ambiente por 90 días y se evaluaron, los liposomas vacíos aumentaron su tamaño hasta 200 nm, los liposomas con 10 mg/mL y 20 mg/mL de aceite pasaron de 104 nm a 121 nm hasta 150 nm, para los otros parámetros se detectó variaciones importantes, los liposomas con la mayor cantidad de aceite de lentisco (30 mg/mL) fueron casi constantes y por ello, contaban con una mejor estabilidad en el almacenamiento.

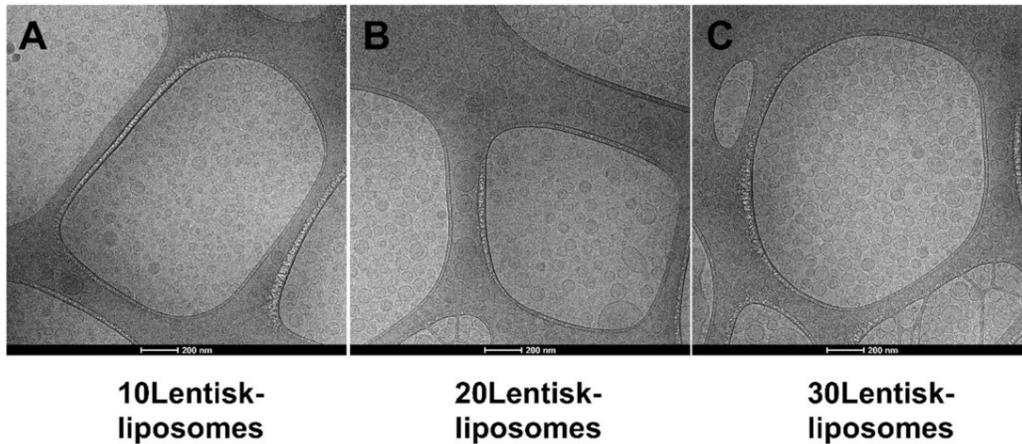


Figura 10. Imágenes Cryo-TEM representativas de (A) 10 liposomas de lentisco, (B) 20 liposomas de lentisco y (C) 30 liposomas de lentisco. Reimpreso, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **144**, Allaw M. *et al.* Formulation of liposomes loading lentisk oil to ameliorate topical delivery, attenuate oxidative stress damage and improve cell migration in scratch assay, pp. 112351, Copyright (2021). Con permiso de Elsevier, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112351>. [61]

También realizaron el estudio de piel *in vitro* a partir de células Franz, utilizaron las vesículas preparadas a diferentes concentraciones de aceite de lentisco en piel de cerdo recién nacido marcadas con un fosfolípido ligado a la rodamina fluorescente, lo que permitió la visualización de la distribución en los diferentes estratos de la piel. Se encontró que las vesículas vacías se detectaron principalmente en la superficie de la piel con poca penetración independientemente del tiempo (4 h a 8 h), sin embargo, a 20 mg/mL y 30 mg/mL después de 8 h, la fluorescencia fue más evidente y se encontró bien distribuida en los estratos más profundos de la piel, confirmando una fuerte penetración de los componentes lipídicos, dando la posibilidad de que el aceite de lentisco libre podría actuar como potenciador de la penetración.

Por otro lado, para evaluar la biocompatibilidad y la protección que aportan los liposomas frente al estrés oxidativo celular de las formulaciones, cultivaron células HaCaT y fibroblastos embrionarios de ratón primarios, los cuales se estresaron con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% diluido 1:30 v/v con PBS, durante 4 h y se trató simultáneamente con aceite de lentisco en dispersión o cargados en liposomas, al final se midió la supervivencia de las células usando la prueba de viabilidad celular con MTT

(bromuro de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolio) (Figura 11). El aceite de lentisco en dispersión presentó variaciones, de 30 µg/mL a 60 µg/mL fue menor al 77 %, mientras que a concentraciones de 0.03 a 3 µg/mL fue del 93%.

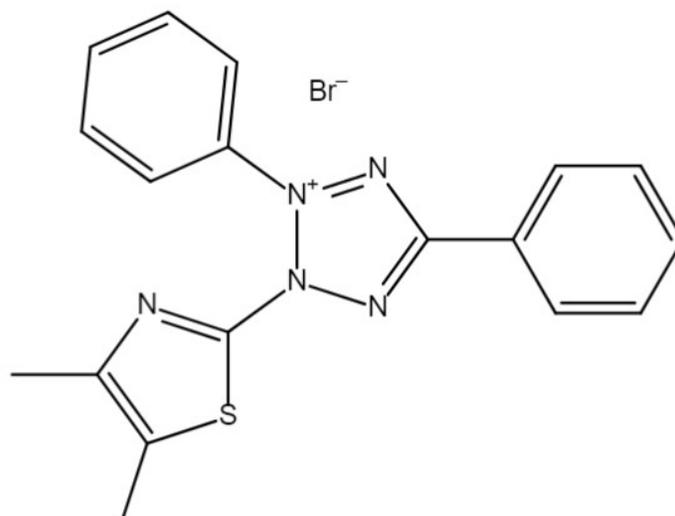


Figura 11. Estructura de MTT (bromuro de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolio). Reimpreso, *Acta Histochemica*, **114** (8), Stockert J. C. *et al.* MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets, pp. 785-796, Copyright (2012). Con permiso de Elsevier, <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2012.01.006>. [65]

En dicho el estudio, lo más relevante fue el empleo de los nanomateriales con un método de preparación simple con componentes naturales derivados de plantas que adquirieron la capacidad de permanecer estables durante 3 meses en almacenamiento a temperatura ambiente, además se demostró que el aumento de la concentración contribuyó a la penetración de las vesículas en los estratos más profundos de la piel, principalmente se acumuló exitosamente en la dermis cuya capa está implicada en la regeneración del proceso de cicatrización, otra ventaja es su inexistente toxicidad aun a concentraciones en exceso, además la dispersión de liposomas cargados con aceite mejoró la proliferación de queratinocitos como de fibroblastos, mostrando una gran capacidad para contrarrestar los daños inducidos en la piel.

Una nueva estrategia de investigación fue dirigida hacia el campo de la nanomedicina, donde siguen el mismo principio en el uso de los liposomas, se

administran de forma tópica los productos naturales para el tratamiento de la inflamación cutánea, Barone A. *et al.* presentó la síntesis y caracterización fisicoquímica de los liposomas ultradeformables (UL) cargados con glicirricinato de amonio (AG), evaluaron su liberación y permeación por la epidermis e investigaron el efecto antiinflamatorio en voluntarios humanos sanos. El AG es una sal derivada del ácido glicirrónico, donde ambas tienen una actividad antiinflamatoria similar, sin embargo, no tiene la capacidad de atravesar la piel debido a su alto peso molecular y propiedades fisicoquímicas, que dificultan su permeación intacta a través de la piel. [66]

Anteriormente se han presentado nanoformulaciones aplicables para la penetración del AG, sin embargo, a pesar de sus ventajas se mostraron limitaciones para la distribución del fármaco dentro del torrente sanguíneo, por esta razón se analizó una nueva vía de aplicación con los UL, dado que cuentan con una mayor eficacia de encapsulación debido a que no contienen alcohol y tienen mayor estabilidad física ya que su bicapa no es mayoritariamente surfactante, además de una rápida penetración gracias a su elevada elasticidad usando el gradiente acuoso transmembrana a través de la piel, se mueven intactos por pequeños canales acuosos de unión estrecha entre los corneocitos hasta la dermis, donde alcanzan la circulación sanguínea por transporte pilosebáceo y capilar.

Para la síntesis se utilizó la técnica de evaporación de capa delgada, se analizó su morfología, sus propiedades superficiales y deformables por TEM y AFM, tanto de los UL vacíos como los AG-UL, con AG al 0.3 % p/v, la cual es cantidad máxima de carga útil que produce nanoportadores distribuidos pequeños, estables y de tamaño estrecho. En los resultados se presentaron tamaños promedio de  $109 \pm 3.8$  nm en UL vacíos y de  $128 \pm 4.6$  nm para AG-UL. El análisis TEM mostró nanopartículas con forma esférica con estructura unilamelar, además la carga de AG no modificó significativamente la forma y el cuerpo lamelar de los liposomas, aunque los tamaños de las nanopartículas coloidales fueron ligeramente más grandes que los vacíos, pero no son significativas estas diferencias. El análisis de microscopía de fuerza atómica (AFM) demostró que los UL vacíos y AG-UL tienen

una morfología esférica sin rugosidad superficial y el atrapamiento de cargas útiles no afecta la morfología de las nanopartículas coloidales (Figura 12).

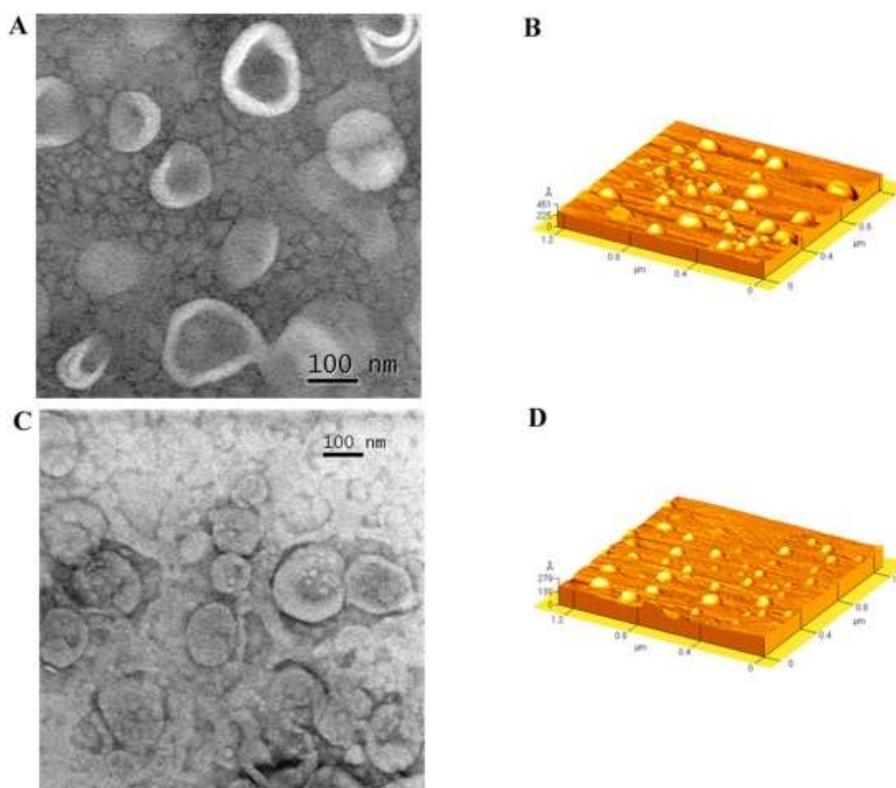


Figura 12. Imágenes (A) TEM de UL vacíos, (B) AFM de UL vacíos, (C) TEM de AG-UL, (D) AFM de AG-UL. Reimpreso, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **193**, Barone A. *et al.* Ammonium glycyrrhizate skin delivery from ultradeformable liposomes: A novel use as an anti-inflammatory agent in topical drug delivery, pp. 111152, Copyright (2020). Con permiso de Elsevier, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111152>. [66]

Los estudios de estabilidad de los UL vacíos y AG-U se realizaron durante 4 semanas a 25 °C y 37 °C por DLS. Los resultados obtenidos a 25°C no presentaron cambios significativos en los tamaños promedio para ambas muestras, sin embargo, a 37 °C los tamaños promedio de AG-UL aumentaron significativamente después de la segunda semana, en el estudio en UL la liberación *in vitro*, se cuantificó utilizando células de difusión de Franz, donde entre el donante y receptor se colocó una membrana sintética y se recolectaron muestras a diferentes tiempos (hasta 24 h). Para la permeación *in vitro* se empleó

el mismo método, solo reemplazando la membrana sintética por una epidermis del estrato córneo (SCE) humana y se analizó por la técnica HPLC. Dio como resultado para AG-UL, que el 35 % de AG se liberó en las primeras 10 h de su aplicación, mientras que otro 10 % fue liberado hasta 24 h después, dando como consecuencia que no se liberó por completo AG de los UL, sin embargo, al comparar los resultados obtenidos sobre su permeación, la carga de AG dentro de los UL que pasa a través de la SCE, debido a sus propiedades intrínsecas de deformabilidad son capaces de atravesar las uniones estrechas de las células sin ninguna interacción con los queratinocitos y corneocitos de la piel aumentando su permeación relativa.

Así mismo, se evaluó la tolerabilidad cutánea *in vivo* en ocho voluntarios humanos sanos de 25 a 30 años de edad, utilizaron un espectrofotómetro visible de reflectancia, este método presenta la ventaja de no ser invasivo dado que mide la variación del índice de eritema ( $\Delta$  E.I.) relacionado con la modificación del color de la melanina en el antebrazo, en los voluntarios se aplicó 200  $\mu$ L de UL vacíos, AG-UL y solución salina, dando como resultado que los AG fueron bien tolerados por los voluntarios y no se presentó algún indicio de toxicidad a pesar del contacto prolongado entre la piel y los UL.

Por otro lado, la actividad antiinflamatoria de la solución AG y AG-UL se probó mediante estudios *in vivo*, en voluntarios humanos sanos por espectrofotómetro de reflectancia visible, los sujetos fueron tratados previamente con una solución de nicotinato de metilo al 0.2 % p/v para estimular químicamente el eritema en un área específica de la piel, seguido se trató con diferentes muestra, la solución salina (NaCl al 0.9 % p/v), AG en solución, AG-UL y UL vacíos, dando como resultado que la solución AG fue capaz de actuar como antiinflamatorio, sin embargo, su desventaja se presentó en las primeras dos horas con un aumento de la inflamación, pasado ese tiempo empezó a surtir efecto su aplicación, por otro lado, con la solución AG-UL, en la primera hora, se observó una disminución de la inflamación 15 veces mayor a la solución salina y al final fue 30 veces mejor en comparación con la solución salina (control). Por lo que, el AG si presenta actividad antiinflamatoria y dicho efecto es potenciado significativamente por los

UL en administración tópica, dado que son biocompatibles y deformables, demostrando además que los UL pasan intactos a través de la piel y no presentan toxicidad en las zonas aplicadas, lo que posibilita su aplicación en terapias antiinflamatorias cutáneas a partir de productos naturales, esto demuestra que la innovación para el cuidado de la piel no solo se presenta para aplicaciones estéticas, sino que también se da para el desarrollo de la nanomedicina.

Actualmente para el atrapamiento y administración celular de fármacos se han utilizaron liposomas, dado que son capaces de incorporar un fármaco lipofílico dentro de las bicapas de la membrana, Caddeo C. *et al.* estudió el resveratrol, fármaco que se disuelve en solventes orgánicos (DMSO o acetona), poco soluble en agua, de débil absorción después de la administración oral e inestable a medida que se convierte en la forma cis (forma menos activa), particularmente por exposición a la luz ultravioleta, por ello se planteó la posibilidad de una aplicación tópica con liposomas para superar estas limitantes, el resveratrol se produce de manera natural en varias plantas como respuesta a una lesión o si se encuentran bajo el ataque de patógenos como bacterias u hongos, su aplicación fomenta la supervivencia celular y protege de la apoptosis inducida por la radiación, además brinda protección contra los rayos UV-B por sus fuertes propiedades antioxidantes (Figura 13). [60]

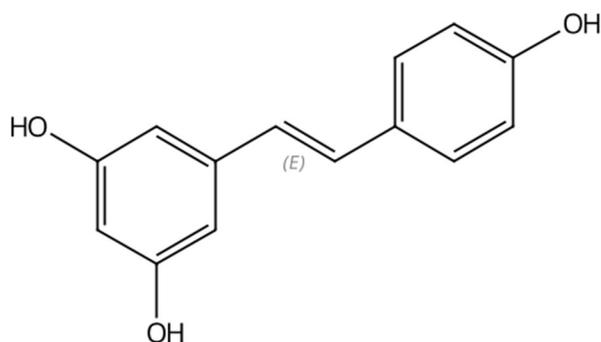


Figura 13. Estructura química del resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroxiestilbeno). Reimpreso, *International Journal of Pharmaceutics*, **363** (1-2), Caddeo C. *et al.* Effect of resveratrol incorporated in liposomes on proliferation and UV-B protection of cells, pp. 183-191, Copyright (2008). Con permiso de Elsevier, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.07.024>. [60]

Inicialmente se estudió el efecto del resveratrol en células HEK 293 por medio del ensayo colorimétrico con MTS, dado que es un método económico, rápido, sensible y específico para evaluar la viabilidad celular y la citotoxicidad *in vitro* basado en la reducción por deshidrogenasa mitocondrial en células metabólicamente activas, donde la intensidad del color producido es la indicación de la viabilidad de las células, por ello la reducción de esta intensidad indica daño celular. El resveratrol a 100  $\mu\text{M}$  fue ineficaz en proteger las células HEK 293 contra el daño UV-B, sin embargo, a concentraciones de 50  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$  se proporcionó un fotoprotección de hasta 3 h.

Por otro lado, el efecto del resveratrol sobre la morfología de las células HEK 293 se examinó mediante microscopía de fluorescencia, donde se observó cualquier alteración estructural que produjo en las células, a bajas concentraciones de resveratrol se aumentó el número de células sin ninguna evidencia de toxicidad, por otro lado, a 100  $\mu\text{M}$  se presentó una pérdida de la integridad de la membrana debido a la degradación de la actina polimerizada, lo que perjudicó el estado funcional normal de las células. Se desarrollaron diferentes formulaciones de liposomas con resveratrol que se probaron en células HEK 293, los liposomas se obtuvieron por extrusión, técnica para obtener una distribución homogénea del tamaño de las vesículas a 100 nm, se evaluó la estabilidad química aplicando la técnica HPLC por 60 días a 4 °C y no se detectó cambios a 288 nm (absorción  $\lambda$  de cis-resveratrol), cuya medición es un indicativo la isomerización trans/cis.

En este sentido, por microscopía de fluorescencia se estudió la interacción de los liposomas con las células HEK 293, se agregó resveratrol a 10  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$ , donde en todos los casos no se mostró signos de citotoxicidad en las células tratadas. Bajo el microscopio de luz invertida, se evidenció un aumento en el número de células y una apariencia morfológica normal, lo que mostró la biocompatibilidad y la no toxicidad de los liposomas, además de confirmar la eliminación de la citotoxicidad del resveratrol en altas concentraciones. En condiciones de estrés causado por la irradiación UVB, se midió el aumento en el crecimiento celular para liposomas cargados con resveratrol, la viabilidad celular aumentó hasta un 223 % del control después de 3 h de irradiación. Por lo tanto,

los liposomas promueven la proliferación celular dado que aumentan la capacidad de las células para sobrevivir al estrés oxidativo, esto se ve incrementado al entrar en contacto con el resveratrol.

Finalmente se concluye que la actividad celular fue inversamente proporcional a la dosis de aplicación del resveratrol libre, sin embargo, el resveratrol puede comportarse tanto como antioxidante como prooxidante dependiendo de su concentración. El resveratrol en liposomas aumentó significativamente la proliferación celular y se eliminó la citotoxicidad en altas concentraciones del fármaco, esto probablemente se deba a una absorción más lenta en comparación con el fármaco libre. Por lo tanto, los liposomas necesitan ser más investigados en diversas áreas de la nanotecnología, con la propuesta de mejorar sus propiedades y disminuir sus desventajas que incluyen su baja estabilidad y alto costo de producción.

#### 2.4.2 Nanopartículas de lípidos sólidos (SLN).

Con el fin de superar las desventajas en las propiedades de los liposomas que provocan la pérdida del agente activo, se presentaron las nanopartículas de lípidos sólidos (SLN), partículas esféricas compuestas de lípidos sólidos a temperatura ambiente, con la adición de un agente emulsionante se disuelven en la fase acuosa, son capaces de encapsular los fármacos hidrófilos e hidrófobos a baja toxicidad, con excelente biodisponibilidad, a bajo costo y de fácil producción. [67, 68]

Se han desarrollado nuevas investigaciones, Steiner D. *et al.* propuso un método que consumió menos recursos al preparar nanoemulsiones y SLN de alta calidad a partir del proceso simultáneo de centrifugación dual, principalmente para los nuevos ingredientes farmacéuticos activos poco solubles en agua con una red cristalina altamente estable que refleja una alta temperatura de fusión. Además, se evaluó la técnica para la detección de formulaciones lipídicas con temperatura de fusión superior a 50 °C. La centrifugadora dual se basa en la superposición de dos movimientos por la implementación de una segunda rueda de rotación que cambia la orientación de las muestras continuamente dando altas intensidades de estrés en las formulaciones, se considera aceptable el proceso de fabricación

cuando los tamaños de partícula son menores de 200 nm con una distribución de tamaño de partícula estrecha. Se utilizó una centrífuga doble modificada con un serpentín de calentamiento en la parte inferior que permitió trabajar mayores a temperaturas (Figura 14).<sup>[69]</sup>

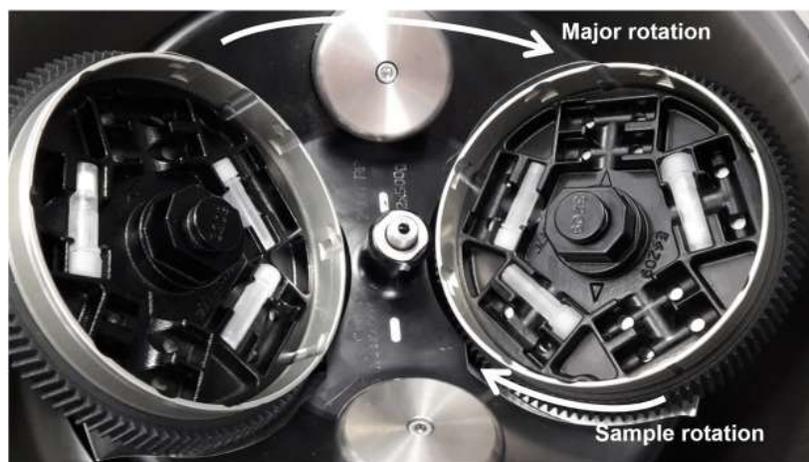


Figura 14. Principio de funcionamiento de la centrífuga dual con superposición de la rotación principal de la centrífuga y la rotación del portamuestras (relación de velocidad 3:1). Reimpreso, *International Journal of Pharmaceutics: X*, **3**, Steiner D. *et al.* Influence of process and formulation parameters on the preparation of solid lipid nanoparticles by dual centrifugation, pp. 100085, Copyright (2021). Con permiso de Elsevier, <https://doi.org/10.1016/j.ijpx.2021.100085>.<sup>[69]</sup>

A su vez, para los estudios comparativos, se precalentó por separado la fase lipídica (10 % de trimiristina) y la solución emulsionante (P188 disuelto en agua) a 65 °C, se mezcló y se homogeneizó a alta presión (Figura 15 y 16), posteriormente se agregó el conservante (azida de sodio 0.0005 %) y se dividió en dos partes. Una parte se enfrió a temperatura ambiente y se almacenó como nanoemulsión, la otra se enfrió en un baño de hielo para cristalizar las gotas de lípidos obteniendo los SLN y se almacenó a temperatura ambiente, el análisis de tamaño de partículas, se empleó la espectroscopia de correlación de fotones (PCS) determinando el diámetro medio y el índice de polidispersidad (PDI), la distribución del tamaño de partícula se midió por difracción láser (LD), en las nanopartículas lipídicas se supuso un índice de refracción de 1.46 y un índice de absorción de 0.01.

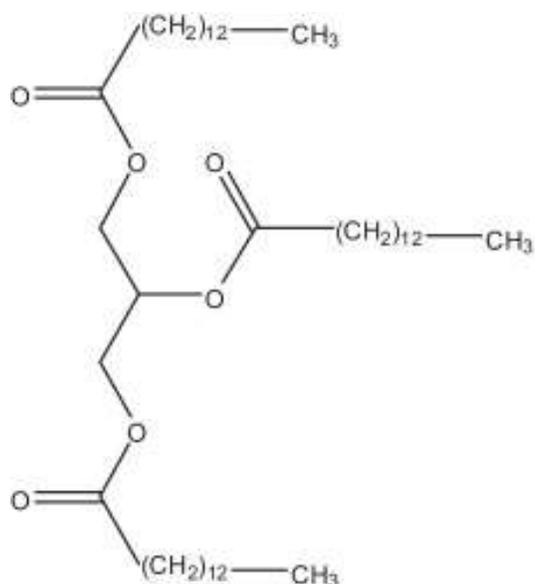


Figura 15. Estructura química de trimiristina. Reimpreso, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **396** (20), Hong B. *et al.* Kinetics on formation of super water repellent surfaces from phase transformation in binary mixtures of trimyristin and tripalmitin, pp. 130-136, Copyright (2012). Con permiso de Elsevier, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.12.056>. [70]

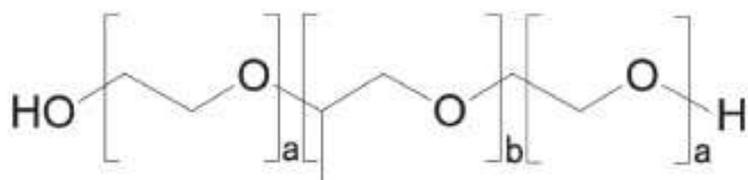


Figura 16. Estructura química de Kolliphor® P188 (poloxámero 188). Reimpreso, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **111** (8), Soeda K. *et al.* Impact of Poloxamer 188 Material Attributes on Proteinaceous Visible Particle Formation in Liquid Monoclonal Antibody Formulations, pp. 2191-2200, Copyright (2022). Con permiso de Elsevier, <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2022.04.012>. [71]

Así mismo, por el estudio PCS se observó en la nanoemulsión un tamaño de partícula de 175 nm y en los SLN de 193 nm, en el Pdl se obtuvo valores de 0.16 y 0.19 respectivamente, además, en el perfil de temperatura durante el proceso de emulsificación, a los 2.5 min se alcanzó una temperatura de 65 °C, a los 10 min la temperatura fue de aproximadamente 90 °C, sin embargo, el aumento de la

presión en los viales por exceso de la temperatura (mayor a 90 °C) causó que los viales se rompieran, por lo tanto, el tiempo de centrifugación no debe durar más de 10 min. En el estudio LD a los 10 min se confirmó un tamaño de partícula semejante entre la nanoemulsión y los SLN, siendo las nanopartículas homogéneas entre sí (Figura 17).

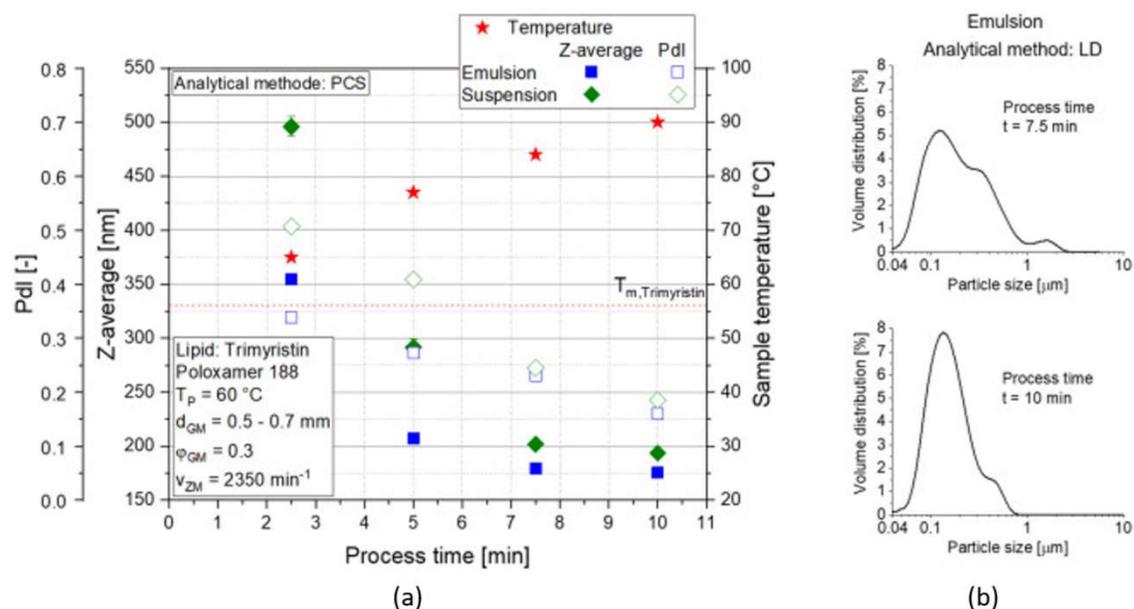


Figura 17. (a) Progreso de emulsificación con los tamaños de partícula, valores de Pdl y temperaturas de muestra de una emulsión y suspensión de trimiristina al 10 %. (b) Distribuciones de tamaño de partícula de emulsiones a 7.5 min y 10 min. Reimpreso, *International Journal of Pharmaceutics: X*, **3**, Steiner D. *et al.* Influence of process and formulation parameters on the preparation of solid lipid nanoparticles by dual centrifugation, pp. 100085, Copyright (2021). Con permiso de Elsevier, <https://doi.org/10.1016/j.ijpx.2021.100085>. [69]

A su vez, para verificar que todo el lípido sólido del vial se fundió durante el procesamiento de preparación, la emulsión de trimiristina se analizó por calorimetría diferencial de barrido (DSC) y los resultados se compararon con el proceso de fusión de una suspensión de trimiristina. A 53.8 °C se presentó una entalpía de fusión específica de 16.4 J/g para la suspensión, por otro lado, al compararse con la nanoemulsión solo se presentó una diferencia de 0.3 J/g, por lo tanto, durante el proceso de centrifugación dual es poco probable que algún lípido

solido quede en el vial, además, para confirmar que el proceso de preparación no influye significativamente en los resultados de la emulsificación, se comparó una emulsión premezclada con la preparada experimentalmente, en los resultados, la diferencia de tamaño más grande de partícula se obtuvo en el menor tiempo registrado (2.5 min), se le atribuyó a que mientras la mezcla preparada experimentalmente necesitaba derretirse en el vial durante el proceso, la emulsión premezclada ya se encontraba fundida, por lo que la centrifugadora dual aumento su homogeneidad, resultando en un menor tamaño de partícula y se confirmó que durante la preparación se ahorró tiempo y no se generó desventajas significativas con respecto a los tamaños de partículas resultantes o las distribuciones de tamaño en comparación con la emulsión premezclada.

En este sentido, este método fue adecuado para estudios de detección cuando es necesario preparar muchas formulaciones con una disponibilidad de material limitada, pero no es recomendable cuando se busca una distribución de tamaño de partícula muy estrecha ( $PDI < 0.10$ ). Una de las ventajas de fabricar SLN con la centrifugadora dual es que las muestras se prepararon fácilmente a temperatura ambiente, por lo tanto, este es un proceso robusto para la preparación de los SLN en paralelo en corto tiempo.

Otro rasgo importante sobre la síntesis y aplicación de las SLN es la administración de fármacos a través de nanopartículas, Fazly-Bazzaz B. *et al.* presentó el estudio de las SLN con aceite esencial (EO) de *Eugenia caryophyllata* (clavo de olor), con la esperanza que sean capaces de reducir la resistencia microbiana, se sabe que el eugenol es el componente principal de los aceites esenciales de *Eugenia caryophyllata*, pero es muy volátil, inestable y sensible a condiciones ambientales como la luz y la temperatura. Por ellos, se prepararon formulaciones de SLN a partir de diferentes componentes, para las fases lipídicas son el precírol (P), ácido esteárico (SA) y monoestearato de glicerilo (GMS) y como tensioactivos son el Tween 80 y poloxámero 188 (2.5 % y 1.25 %), por el método de ultrasonido y homogeneización de alto cizallamiento, además para la preparación de las SLN cargada con el fármaco, se disolvió el EO en la fase lipídica por sus propiedades hidrófobas. [72]

Así mismo, se obtuvo la optimización del tamaño de partícula de modo que solo las formulaciones SLN-GMS-EO, SLN-P-GMS-EO y SLN-SA-EO fueron seleccionadas, para ser llevado a cabo los estudio DLS, TEM y DCS. En el estudio DCS, los puntos de fusión de los SLN se encontraron a una temperatura más baja que el de los lípidos a granel, por otro lado, en los estudios de estabilidad las formulaciones de SLN se mantuvieron estables a una temperatura de entre 2 °C a 8 °C durante 3 meses. En el estudio TEM, los SLN-GMS-EO presentaron un tamaño de 700 nm con estructura casi esférica y uniforme (Figura 18), para la formación SLN-SA-EO su tamaño fue de alrededor de 200 nm (Figura 19).

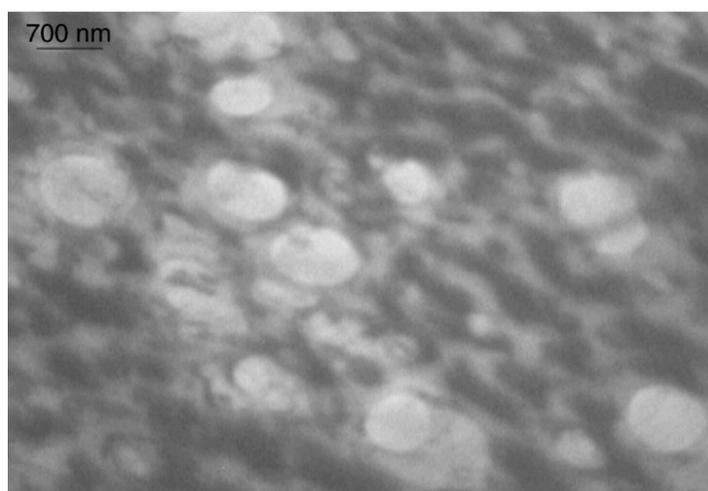


Figura 18. Imagen TEM de SLN-GMS-EO preparada mediante el método de sonicación con sonda. Reimpreso, *Letters in Applied Microbiology*, **66**, Fazly-Bazzaz B. *et al.* Solid lipid nanoparticles carrying *Eugenia caryophyllata* essential oil: the novel nanoparticulate systems with broad-spectrum antimicrobial activity, pp. 506-513, Copyright (2018). Con permiso de John Wiley and Sons, <https://doi.org/10.1111/lam.12886>. [72]

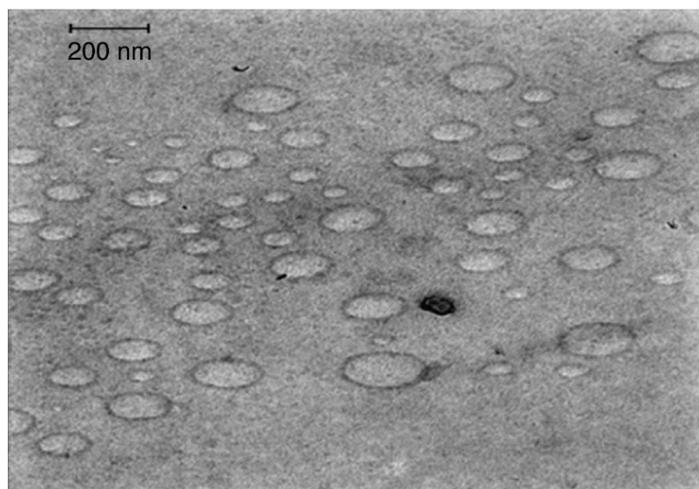


Figura 19. Imagen TEM de SLN-SA-EO preparada mediante el método de sonicación con sonda. Reimpreso, *Letters in Applied Microbiology*, **66**, Fazly-Bazzaz B. *et al.* Solid lipid nanoparticles carrying *Eugenia caryophyllata* essential oil: the novel nanoparticulate systems with broad-spectrum antimicrobial activity, pp. 506-513, Copyright (2018). Con permiso de John Wiley and Sons, <https://doi.org/10.1111/lam.12886>.<sup>[72]</sup>

Así mismo, se analizó la actividad *in vitro* de los antibióticos a partir de las pruebas de concentración mínima inhibitoria (MIC), la concentración bactericida mínima (MBC) y la muerte microbiana, contra bacterias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*), bacterias y hongos Gram-negativos (*Salmonella typhi* y *Pseudomonas aeruginosa*). En los análisis sobre la muerte microbiana se encontró que para las bacterias Gram-positivas son menos efectivas las SLN a comparación del EO libre, sin embargo, para bacterias y hongos Gram-negativos, los SLN fueron efectivos en la destrucción microbiana especialmente con SA.

Por lo tanto, los resultados presentaron que la capacidad mejorada de los SLN está relacionada principalmente con las composiciones lipídicas de las formulaciones y la pared celular de los microorganismos, por lo cual los nanoportadores lipídicos tienen la capacidad de ser aplicados para el tratamiento de infecciones microbianas e incluso puede mejorar la actividad biológica del EO. Por lo tanto, en las formulaciones de SLN con SA y GMS se mostró propiedades antimicrobianas, fisicoquímicas, térmicas y morfológicas ventajosos para su aplicación en fármacos a través de nanopartículas.

Suter F. *et al.* desarrolló SLN que mejoraron la entrega de péptidos en la piel con ventajas en la administración evitando el uso de disolventes orgánicos en el proceso de preparación, dio protección a las moléculas sensibles al medio ambiente y características de liberación controlada, para su preparación se realizó el método de homogeneización en caliente a alta presión utilizando lecitina hidrogenada como agente emulsionante, manteca de karité (P7) como lípidos fundidos y portador del péptido insoluble en grasa y aceite, los SLN-P7 resultantes se enfriaron a temperatura ambiente. El tamaño medio de las partículas, la distribución del tamaño y el potencial Z de la formulación se determinó por PCS, para visualizar la morfología, la forma y el tamaño de las partículas fue necesario utilizar TEM, la determinación del péptido encapsulado se realizó por cuantificación por HPLC, además, los termogramas se registraron por DCS. [68]

Los resultados de TEM presentaron una forma vesicular uniforme del SLN-P7 con tamaño aproximado de 170 nm, en el análisis HPLC se determinó que la eficiencia de atrapamiento en el núcleo fue mayor al 90% y por DSC se presentó su temperatura de fusión de 27 °C y de recristalización 8 °C (Figura 20).

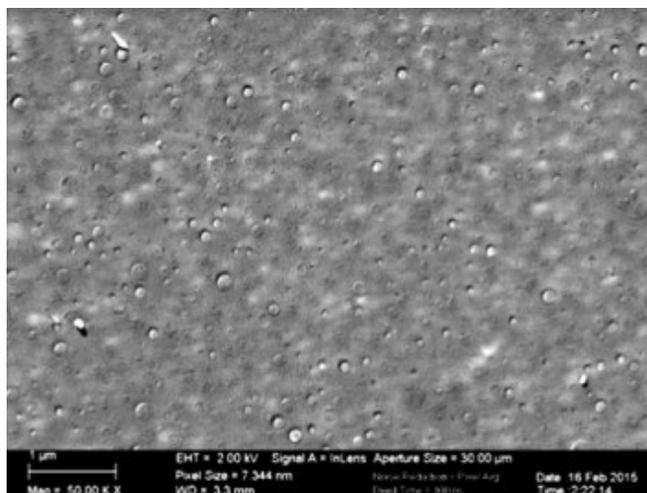


Figura 20. Imagen TEM de SLN-P7. Reimpreso, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **108**, Suter F. *et al.* Heptapeptide-loaded solid lipid nanoparticles for cosmetic anti-aging applications, pp. 304-309, Copyright (2016), con permiso de Elsevier, <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.06.014>. [68]

Igualmente, para el análisis de expresión génica en explantes de piel humana de biopsia abdominal, se comparó el SLN-P7 al 2 % con un placebo, se aplicó tópicamente durante 6 h y dio como resultado una fuerte estimulación de las enzimas de defensa antioxidante; para la prueba de protección multicelular *ex vivo* se analizó el efecto protector de SLN-P7 al daño celular, se aplicó una concentración del 0.037 % y 0.11 % de SLN-P7 con referencia de la crema solar SPF 30 y se expuso a los rayos UV por 24 h, obteniendo como resultado que la aplicación de SLN-P7 en explantes de la piel que produjo una protección significativa y dependiente de la dosis contra la radiación UV, a su vez, la concentración de SLN-P7 al 0.037 % inhibió la formación de células por quemaduras solares en un 20 %, mientras que una concentración 0.11 % dio como resultado una inhibición del 75 %.

Por otro lado, las células de Langerhans (LC) están presentes en el sistema inmunológico de la piel, se observaron mediante microscopía de epifluorescencia y se determinó la proporción de LC en la epidermis para cada tratamiento, dando como resultado que a 0.037 % de SLN-P7 se inhibió el agotamiento de LC en un 6 %, mientras que a 0.11 % resultó en una inhibición del 39 %, por lo tanto, el efecto protector de SLN-P7 está presente de manera efectiva sobre la piel.

Así mismo, se evaluó el efecto protector de SLN-P7 contra los daños oxidativos en la piel a partir de la técnica de ampolla de succión, donde el grado de estrés oxidativo se determinó por la concentración del marcador de daño del ADN (8-OHdG) en la epidermis después de la radiación UVA durante 14 días, dando como resultado que la piel con SLN-P7 al 2 % tuvo una disminución significativa del daño del 20 % en comparación con el placebo, demostrando así, que las SLN mejoraron la entrega de péptidos en la piel dado que se presentó una disminución del daño al ADN en la epidermis después de la radiación UVA

Por lo tanto, los SNL son capaces de ser utilizados con fármacos para aumentar la inhibiendo las quemaduras solares, además, se ha demostrado su capacidad para ser utilizadas a nivel industriales con características prometedoras en mayores investigaciones por la protección en la piel de los rayos UV, fomentando así el cuidado de la piel.

### 2.4.3 Portadores de lípidos nanoestructurados (NLC).

Los portadores de lípidos nanoestructurados (NLC), tienen como base mezclas de lípidos sólidos y líquidos que generan una matriz imperfecta, son conocidos como la segunda generación de nanopartículas lipídicas que superan las desventajas de los SLN conformados únicamente por lípidos sólidos, incluyen una mejor capacidad de carga de los ingredientes activos, la técnica de encapsulación posibilidad cambiar el estado cristalino de los bioactivos para aumentar su solubilidad promoviendo su absorción, disminuyen los riesgos de fuga durante su almacenamiento, no presentan toxicidad para el ser humano, son ideales para el procesamiento industrial y presentan control en la liberación de sustancias activas. Sin embargo, una de las mayores desventajas son los efectos citotóxicos relacionados con la concentración y el efecto irritante de algunos tensioactivos. [67, 73, 74]

En investigaciones recientes se van presentando nuevas aplicaciones en el área médica para el uso de los NLC e indirectamente se mejora la calidad de vida de las personas contribuyendo así a nuevos productos del cuidado personal. Los fármacos necesitan nuevas vías de administración tópica, cuyas ventajas son una menor aparición de efectos secundarios, beneficios para tratar padecimientos de la piel con menores cantidades de ingrediente activo y una mayor absorción superficial. Cirri M. *et al.* mostró interés en el ketoprofeno (Keto), es un fármaco antiinflamatorio no esteroideo utilizado en tratamientos como osteoartritis, la artritis reumatoide y principalmente en trastornos musculoesqueléticos, su principal desventaja por vía tópica es su baja solubilidad en agua, por lo cual, se investigó en base a la complejación del fármaco ciclodextrina (Cd) y los NLC, mejorar la eficacia de administración del Keto (Figura 21). [29, 73, 74]

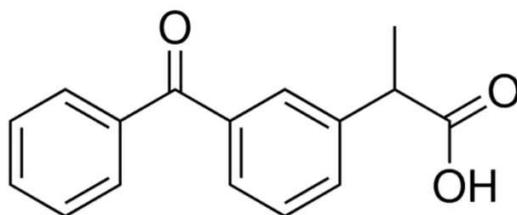


Figura 21. Estructura química de ketoprofeno (Keto). Reimpreso, *The Journal of Chemical Thermodynamics*, **178**, Mendes F. S. *et al.* On the diffusion of ketoprofen and ibuprofen in water: An experimental and theoretical approach, pp. 106955, Copyright (2023), con permiso de Elsevier, <https://doi.org/10.1016/j.jct.2022.106955>. [75]

En dicho trabajo, el  $\beta$ -Cd-epiclorhidrina (EPI- $\beta$ Cd) y el carboximetilado- $\beta$ -Cd-epiclorhidrina (EPI-CM $\beta$ Cd) fueron comparados por su desempeño como derivados poliméricos hidrosolubles de ciclodextrina para la complejación del Keto, se evaluó la eficacia de las técnicas de preparación, co-molienda y co-liofilización, para investigar la influencia de la preparación en las propiedades del producto final, se seleccionó el más efectivo y se utilizó en los NLC, para finalmente ser caracterizado por el tamaño de partícula, la eficiencia de atrapamiento y las propiedades de liberación del fármaco. Los productos de NLC cargados más eficientes se formularon en hidrogel de xantano y se evaluó sus propiedades de permeación. Se preparó el Keto con EPI- $\beta$ Cd y EPI-CM $\beta$ Cd por mezclas físicas combinando los polvos en un mezclador de turbula; para la técnica de co-molienda, se puso la mezcla física en un micromolino vibracional de alta energía a 24 Hz en diferentes tiempos (10 min, 20 min, 30 min o 60 min), en presencia de humedad al 10% o en condiciones secas. En co-liofilización, se disolvió la mezcla física en una solución mínima de etanol, se congeló a  $-40^{\circ}\text{C}$  y se realizó la liofilización, los productos obtenidos se caracterizaron por DCS y DLS, comparándose con las correspondientes mezclas físicas (Figura 22). [29, 73]

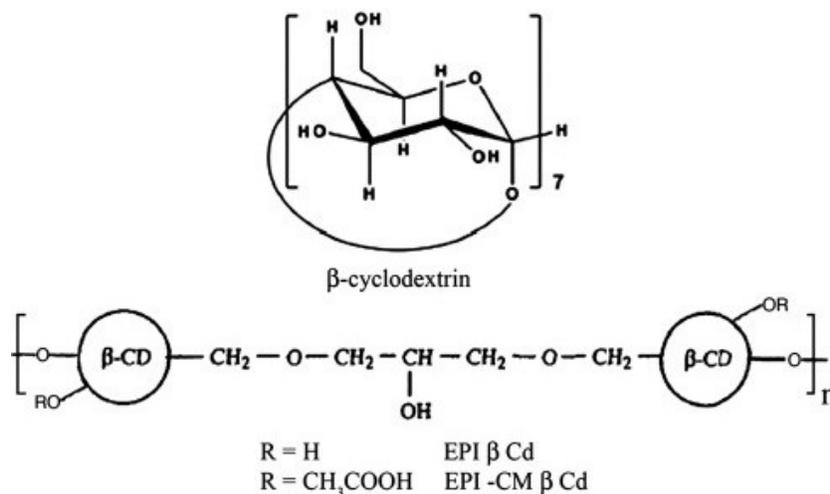


Figura 22. Estructura química del polímero β-ciclodextrina-epiclorhidrina (EPI-βCd) y polímero β-ciclodextrina-epiclorhidrina carboximetilada (EPI-CMβCd). Reimpreso, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **80** (1), Cirri M. *et al.* Development of a new delivery system consisting in “drug – in cyclodextrin – in nanostructured lipid carriers” for ketoprofen topical delivery, pp. 46-53, Copyright (2012). Con permiso de Elsevier, <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.07.015>.<sup>[73]</sup>

Así mismo, en los parámetros térmicos y del grado relativo de cristalinidad, por co-molienda, en condiciones secas se disminuyó de manera progresiva la temperatura de inicio del fármaco y del pico de fusión, en EPI-βCd el proceso de amortización se completó en 30 min, mientras que en EPI-CMβCd fue de 30 min. En condiciones de humedad al 10%, la mezcla de EPI-βCd con Keto se favoreció la interacción entre ambos facilitando el proceso de amortización a 30 min, sin embargo, para EPI-CMβCd con Keto solo se observó la morfización completa de la muestra después de 120 min, siendo estas condiciones perjudiciales para la muestra; en el proceso de co-liofilización se presentó la pérdida completa de la cristalinidad del fármaco en ambas formulaciones. Se midió la distribución del tamaño de partícula por Pdl y se analizó por DLS, dio como resultado, que en la técnica co-molienda en condiciones secas y la co-liofilización son las que presentaron satisfactoriamente nanopartículas en el rango de 300 a 500 nm, en el proceso de co-molienda en condiciones húmedas fueron perjudiciales para la formación de nanopartículas, en su lugar, las condiciones de humedad facilito la

formación de microagregados. Finalmente, se seleccionó las técnicas co-molienda en condiciones secas y la co-liofilización para agregarlos en NLC.

A su vez, en la preparación de las NLC se añadió Labrafac lipófilo (triglicéridos caprílico/ cáprico) y Compritol® 888 ATO (behenato de gliceril), esta fase lipídica se dispersó en solución de Lutrol® F68 (tensoactivo) a 70 °C en un agitador de alta velocidad, se zonificó durante 5 min a 75 °C, finalmente se dejó enfriar para obtener los NLC cuya concentración del fármaco en la dispersión fue 0.4 mg/mL y se caracterizaron por tamaño de partícula, Pdl y eficiencia de atrapamiento. Los NLC vacíos presentaron un tamaño de partícula de  $460 \pm 14$  nm, los NLC cargados con Keto de  $494 \pm 47$  nm y los NLC combinados con Keto-Cd poliméricos (EPI- $\beta$ Cd y EPI-CM $\beta$ Cd) se encuentran en un rango de 393 nm a 500 nm, por lo tanto, el tamaño siempre se mantuvo en el rango nanométrico. Con el Pdl se confirmó que las nanopartículas preparadas por co-molienda fueron distribuidas de manera más homogénea, dando ambas muestras (Keto: EPI- $\beta$ Cd NLC, Keto: EPI-CM $\beta$ Cd NLC) valores de  $0.25 \pm 0.03$ , por otro lado, los productos con el proceso de co-liofilización tienen los valores de entre 0.4 a 0.6. Finalmente, la eficiencia de atrapamiento presentó resultados satisfactorios para todas las muestras, los NLC cargados solo con Keto dio el menor porcentaje de atrapamiento  $43.0 \pm 0.1$  %, mientras que por co-molienda, en la muestra de Keto:EPI- $\beta$ Cd NLC dio  $77.0 \pm 0.5$  % y del Keto:EPI-CM $\beta$ Cd NLC de  $68.7 \pm 0.1$  %, por lo tanto, la eficiencia de atrapamiento del fármaco fue mayor para todos los productos combinados del fármaco-Cd que para el NLC cargado con solo Keto.

Así mismo, por la técnica de diálisis se estudió la liberación del fármaco con NLC, y dichas muestras se analizaron por espectrómetro a 260 nm, determinando la concentración del fármaco, de modo que, con el fin de comparar los resultados, dicho proceso se realizó en los NLC vacíos, con NCL cargados con el fármaco libre, los NLC combinados con los Cd poliméricos obtenidos por mezcla física y por co-molienda. En los perfiles de liberación, entre la liberación del fármaco (Keto) en suspensión y el fármaco en NLC, el que contó con mayor la velocidad de liberación fue el Keto en suspensión dado que para los NLC cargados se requiere mayor tiempo para traspasar la matriz lipídica, además, el Keto en NLC presentó

un aumento constante de la cantidad liberada donde a los 60 min fue 1.4 veces mayor. El producto Keto:EPI- $\beta$ Cd obtenido por co-molienda presentó el aumento más significativo en la velocidad inicial y en el grado de liberación a comparación de los anteriores, en cambio, Keto:EPI-CM $\beta$ Cd por co-molienda mostró un efecto opuesto, siendo el más limitado en el grado de liberación, esto parece estar relacionado con la naturaleza de los derivados poliméricos de ciclodextrina dado que se obtuvo un resultado similar en los productos combinados por mezclas físicas. La mejora en el grado de liberación con Keto:EPI- $\beta$ Cd se le atribuyo a la capacidad humectante hacia el fármaco, así como el efecto solubilizante consecuencia de la complejación del fármaco, por lo tanto, el Keto:EPI- $\beta$ Cd NLC por co-molienda se seleccionó para ser formulado en un hidrogel (Figura 23).

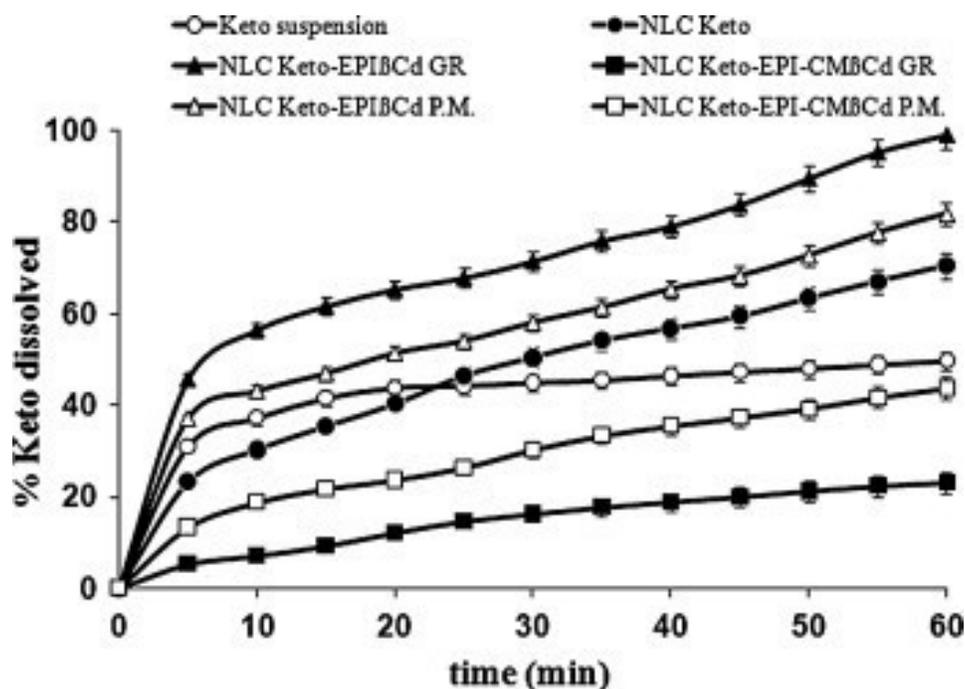


Figura 23. Perfiles de liberación de: Keto en suspensión acuosa del fármaco. NLC cargado con fármaco por mezcla física (PM) o por co-molienda (GR), con EPI- $\beta$ Cd o EPI-CM $\beta$ Cd. Reimpreso, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **80** (1), Cirri M. *et al.* Development of a new delivery system consisting in “drug – in cyclodextrin – in nanostructured lipid carriers” for ketoprofen topical delivery, pp. 46-53, Copyright (2012). Con permiso de Elsevier, <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.07.015>.<sup>[73]</sup>

Así mismo, los hidrogeles se realizaron a base de goma xantana (2 % p/p) como agente formador de gel, el glicerol (5 % p/p) como plastificante y las suspensiones de NLC cargadas con Keto o Keto-EPI- $\beta$ Cd (93 % p/p) bajo agitación a 1000 rpm hasta gelificación, las formulaciones de gel se almacenaron a 4 °C antes de su uso, posteriormente se evaluó del comportamiento reológico en las formulaciones para uso tópico. En las curvas de flujo de los hidrogeles, se presentó un comportamiento plástico con límite elástico en el gel vacío, por otro lado, al incorporar los NLC cargados las curvas de flujo son referentes a un material pseudoplástico, el flujo de las curvas descarto cualquier posible efecto tixotrópico. Además, para un mismo esfuerzo de cizallamiento aplicado, la velocidad de cizallamiento de los geles basados en NLC fue mucho más baja que la del gel en blanco, mostrando un aumento en la viscosidad y en la consistencia del gel por los NLC. Sin embargo, en la capacidad de esparcimiento se presentó una reducción mínima en los geles con NLC a comparación del gel vacío, confirmando así una mayor consistencia, siendo los valores obtenidos para todas las preparaciones con NLC una buena capacidad de esparcimiento.

Finalmente se estudió la penetración *in vitro* de Keto a partir de las formulaciones de gel con NLC, la suspensión Keto:EPI- $\beta$ Cd NLC por co-molienda mostro un aumento significativo en la permeación a comparación del fármaco libre o los obtenidos por mezcla física, dado que se aumentó aproximadamente el doble en la cantidad del fármaco permeado después de 360 min con respecto al gel del fármaco simple y aumento 1.3 veces con respecto al gel con NLC cargado con Keto simple. Además, la presencia simultánea de NLC y EPI- $\beta$ Cd en el gel, en ambos procesos, permitió una mejora adicional en la tasa de penetración del fármaco, efecto que podría atribuirse a la combinación de su capacidad humectante y su solubilidad en los polímeros utilizados. El Keto incorporado a los NLC presento una reducción en la velocidad de liberación del fármaco a comparación de las suspensiones acuosas, además, en las suspensiones complejadas se hizo más notorio esta diferencia, Por lo cual, en las propiedades de permeación a través de la membrana lipófila artificial, la formulación en gel con

Keto:EPI-βCd NLC por co-molienda aumento de manera significativa la velocidad de permeación del fármaco, (Figura 24).

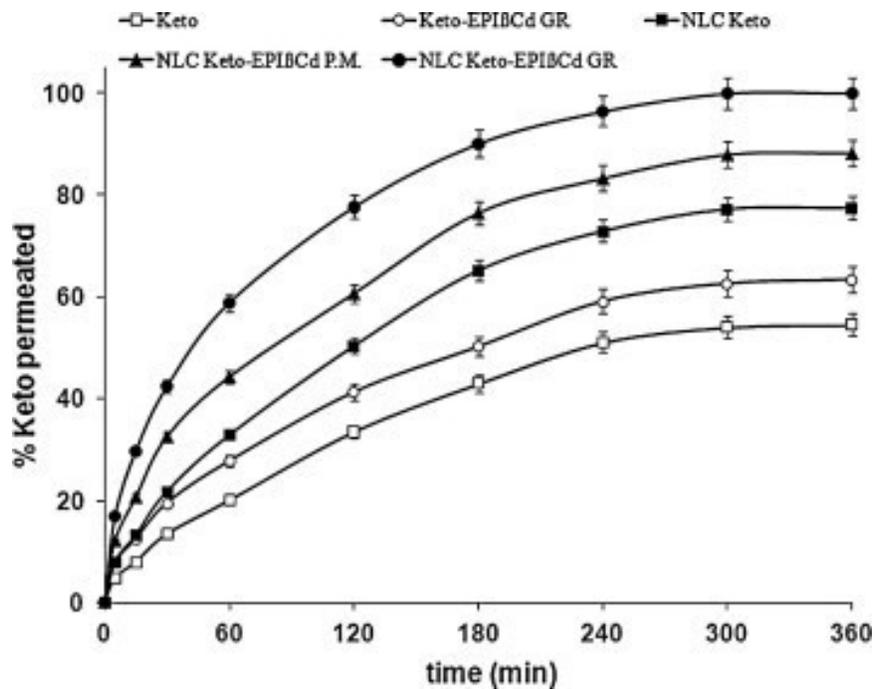


Figura 24. Perfiles de permeación de ketoprofeno de hidrogeles. Reimpreso, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **80** (1), Cirri M. *et al.* Development of a new delivery system consisting in “drug – in cyclodextrin – in nanostructured lipid carriers” for ketoprofen topical delivery, pp. 46-53, Copyright (2012). Con permiso de Elsevier, <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.07.015>. [73]

Así mismo, el mejoramiento de la administración tópica, fue posible por la formación de complejos del fármaco y la carga en los NLC reforzando los beneficios de los vehículos, lo que permitió una mejora tanto en la disolución como en las propiedades de permeación en la piel, además se demostró la importancia de la selección del derivado de Cd y del método de preparación para obtener sistemas de fármaco efectivos, sin embargo, se esperan mayores investigaciones sobre los estudios *in vivo* en voluntarios humanos para verificar la eficacia terapéutica de la formulación del gel cargada.

Por otro lado, se han desarrollado medicamentos antimicóticos capaces de hacer frente a los agentes microbianos responsables de enfermedades superficiales en la piel, sin embargo, al aplicarlos muestran desventajas en solubilidad y

permeabilidad al momento de entrar en contacto, por ello, Datt N. *et al.* presentó la propuesta de desarrollar un gel portador de NCL con griseofulvina, dado que cuenta con la capacidad de utilizarse para el tratamiento de la dermatofitosis, la cual es la tercera enfermedad fúngica más común a nivel mundial. La dosificación tópica de griseofulvina revela complicaciones en su uso por limitaciones de solubilidad y penetrabilidad a las diferentes capas de piel, por lo cual, proponen utilizar los NLC por su facilidad en la preparación, alta capacidad de carga de fármacos y mejoras en su estabilidad. [74]

Evaluaron la solubilidad de griseofulvina, dado que esto es decisivo al seleccionar aditivos para el desarrollo de la formulación por su influencia en la fase oleosa, se comparó el monoestearato de glicerilo, ácido oleico, Pluronic F68, lecitina de soja y aceite de ricino, para ello, la griseofulvina se vertió en un vial, se colocó en baño de agitación por 12 h a 37°C, posteriormente se centrifugo durante 10 min a 10.000 rpm y el sobrenadante se mezcló con los lípidos seleccionados, se filtraron y se analizó por espectrofotómetro UV. La mejor composición seleccionada fue el monoestearato de glicerilo y una combinación de ácido esteárico como lípido-sólido y ácido oleico como lípido-líquido acompañado de surfactante Poloxámero 188 y el co-surfactante Twee-80.

Así mismo, se optimizó los parámetros de la metodología para el desarrollo de NLC que contienen el gel utilizando el diseño de Box-Behnken, donde a partir de las variables independientes que son el monoestearato de glicerilo, la proporción de tensioactivos y el tiempo de sonicación; con las variables dependientes como el tamaño de las partículas, la eficiencia de atrapamiento y la liberación acumulada, se obtuvieron 15 muestras confirmadas. De las cuales se caracterizó el tamaño de partícula, el Pdl, el potencial Z, el porcentaje de atrapamiento del fármaco y la liberación *in vitro*. De los análisis realizados, la formulación optimizada contenía 0.2 % p/p griseofulvina, 2 % GMS, 2 % Pluronic F68 y Tween 80 (en proporción de 1:1), presentó un tamaño de partícula de 209.7 nm, Pdl de 0.237, una eficiencia de atrapamiento de 85.24 % con una liberación de fármaco de 92.12 % y el potencial Z de -44.12 mV, parámetro que al ser mayor a  $\pm 30$  mV es un buen indicador de estabilidad en partículas en suspensión (Figura 25, 26, 27 y 28).

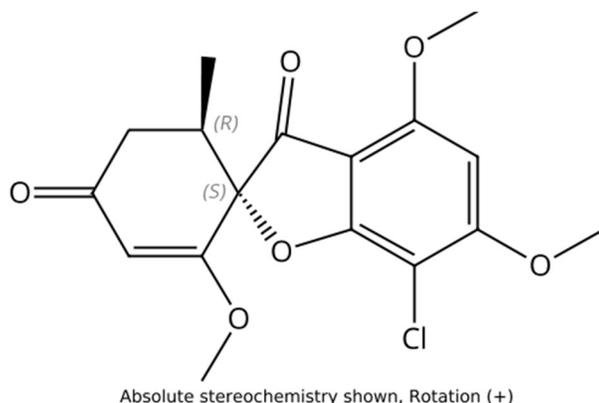


Figura 25. Estructura química de griseofulvina. Reimpreso, *The Journal of Chemical Thermodynamics*, **151**, Zhao X. *et al.* Griseofulvin dissolved in binary aqueous co-solvent mixtures of N,N-dimethylformamide, methanol, ethanol, acetonitrile and N-methylpyrrolidone: Solubility determination and thermodynamic studies, pp. 106250, Copyright (2020). Con permiso de Elsevier, <https://doi.org/10.1016/j.jct.2020.106250>. [76]

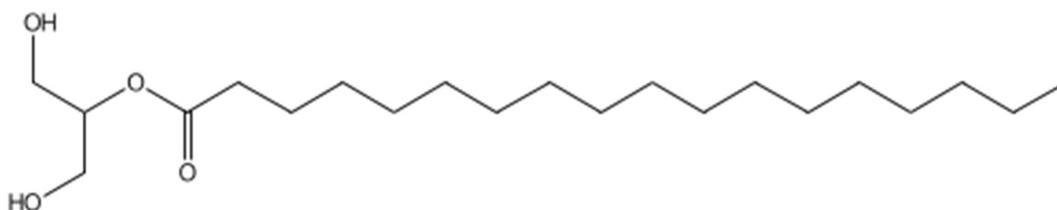


Figura 26. Estructura química del monoestearato de glicerol (GMS). Reimpreso, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **508** (8), Pantoja-Romero W. *et al.* Efficient molecular packing of glycerol monostearate in Langmuir monolayers at the air-water interface, pp. 85-92, Copyright (2016). Con permiso de Elsevier, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.08.016>. [77]

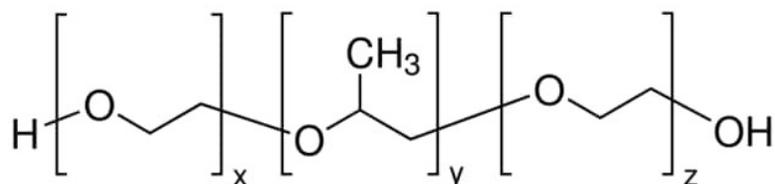


Figura 27. Estructura química del Pluronic F68. Reimpreso, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **112**, Patil S. *et al.* Galangin loaded galactosylated pluronic F68 polymeric micelles for liver targeting, pp. 108691, Copyright (2019). Con permiso de Elsevier, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108691>. [78]

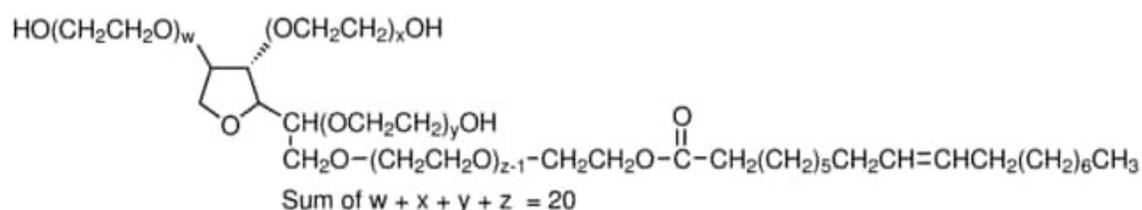


Figura 28. Estructura química del Tween 80. Reimpreso, *Surfaces and Interfaces*, **27**, Mall C. *et al.* Studies of binding of oxazine and thiazine dyes with cetyltrimethylammonium bromide and tween 80 surfactant spectrophotometrically for the photogalvanic cell for solar energy conversion and storage, pp. 101547, Copyright (2021). Con permiso de Elsevier, <https://doi.org/10.1016/j.surfin.2021.101547>.<sup>[79]</sup>

Por SEM se analizó la morfología de la superficie de griseofulvina-NLC de la formulación optimizada, dando como resultado la presencia de nanopartículas esféricas sin cristalización, sin embargo, se observó agregación de partículas por la naturaleza lipídica de los vehículos (Figura 29).

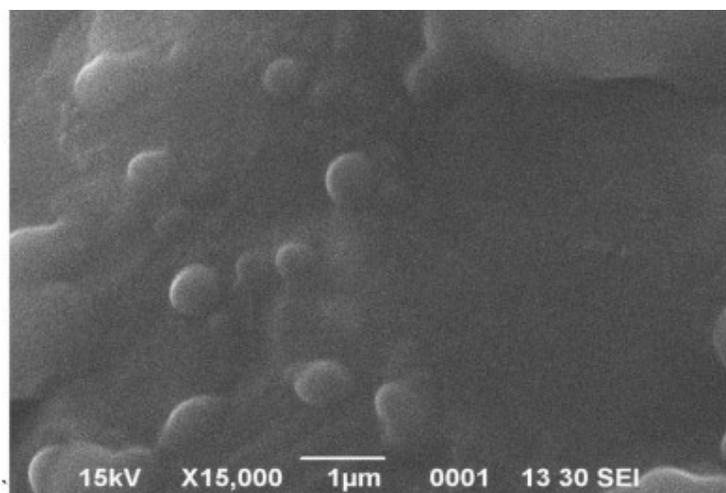


Figura 29. Imagen SEM de NLC optimizado. Reimpreso, *Food Hydrocolloids for Health*, **2**, Datt N. *et al.* Development and characterization of griseofulvin loaded nanostructured lipid carrier gel for treating dermatophytosis, pp. 100074, Copyright (2022). Con permiso de Elsevier, <https://doi.org/10.1016/j.fhfh.2022.100074>.<sup>[74]</sup>

Igualmente, para obtener la consistencia gelificante variaron las concentraciones de Carbopol 940 hasta maximizar sus propiedades físicas y obtener la mayor

capacidad percutánea, por tanto, la concentración elegida fue 1.5 % p/v, posteriormente, se dispersó en agua purificada con 5 % v/v de glicerol para aumentar su hidratación. A continuación, realizaron la caracterización reológica de la dispersión de NLC optimizada con la agregación del agente gelificante a partir de la viscosidad del gel, se registraron lecturas a 10 rpm, 20 rpm, 50 rpm y 100 rpm, dando como resultado que, al aumentar la velocidad de corte, se redujo la viscosidad del nanogel. Para el análisis de liberación de fármacos *in vitro* se utilizó la celda de difusión de Franz, se realizó por espectroscopia UV a 293 nm, dando como resultado valores de liberación del fármacos *in vitro* entre 50 % y 92.24 %, se presentaron dos fases, al inicio es una liberación rápida superficial seguida de la liberación lenta desde el núcleo de las NLC.

Seguido se realizó la prueba de irritación en la piel por el estudio de la membrana corioalantoica del huevo de gallina (HET-CAM), donde los huevos se incubaron por 9 días a 37°C y humedad relativa del  $62 \pm 7.5$  %, en el décimo día se agregó una gota de muestra de prueba en el huevo, se añadió NaOH 0.1 M y en otro NaCl al 0.9 % para ser comparados entre sí, calculando el porcentaje de irritación se encontró que el nanogel cargado con griseofulvina y NaCl al 0.9 % es de 0.069 %, mientras que con NaOH 0.1 M es de 15.23 %. Además, el nanogel cargado con griseofulvina únicamente y con NaCl al 0.9 %, no presentó signos de hemorragia, lisis o coagulación, caso contrario al de NaOH 0.1 M, que si resultó en efectos adversos, finalmente el nanogel cargado con griseofulvina no fue irritante pero si biocompatible en el ensayo HET-CAM (Figura 30).

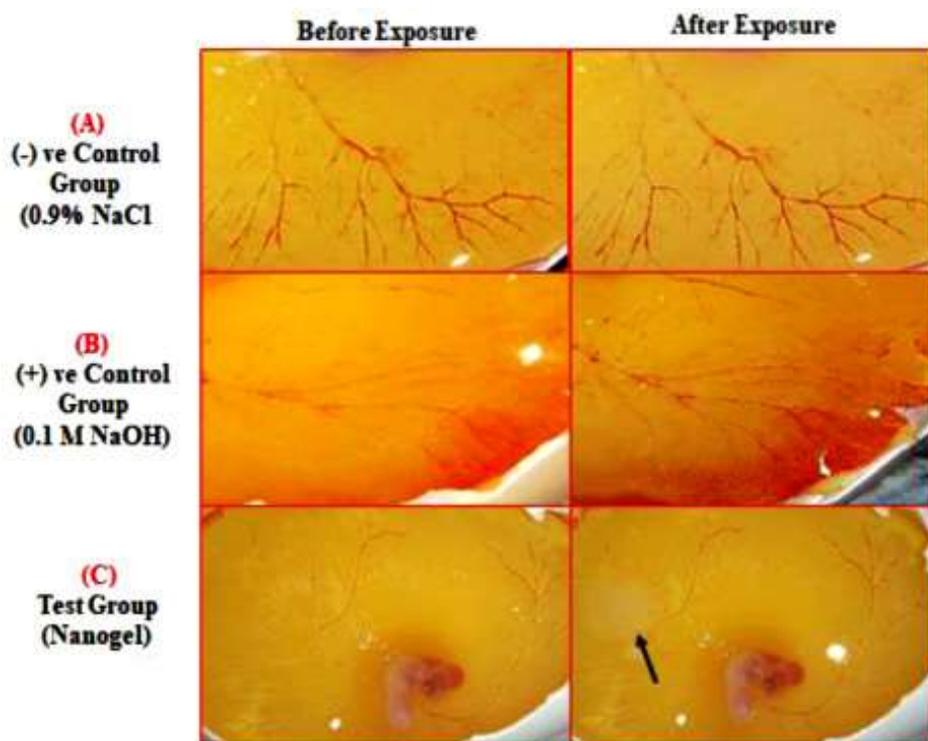


Figura 30. Imágenes del ensayo Het-CAM capturadas antes y después de exposición a (A) NaCl al 0.9 %, (B) NaOH 0.1 M (C) Nanogel cargado con griseofulvina (flecha). Reimpreso, *Food Hydrocolloids for Health*, 2, Datt N. *et al.* Development and characterization of griseofulvin loaded nanostructured lipid carrier gel for treating dermatophytosis, pp. 100074, Copyright (2022). Con permiso de Elsevier, <https://doi.org/10.1016/j.fhfh.2022.100074>. [74]

Así mismo, para el estudio de estabilidad del NLC se almacenó el nanogel cargado con griseofulvina de la formulación optimizada a temperatura ambiente (25 °C) y en refrigeración (4 °C) durante 30 días. Al terminar, los resultados a temperatura ambiente fueron un Pdl de  $0.188 \pm 0.02$ , tamaño de partícula  $113.60 \pm 4.15$  nm, potencial Z de  $-40.64 \pm 0.51$  mV y con eficiencia de encapsulación  $86 \pm 4.89$  %, los cuales todos son menores a lo obtenido inicialmente. En refrigeración, los parámetros que presentaron un aumento fueron el Pdl de  $0.263 \pm 0.03$  y el tamaño de partícula  $243.80 \pm 5.25$  nm, mientras que los parámetros que se redujeron fue el potencial Z  $-38.4 \pm 0.58$  mV y la eficiencia de encapsulación a  $74.2 \pm 3.71$ %, esto mostró que los parámetros no fueron significativos para ser

considerables en la morfología del NLC, por lo tanto, en ambos parámetros no se afectó su estabilidad.

A su vez, el estudio demostró que los NLC contienen características atractivas en medicamentos antimicóticos dado que no presentaron rasgos de irritación o efectos secundarios en la formulación, además, en dichas investigaciones se expusieron mejoras en la estabilidad de los NLC al encontrarse en aumento la proporción de lípidos líquidos a los lípidos sólidos, finalmente se comprobó que el nanogel cargado con griseofulvina de la formulación optimizada mostró una mejora significativa en comparación con el tratamiento estándar, aumentando la eficacia antioxidante del fármaco.

Uno de los estudios más recientes es de Gu L. *et al.* que buscó a partir de un compuesto bioactivo proteger las células y los órganos del daño causado por los radicales libres de oxígeno en el cuerpo y/o los rayos solares proporcionando un efecto antienvjecimiento utilizando la floretina como ingrediente activo. La floretina se ve limitada su aplicación por su baja solubilidad en agua, baja absorción *in vivo* y propiedades inestables, se propuso la encapsulación basada en perlas de hidrogel de NLC, las cuales cuentan con la capacidad de proteger a los bioactivos, dar estabilidad, sin toxicidad, con alta eficiencia de encapsulación y de liberación lenta. [80]

Así mismo, los NLC con florentina se prepararon por el método de homogeneización a alta presión, a partir de monoéster de decaglicérido 6 % p/p y Tween 80 al 6 % p/p, se mezclaron con Span 60 al 2 % p/p y floretina al 0.3 % p/p a 65 °C, por otro lado, para la fase lipídica se utilizó monoestearato de glicerilo (GMS) y el octoato de glicerilo (ODO), se fundieron y se juntó con la fase acuosa (agua desionizada) a 65 °C, se pasó a emulsificación y posteriormente a un homogeneizador de alto cizallamiento, finalmente se dejó enfriar a temperatura ambiente obteniendo la floretina-NLC.

Se midieron las propiedades físicas y químicas de las NLC sintetizadas mediante DLS, el tamaño de partícula promedio de floretina-NLC fue  $137.40 \pm 3.27$  nm y de Pdl  $0.237 \pm 0.005$ , esto indico una distribución de tamaño relativamente estrecha, el potencial Z de floretina-NLC fue  $-21.00 \pm 0.40$ , los valores de potencial Z entre

$\pm 30$  mV se consideran ideales para dispersiones coloidales, además experimentalmente la carga de floretina fue del 0.257 % y la eficiencia de encapsulación del 96.72 %, a su vez, se realizó el análisis TEM en una muestra de floretina-NLC completamente seca para obtener su morfología, los resultados mostraron una forma esférica, no adherente y distribuida uniformemente, características que ayudaron en una liberación prolongada (Figura 31).

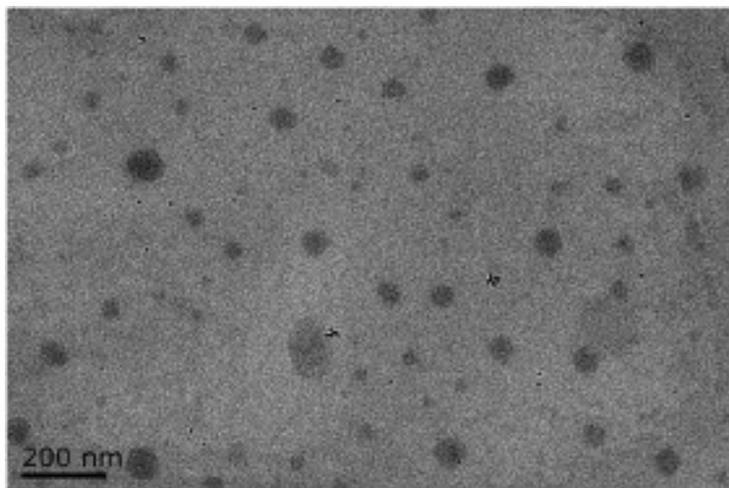


Figura 31. Imágenes TEM de NLC. Reimpreso, *Chemistry and Physics of Lipids*, **356**, Gu L. *et al.* Nanostructured lipid carriers for the encapsulation of phloretin: preparation and in vitro characterization studies, pp. 105150, Copyright (2022). Con permiso de Elsevier, <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2021.105150>.<sup>[80]</sup>

En este sentido, por el método de eliminación de radicales en DPPH (1,1-difenil-2-piridilohidrazinilo), se evaluó la actividad antioxidante de la floretina, comparando a partir de una solución estándar de DPPH, la solución de NLC en blanco, la solución etanol-floretina y de floretina NLC, se midió la absorbancia a 517 nm mediante un espectrofotómetro UV. Se utilizó DPPH dado que es estable su radical con una absorción fuerte a 517 nm, al reaccionar con antioxidantes se presenta una disminución en su absorbancia (Figura 32). En los resultados, al aumentar la concentración de floretina en la muestra, la eficacia de eliminación de radicales se incrementó, siendo la floretina-NLC el que contiene la mayor eficacia de eliminación y por tanto al ser recubierta con NLC se obtiene mejoras en su actividad antioxidante (Figura 33).

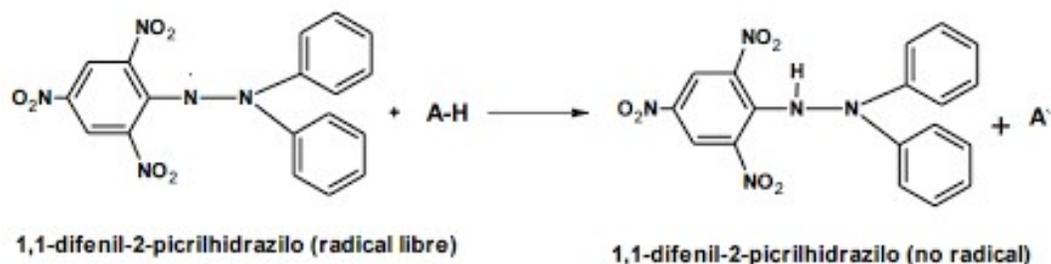


Figura 32. Estructura química del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante (A-H). Reimpreso, *Saudi Pharmaceutical Journal*, **21** (2), Alam M. N. *et al.* Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity, pp. 143-152, Copyright (2013). Con permiso de Elsevier, <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002>. [81]

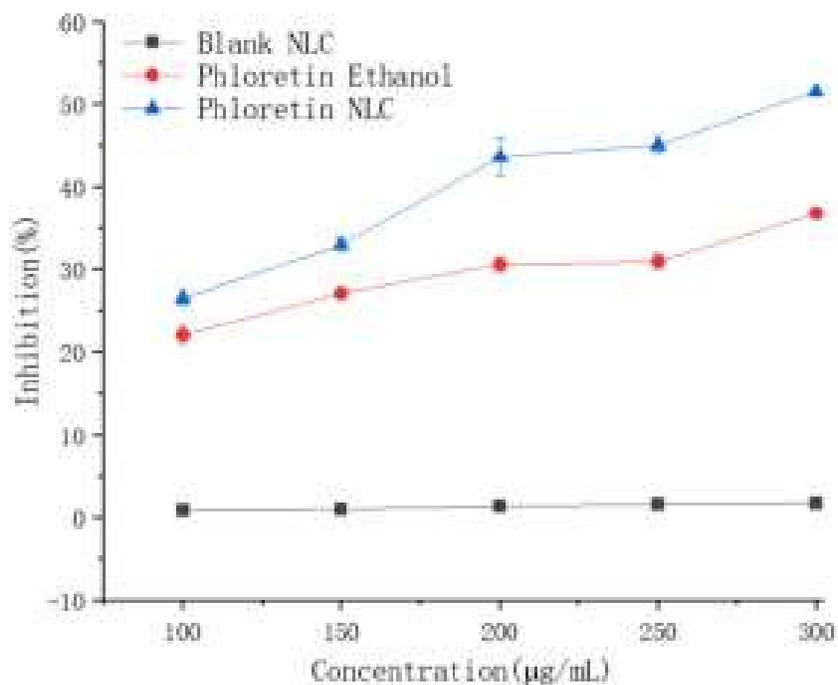


Figura 33. Inhibición de radicales DPPH de NLC en blanco, solución de etanol-floretina, floretina-NLC a varias concentraciones. Reimpreso, *Chemistry and Physics of Lipids*, **356**, Gu L. *et al.* Nanostructured lipid carriers for the encapsulation of phloretin: preparation and *in vitro* characterization studies, pp. 105150, Copyright (2022). Con permiso de Elsevier, <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2021.105150>. [80]

Para el estudio de liberación *in vitro* se empleó el método de la bolsa de diálisis, a partir de una mezcla de PBS, etanol- floretina y floretina-NCL, se colocó en la bolsa con el medio de liberación y se agitó lentamente por 24 h a 37°C; del medio de liberación tomaron muestras durante todo el proceso y se analizaron por espectrofotómetro UV a 280 nm, en los resultados se demostró que la liberación de floretina-NLC tuvo un efecto sostenido mayor, siendo más significativo en comparación con la solución de etanol-floretina, dado que después de la encapsulación se prolongó el tiempo de acción mejorando así como su eficacia (Figura 34).

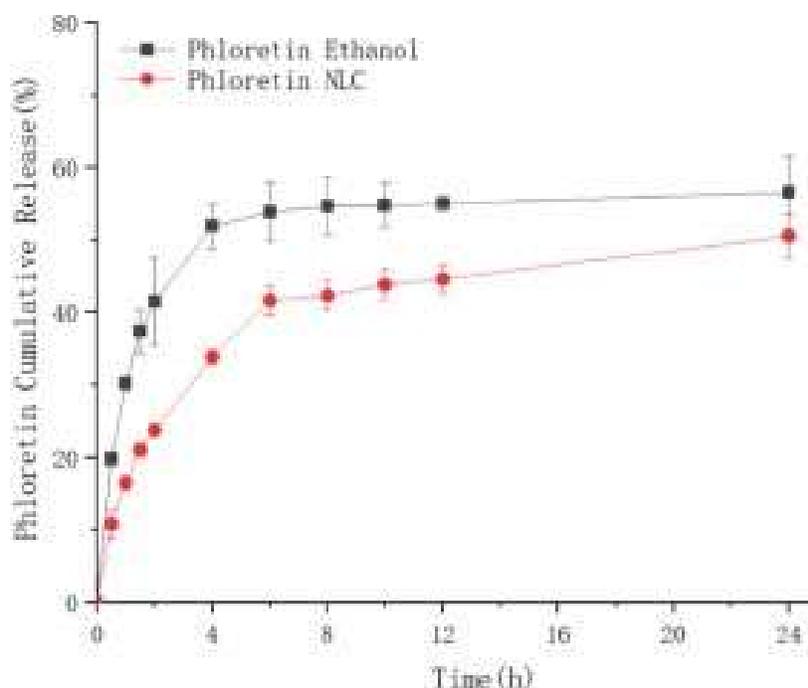


Figura 34. Perfiles de liberación de solución de etanol de floretina y floretina NLC. Reimpreso, *Chemistry and Physics of Lipids*, **356**, Gu L. *et al.* Nanostructured lipid carriers for the encapsulation of phloretin: preparation and *in vitro* characterization studies, pp. 105150, Copyright (2022). Con permiso de Elsevier, <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2021.105150>.<sup>[80]</sup>

Parte importante de la investigación es su estabilidad de almacenamiento, para ello colocaron en una incubadora un vial de vidrio con floretina-NLC por 90 días a 25 °C, se revisó periódicamente su tamaño de partícula, la apariencia, eficacia de atrapamiento y la capacidad de carga. El tamaño de partícula disminuyó al

terminar el almacenamiento, no se presentó inestabilidad como floculación, agregación, gelificación o cambios de color, esto es dado por que la concentración de Tween 80 y Span 60 estabilizaron los NLC, se detectó más del 80 % de floretina en el vial y su eficacia de encapsulación fue mayor al 91 %, por lo tanto, la floretina-NLC tiene una alta estabilidad durante el almacenamiento. Finalmente, se confirmó el empleo de la floretina como ingrediente activo encapsulado a base de perlas de hidrogel de NLC son capaces de mejorar su actividad antioxidante con liberación sostenida *in vitro* mayor a 24 h, además, por su estructura ordenada amorfa se espera una mayor tolerancia con alta eficiencia de encapsulación, capaces de proteger las células el daño causado por los rayos solares proporcionando un efecto antienvjecimiento.

En conclusión, estas investigaciones atienden a las nuevas necesidades en la industria, combinando áreas dermatológicas, medicas o de enfermedades infecciosas cutáneas con el fin de obtener productos que mejoren la la calidad de vida de las personas.

#### 2.4.4 Fullerenos.

El fullereno y sus derivados son nuevas partículas estudiadas para posibles aplicaciones en dermatología y el cuidado de la piel, posee una gran capacidad antioxidante que lo ha convertido en un ingrediente clave para ser utilizado en productos blanqueadores, antienvjecimiento y protección solar. Además, puede penetrar la epidermis y actuar como un vehículo para mejorar la administración de fármacos y agentes activos. Un gran inconveniente es la baja solubilidad de los fullerenos (y sus derivados) en disolventes polares por su estructura molecular, la esfera hidrófoba de los fullerenos tiende a formar agregados en soluciones acuosas y medios biológicos. Son grupos huecos de átomos de carbono con hibridación  $sp^2$ , de los cuales, el fullereno  $C_{60}$  (fullereno prístino) es el más utilizado actualmente por ser el más estable, sin embargo, su estructura molecular también es responsable de su baja o escasa solubilidad en la mayoría de los disolventes, especialmente en medios polares, por ello, se han estudiado modificaciones para aumentar su solubilidad y por tanto su disponibilidad. Las



modificación superficial estable alrededor de fullereno C<sub>60</sub>, mejorando principalmente su solubilidad. Se utilizó dextrano (Dex), dado que es un polisacárido natural con propiedades policatiónicas e hidrófilas con grupos hidroxilo activos, las cuales permiten ajustar las características fisicoquímicas (Figura 36), además, se evaluó su toxicología, la interacción bio-nano y el posible efecto de las nanopartículas de fullereno con Dex-C<sub>60</sub> en las células gliales de rata (C<sub>6</sub>). [85]

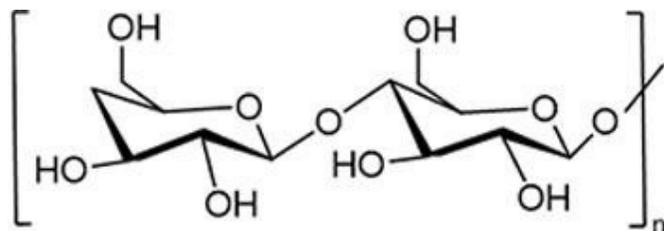


Figura 36. Estructura química de dextrano (Dex). Reimpreso, *Food Research International*, **164**, Xia Z. *et al.* Effects of conjugates of  $\epsilon$ -polylysine-dextran created through Maillard reaction on quality and storage stability of the chicken gel, pp. 112360, Copyright (2023). Con permiso de Elsevier, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112360>. [86]

Por ello, se mezcló los fullerenos C<sub>60</sub> con la solución de Dex (1 mg/mL) proporción molar 1:1, durante 30 min con gas de N bajo agitación continua a 320 rpm, posteriormente se calentó a 65 °C, se realizó la sonicación durante 15 min y se dializó en agua desionizada durante 12 h, obteniendo la suspensión Dex-C<sub>60</sub>, se almacenó a 4 °C y se caracterizó por los análisis de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), TEM y potencial Z. En el análisis TEM, el tamaño de la partícula se encuentra en el rango de 20 nm a 40 nm con forma esférica, se analizó el potencial Z de superficie cuya carga fue -16,9 mV para la funcionalización efectiva y la pureza se verificó por FTIR, se compararon los espectros de fullereno C<sub>60</sub> y dextrano puros con el espectro de Dex-C<sub>60</sub> experimental, se mostraron los picos 524, 574, 1182 y 1427 cm<sup>-1</sup> aportados por fullereno C<sub>60</sub> y los picos 867, 910, 1151 y 3320 cm<sup>-1</sup> de dextrano, por lo tanto, la síntesis del Dex-C<sub>60</sub> fue exitosa (Figura 37).

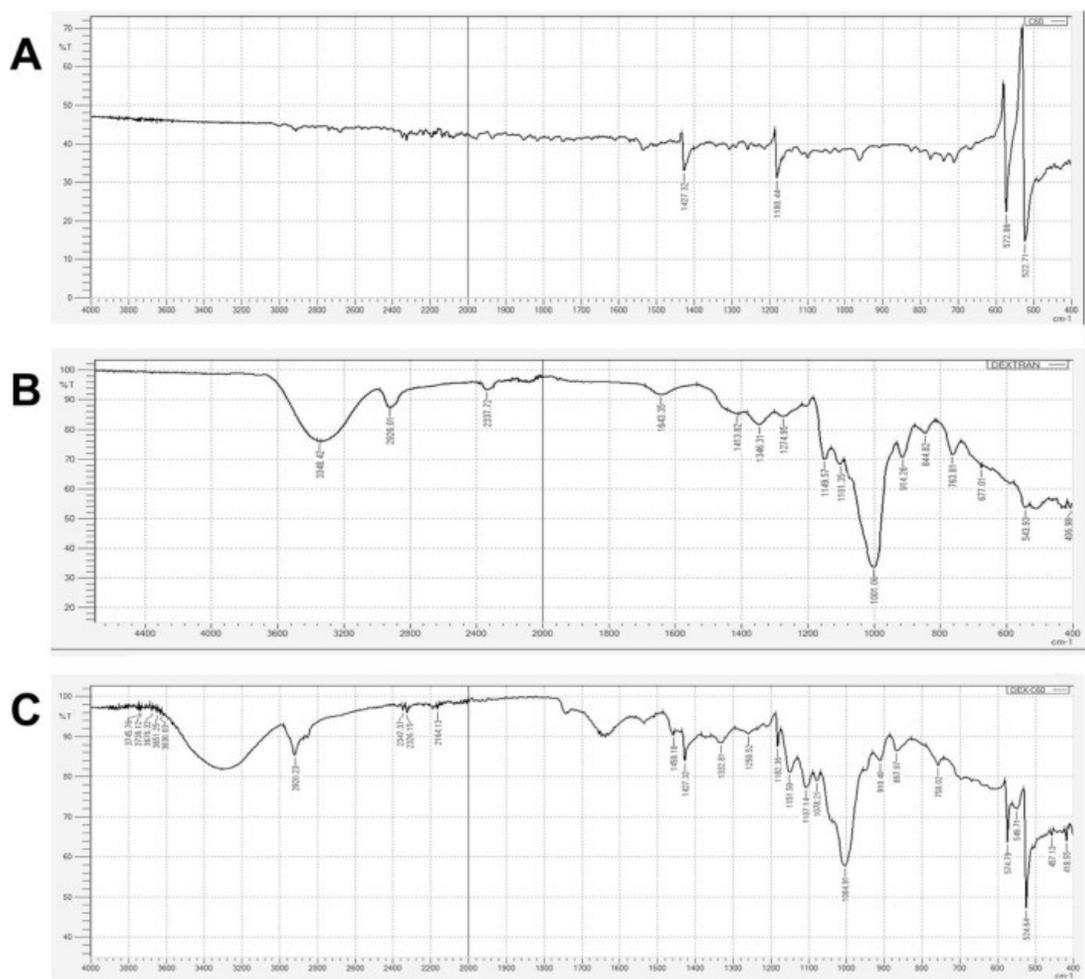


Figura 37. Espectros FTIR de (A) Fullereno C<sub>60</sub> (B) Dextrano y (C) Dex-C<sub>60</sub> con picos característicos. Reimpreso, *Brain Research Bulletin*, **155**, Biby T.E. *et al.* Toxicity of dextran stabilized fullerene C<sub>60</sub> against C<sub>6</sub> Glial cells, pp. 191-201, Copyright (2020). Con permiso de Elsevier, <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2019.11.014>. [85]

Así mismo, se estudió la viabilidad celular de los Dex-C<sub>60</sub> utilizando el ensayo de reducción con MTT en células viables sanas, donde las enzimas oxidorreductasa dependientes de NADPH mitocondrial son capaces de reducir el MTT a formazán de color púrpura, además, se consideró que la viabilidad celular inferior al 70 % tiene un efecto citotóxico, se obtuvo a 25 µg/mL de Dex-C<sub>60</sub> un 87 % de células metabólicamente activas, a 400 µg/mL de Dex-C<sub>60</sub> se redujo la actividad metabólica a 63 % después de 24 h de exposición, por lo tanto, se mostró una reducción decreciente en la viabilidad celular dependiente de la concentración,

para el análisis morfológico se necesitó azul brillante de Coomassie (CBB) como tinte de unión a proteínas y se observó las células por microscopio óptico, las células expuestas a Dex-C<sub>60</sub> no mostraron cambios característicos en la morfología celular en comparación con el control y no presentó cambios en las deformaciones de la membrana celular después de 24 h. Por el ensayo con DCFH-DA se analizó la producción intracelular de ROS generado por la suspensión de Dex-C<sub>60</sub> dentro de las células C<sub>6</sub> y se midió la fluorescencia con un lector de microplacas fluorescentes, dicho análisis funciona gracias a que el tinte DCF (no fluorescente) se vuelve fluorescente en presencia de ROS, la intensidad de la fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de ROS generada dentro de las células, en los resultados se observaron cambios significativos incluso en la concentración más baja (50 µg/mL) de Dex-C<sub>60</sub> utilizada.

El potencial de la membrana mitocondrial se evaluó utilizando el colorante JC1, analizando las células con un microscopio de fluorescencia usando un filtro verde y rojo, la sonda fluorescente tiñe las mitocondrias activas como un orgánulo fluorescente rojo, mientras que la pérdida del potencial de membrana da como resultado la emisión de fluorescencia verde, el los resultados, las concentraciones 50 µg/mL y 100 µg/mL de Dex-C<sub>60</sub> presentaron fluorescencia similar al control rojo, sin embargo, a 200 µg/mL se redujo de manera significativa la fluorescencia roja que indica la pérdida del potencial de membrana mitocondrial (Figura 38), dicho potencial es significativo para la regulación de los niveles de ROS en las células y ayuda a la eliminación de mitocondrias dañadas, además, un potencial de membrana óptimo es necesario para la síntesis de ATP por el ATP sintasa, por lo tanto, al tener una mayor concentración de Dex-C<sub>60</sub> puede inducir estrés oxidativo dentro de las células y ser perjudicial para las mismas.

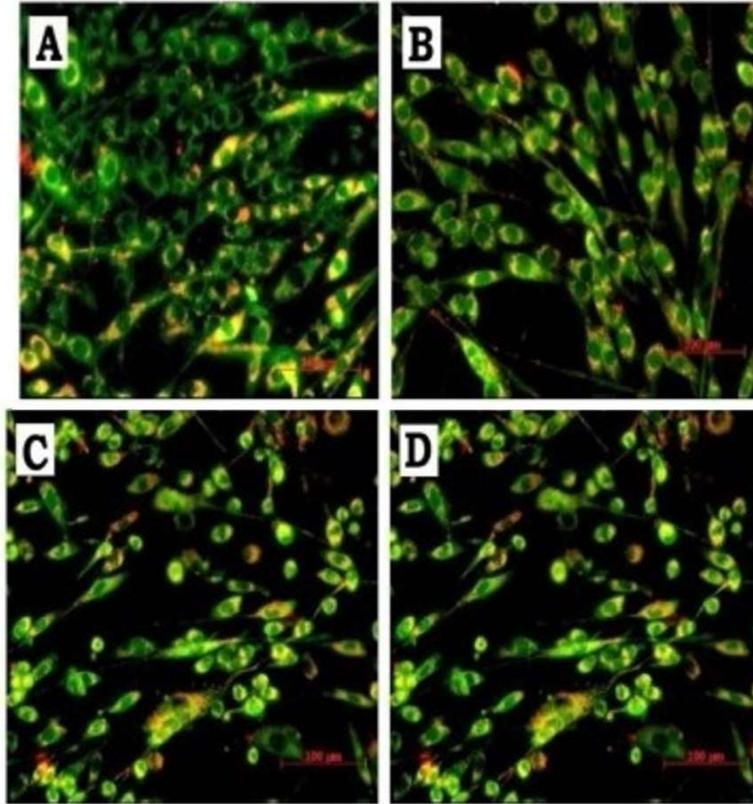


Figura 38. Imágenes microscópicas fluorescentes de células  $C_6$  para la evaluación del potencial de membrana mitocondrial utilizando la sonda JC-1 con Dex-C 60. (A) Células no tratadas, (B) 50  $\mu\text{g/mL}$ , (G) 100  $\mu\text{g/mL}$  y (D) 200  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente (escala de 100  $\mu\text{m}$ ). Reimpreso, *Brain Research Bulletin*, **155**, Biby T.E. *et al.* Toxicity of dextran stabilized fullerene  $C_{60}$  against  $C_6$  Glial cells, pp. 191-201, Copyright (2020). Con permiso de Elsevier, <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2019.11.014>.<sup>[85]</sup>

Se cuantifico por citometría de flujo las células vivas y muertas, analizándose mediante tinción con calceína AM/yoduro de propidio (PI), donde las células vivas convirtieron la calceína a fluorescente verde mediante la enzima esterasa, mientras que el PI tiñó solo las células muertas que han perdido la integridad de su membrana, en los resultados células de control poseen un 18.1 % de muerte celular, las células  $C_6$  tratadas con 50  $\mu\text{g/mL}$ , 100  $\mu\text{g/mL}$  y 200  $\mu\text{g/mL}$  de Dex-C 60 mostraron un 25.2 %, 28.3 % y 33.7 % de muerte siguiendo la misma tendencia los resultados las células vivas, presentando una citotoxicidad dependiente de la concentración de la dosis. Por otro lado, se realizó un ensayo de escalera de ADN

para descubrir la ocurrencia de fragmentación de ADN en células C<sub>6</sub> tratadas con Dex-C<sub>60</sub>, en los resultados las celdas no mostraron escalonamiento con ninguna de las concentraciones de partículas, mostrándose la presencia de ADN intacto, confirmando que Dex-C<sub>60</sub> no indujo ningún efecto genotóxico potente en las células C<sub>6</sub> aunque se encontró un efecto citotóxico dependiente de la dosis.

Finalmente, las nanopartículas Dex-C<sub>60</sub> presentaron resultados prometedores sobre el revestimiento de dextrano que estabilizó eficazmente el material y mejoró su solubilidad en gran medida, demostrando además que las nanopartículas Dex-C<sub>60</sub> penetran más profundamente en las células y provocan respuestas tóxicas celulares dependientes de la dosis, sin embargo, aún es necesario evaluar a profundidad los riesgos sobre su toxicidad para implementar medidas de seguridad adecuadas en su aplicación y su interacción con el medio ambiente.

Al aumentar la producción de los fullerenos por potenciales aplicaciones como antioxidantes, agentes antivirales o vehículos de fármacos, Kyzyma O. A. *et al.* estudió la acumulación de las moléculas de fullerenos en ambientes acuáticos naturales y sistemas biológicos, buscando evaluar la correlación entre el tamaño de agregado del fullereno y la toxicidad en las soluciones, por ello, prepararon por varios métodos suspensiones acuosas de fullerenos C<sub>60</sub> y C<sub>70</sub>. [85, 87]

Uno de los métodos que utilizaron fue preparar las soluciones de fullereno C<sub>60</sub> y C<sub>70</sub> en N-metil-2-pirrolidona (NMP) por agitación durante 6 h a temperatura ambiente (Figura 39), seguido de una dilución con agua destilada en condiciones ambientales durante 10 días, cuya concentración varió entre 0.5 µg/mL a 50 µg/mL, se analizó por espectroscopia UV-Vis. El otro método fue por intercambio de disolventes, para las suspensiones se disolvió los fullerenos (nC<sub>60</sub> y nC<sub>70</sub> respectivamente) en tolueno, seguido se realizó la sonificación por 2 h a 80 °C y se diluyó con agua destilada, nuevamente se sonificó hasta la eliminación completa del tolueno de aproximadamente 170 h, seguido se hirvió, enfrió y filtró, la concentración se determinó mediante la técnica de carbono orgánico, siendo para los fullerenos de 130 µg/mL y del tolueno residual menor a 10 ppb, en la caracterización de las muestras se utilizó la técnica DLS, donde se mostró en el primer método el efecto de NMP que disminuyó significativamente el tamaño de

los agregados, en la solución NMP/nC<sub>60</sub> los fullerenos fueron de un tamaño promedio de 7 nm a 30 nm, en NMP/nC<sub>70</sub> de 8 nm a 40 nm y ambos presentaron un potencial Z de entre -25 mV a -20 mV, por otro lado, en la técnica intercambio de disolventes la suspensión nC<sub>60</sub> mostró un tamaño de 40 nm hasta 100 nm y para nC<sub>70</sub> de 30 nm a 100 nm, a su vez, en todas las soluciones tenía un potencial Z de aproximadamente -35 mV (Figura 40).

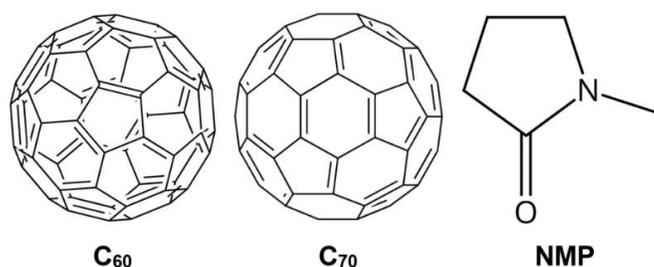


Figura 39. Estructura química del fullereno C<sub>60</sub>, C<sub>70</sub> y NMP (N-metil-2-pirrolidona). Reimpreso, *Thin Solid Films*, **697**, Benatto L. *et al.* Comparing C60 and C70 as acceptor in organic solar cells: Influence of the electronic structure and aggregation size on the photovoltaic characteristics, pp. 137827, Copyright (2020). Con permiso de Elsevier, <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2020.137827>. [88]

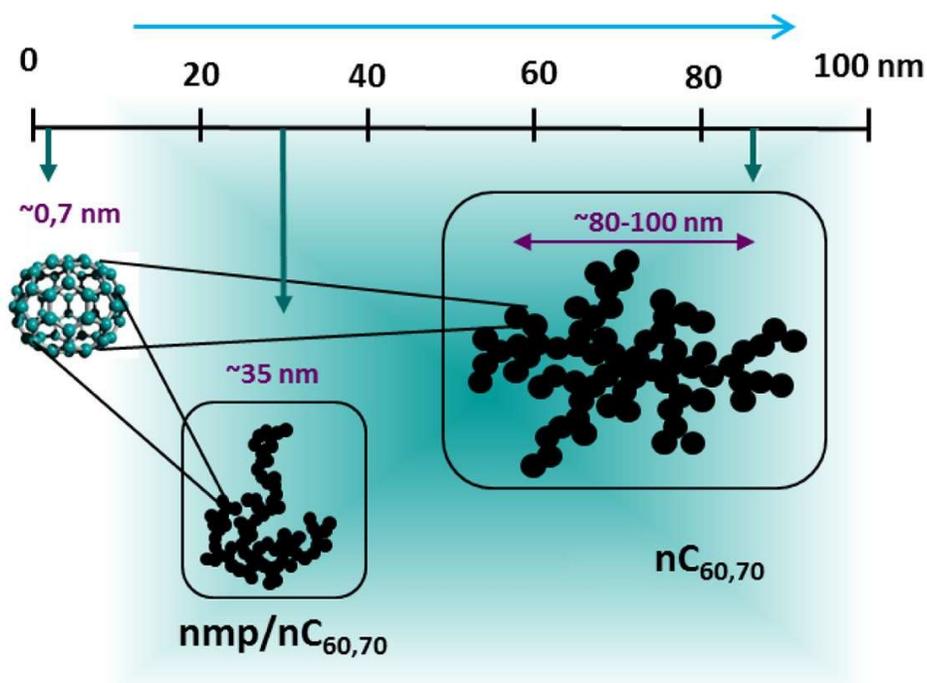


Figura 40. Escala de tamaño promedio de fullereno, NMP/nC<sub>60,70</sub> y nC<sub>60,70</sub>. Reimpreso, *Applied Surface Science*, **483**, Kyzyma O. *et al.* State of aggregation

and toxicity of aqueous fullerene solutions, pp. 69-75, Copyright (2019). Con permiso de Elsevier, <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2019.03.167>. [87]

Así mismo, se varió la salinidad con NaCl al 0.9 %p/v imitando el entorno biológico, por el estudio DLS, las soluciones NMP/nC<sub>60</sub> y NMP/nC<sub>70</sub>, presentaron una disminución en los valores del potencial Z de hasta -11 mV, por intercambio de disolventes las suspensiones mostraron valores más altos de potencial Z en comparación de las soluciones de NMP, con un aumento del tamaño promedio de hasta 103 nm para nC<sub>60</sub> y 85 nm para nC<sub>70</sub>. A partir de las mediciones del potencial Z se sabe que la adición de la sal presentó un efecto más fuerte en las soluciones NMP, siendo estos sistemas menos estables respecto a los de intercambio de disolvente, sin embargo, el tamaño agregado característico en las soluciones NMP es menor, por lo que el tamaño de los agregados dependió del tiempo entre la preparación de la solución primaria con NMP y su dilución en agua. Así mismo, En la caracterización por imágenes AFM todas las soluciones presentaron características de alta polidispersidad de los agregados fullerenos, sin embargo, su tamaño de partícula y cantidad variaron, las soluciones NMP/nC<sub>60</sub> y NMP/nC<sub>70</sub> presentaron tamaños de 10 nm a 20 nm, mientras que en las dispersiones de intercambio de disolventes nC<sub>60</sub>, nC<sub>70</sub> se distinguieron dos fracciones, agregados de 30 nm y asociados a los fullerenos de hasta 200 nm (Figura 41).

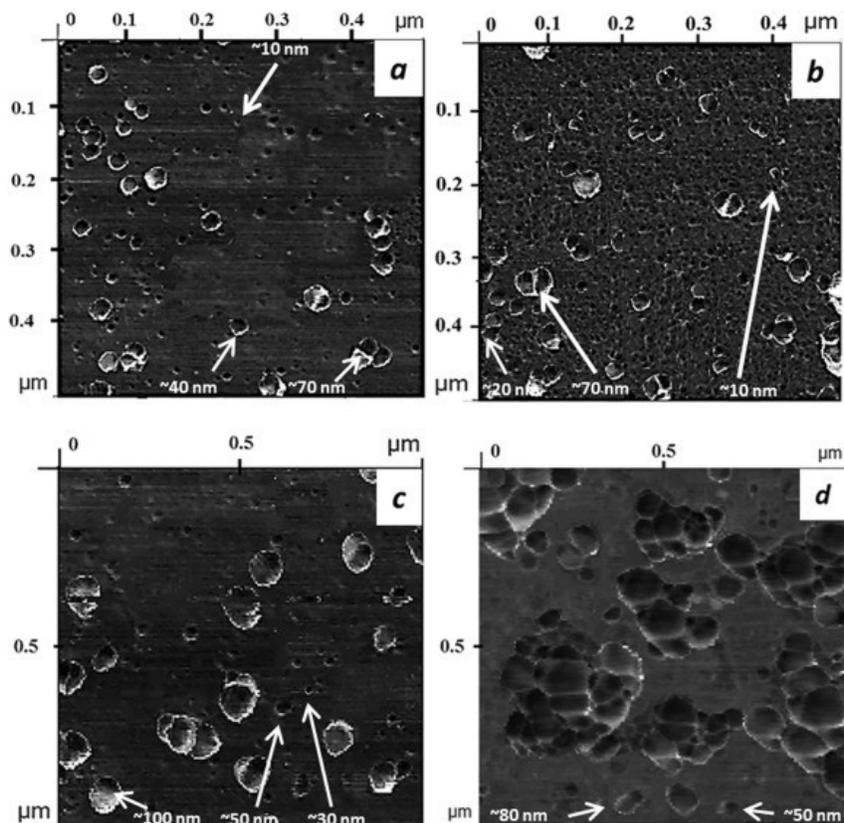


Figura 41. Imágenes AFM de (a) NMP/nC<sub>60</sub>, (b) NMP/nC<sub>70</sub>, (c) nC<sub>60</sub> y (d) nC<sub>70</sub>. Reimpreso, *Applied Surface Science*, **483**, Kyzyma O. *et al.* State of aggregation and toxicity of aqueous fullerene solutions, pp. 69-75, Copyright (2019). Con permiso de Elsevier, <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2019.03.167>. [87]

A su vez, en las pruebas de viabilidad celular se identificó los cambios relacionados con la apoptosis en la permeabilidad de la membrana, esto simulando los agentes dañinos que causan muerte celular, el tinte verde fluorescente YO-PRO-1 no es permeable en células vivas, sin embargo, cuando se inicia el proceso de apoptosis, las células apoptóticas se vuelven permeables y se entintan, en los resultados todas la soluciones a diferentes concentraciones no mostraron cambios en la morfología celular, además, en el caso de la dosis máxima de los aditivos no causó un aumento de apoptosis en el cultivo celular, siendo que el número de células vivas en todos los casos no difirió significativamente del control.

El análisis de citotoxicidad de las soluciones experimentales se realizó por el ensayo MMT, el cual se basa en la capacidad de las células vivas para convertir el

color amarillo soluble (MTT) en cristales intracelulares de formazán de color púrpura-azul insolubles (MTT-f), dando en todas las soluciones de fullerenos a concentraciones de 0.5  $\mu\text{g/mL}$  y 5  $\mu\text{g/mL}$  una respuesta no son tóxica para las células, ya que se mantuvo el mismo nivel de porcentaje de células viables, por otro lado, el aumento en la concentración de NMP/ $\text{nC}_{60}$  y NMP/ $\text{nC}_{70}$  resultó en una disminución constante de células viables, para los fullerenos  $\text{nC}_{60}$  elaborados por intercambio de disolventes tuvo una ligera disminución en la viabilidad sin ser significativa y en  $\text{nC}_{70}$  no presentó ningún efecto, por otro lado, la adición del disolvente NMP puro a 0.005 % v y 0.01 % v en el medio no afectó a la viabilidad celular, mientras que un aumento adicional en la concentración si mostró una viabilidad reducida. Al final, el efecto potencial de ROS era insignificante ya que no se observó un aumento en la muerte celular apoptótica después de la exposición a la luz.

De modo que la síntesis de intercambio de disolventes ha generado mayor interés por que permite concentraciones más altas de fullereno en las soluciones acuosas, sin embargo, las propiedades tóxicas de las soluciones resultantes dependen en gran medida del disolvente orgánico principal, por ello, se realizó su comparación con soluciones de fullereno basadas en NMP, que no se intercambia debido a la miscibilidad con el agua, por lo tanto, se demostró que las soluciones con fullereno obtenidas a partir del intercambio de disolventes tienen una mayor estabilidad coloidal a comparación con las soluciones basadas en NMP, a su vez, el porcentaje límite de NMP es de 0.5 % v por su citotoxicidad, por lo tanto, se puede considerar como un solvente prometedor para producir soluciones acuosas de fullereno en ciertas condiciones. Por último, aun si las dispersiones acuosas de fullerenos no mostraron toxicidad para todas las dosis investigadas, se establece la posibilidad de realizar estudios exhaustivos sobre su acumulación en ambientes acuáticos naturales que ayuden a prevenir desastres que afecten la fauna marina y a los seres vivos.

Se han desarrollado varios métodos para aumentar la solubilidad del fullereno en agua, como preparar soluciones coloidales de dos fases, sintetizar derivados de fullereno o polímeros de fullereno con el fin de promover su comportamiento en

solventes, especialmente en dispersiones acuosas, puesto que, al ser solubles en medios biológicos, presenta excelentes propiedades especialmente las relacionadas con la ingeniería biomédica. [82, 83, 85]

En conclusión, se necesitan mayores investigaciones dado que en los fullerenos se presentan propiedades limitadas y por lo tanto su disponibilidad en los productos se ve afectada, a su vez, son nanomateriales en constante investigación por sus múltiples beneficio descubiertos, sin embargo, falta por mejorar o incluso descubrir nuevas técnicas de síntesis, combinar los conocimientos en diferentes áreas y analizar a profundidad los posibles efectos adversos en el medio ambiente.

## CONCLUSIONES

Se llevó a cabo una investigación bibliográfica extensiva sobre el rol histórico y moderno de los nanomateriales y los polímeros en los productos del cuidado personal, el cual permitió identificar los avances en estos tipos de sistemas y su evolución en función del progreso de las investigaciones científicas.

Se presentó las nuevas tendencias en el uso de los nanomateriales y los polímeros en los productos del cuidado personal, dando paso a nuevas aplicaciones con nanomateriales seguros y renovables enfocados a la innovación.

Se identificó los efectos que han tenido los nanomateriales con los polímeros como materia prima en los productos, cuyos efectos variaron según el nanomaterial investigado, algunos beneficiosos para la piel sin ser perjudiciales, como otros con evidencias en su toxicidad, por lo tanto, el uso de la nanotecnología en los productos del cuidado personal favoreció la seguridad del consumidor.

Se identificó los métodos preparativos y de caracterización más comunes en los nanomateriales y polímeros empleados dentro de los productos del cuidado personal, donde en cada estudio se explicó de manera concisa los procesos experimentales y su aportación en cada investigación.

## REFERENCIAS

- 
- <sup>1</sup> Patil A. *et al.* Polymers for Personal Care and Cosmetics, *ACS Symposium Series*, **1148**, 3-11 (2013).
- <sup>2</sup> European Commission. Regulation N. 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products, *Official Journal of the European Communities*, **342** (2009).
- <sup>3</sup> Gruber J. V. *et al.* Principles of Polymer Science and Technology in Cosmetics and Personal Care, Editorial Marcel Dekker, Estados Unidos, pp. 168-173 (1999).
- <sup>4</sup> CNYN-UNAM, ¿Qué es la nanotecnología?, <https://nanolic.cnyn.unam.mx/sitio/que-es-la-nanotecnologia/> (consultado 25/11/2021).
- <sup>5</sup> Naciones Unidas, Asamblea General (GA), Comisión Brundtland, Our Common Future, pp. 23-24 (1987).
- <sup>6</sup> Gottardo S. *et al.* Towards safe and sustainable innovation in nanotechnology: State-of-play for smart nanomaterials, *NanoImpact*, **21**, 100297 (2021).
- <sup>7</sup> Roberts R. *et al.* Cosmetics marketing & industry trends: a 2020 ecommerce report on the state of online beauty (2020).
- <sup>8</sup> TRADE MAP. Estadísticas del comercio para el desarrollo internacional de las empresas, <https://www.trademap.org> (consultado 25/11/2021).
- <sup>9</sup> Nozaki F. *et al.* Chapter 1. General Aspects of Cosmetics in Relation to Science and Society: Social, Cultural, Science, and Marketing Aspects, *Cosmetic Science and Technology*, **1**, 3-14 (2017).
- <sup>10</sup> Salvioni L. *et al.* The emerging role of nanotechnology in skincare, *Advances in Colloid and Interface Science*, **293**, 102437 (2021).

- 
- <sup>11</sup> Baranowska-Wójcik E. *et al.* Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles Exposure on Human Health-a Review, *Biological Trace Element Research*, **193**, 118-129 (2020).
- <sup>12</sup> Shabbir S. *et al.* Toxicological Consequences of Titanium Dioxide Nanoparticles (TiO<sub>2</sub> NPs) and Their Jeopardy to Human Population, *BioNanoScience*, **11**, 621-632 (2021).
- <sup>13</sup> Samat MH A. *et al.* Hubbard U calculations on optical properties of 3D transition metal oxide TiO<sub>2</sub>, *Results in Physics*, **6**, 891-896 (2016).
- <sup>14</sup> Lyndon N. *et al.* Measurement of TiO<sub>2</sub> Nanoscale Ingredients in Sunscreens by Multidetector AF4, TEM, and spICP-MS Supported by Computational Modeling, *ACS Applied Nano Materials*, **4** (5), 4665-4675 (2021).
- <sup>15</sup> Walters C. *et al.* The Spectrophotometric Analysis and Modeling of Sunscreens, *Journal of Chemical Education*, **74** (1), 99-101 (1997).
- <sup>16</sup> MacNicol A. *et al.* A study of the uptake and biodistribution of nano-titanium dioxide using in vitro and in vivo models of oral intake, *Journal of Nanoparticle Research*, **17**, 66 (2015).
- <sup>17</sup> Athinarayanan J. *et al.* Identification of Nanoscale Ingredients in Commercial Food Products and their Induction of Mitochondrially Mediated Cytotoxic Effects on Human Mesenchymal Stem Cells, *Journal of Food Science*, **80** (2), N459- N464 (2021).
- <sup>18</sup> Sayes C. *et al.* Correlating Nanoscale Titania Structure with Toxicity: A Cytotoxicity and Inflammatory Response Study with Human Dermal Fibroblasts and Human Lung Epithelial Cells, *Toxicological Sciences*, **92** (1), 174-185 (2006).
- <sup>19</sup> Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), In vitro and in vivo observations indicated that TiO<sub>2</sub> NPs can passthrough the biological membranes, entering the cells and accumulating in tissues and organs,

---

*Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, **91**, 1-413 (2010).

<sup>20</sup> Threes G. *et al.* Titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens: focus on their safety and effectiveness, *Nanotechnology, Science and Applications*, **4**, 95-112 (2011).

<sup>21</sup> Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS), Opinion on Zinc oxide (nano form), **1489**, pp. 7-27 (2012).

<sup>22</sup> Iqra R. *et al.* Engineering-safer-by design ZnO nanoparticles incorporated cellulose nanofiber hybrid for high UV protection and low photocatalytic activity with mechanism, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, **9** (5), 1-10 (2021).

<sup>23</sup> Pei-Jia L. *et al.* Analysis of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in cosmetics, *Journal of Food and Drug Analysis*, **23** (3), 587-594 (2015).

<sup>24</sup> O'Keefe S. J. *et al.* ZnO nanoparticles and organic chemical UV-filters are equally well tolerated by human immune cells, *Nanotoxicology*, **10** (9), 1287-1296 (2016).

<sup>25</sup> Gulson B. *et al.* Small amounts of zinc from zinc oxide particles in sunscreens applied outdoors are absorbed through human skin, *Toxicological Sciences*, **118** (1), 140-149 (2010).

<sup>26</sup> Allan J. *et al.* Global Summit on Regulatory Science 2019, Nanotechnology and Nanoplastics, EUR 30195 EN, *Publications Office of the European Union* (2020).

<sup>27</sup> The International Agency for Research on Cancer (IARC), Agents Classified by the IARC Monographs, **1** (132), <https://monographs.iarc.who.int/list-of-classifications/> (consultado 17/02/2022)

- 
- <sup>28</sup> European union observatory for nanomaterials (EUON), Catalogue of cosmetic ingredients 2019, <https://euon.echa.europa.eu/catalogue-of-cosmetic-ingredients> (consultado 29/03/2022)
- <sup>29</sup> Shegokar R. *et al.* Nanobiomaterials in Galenic Formulations and Cosmetics, Editorial William Andrew, Alemania, pp. 69-91, 231-255 (2016).
- <sup>30</sup> Salvioni L. *et al.* The emerging role of nanotechnology in skincare, Editorial Board, Italia, pp. 293 (2021).
- <sup>31</sup> Santos A. C. *et al.* Materials Today Chemistry, Nanotechnology-based sunscreens-a review, **23**, 100709 (2022).
- <sup>32</sup> Müller R.H. *et al.* Intracellular Delivery. Fundamentals and Applications, Editorial Springer, **5**, pp. 411-432 (2011).
- <sup>33</sup> Petersen R. Patente Nanocrystals for use in topical cosmetic formulations and method of production thereof, EP2099420B1 (2006).
- <sup>34</sup> Lizundia E. *et al.* Cellulose nanocrystal based multifunctional nanohybrids, *Progress in Materials Science*, **112**, 100668 (2020).
- <sup>35</sup> Meftahi A. *et al.* Nanocelluloses as skin biocompatible materials for skincare, cosmetics, and healthcare: Formulations, regulations, and emerging applications, *Carbohydrate Polymers*, **278**, 118956 (2022).
- <sup>36</sup> Castro C. F. *et al.* La nanocelulosa: propiedades y aplicaciones Boletín IIE 2016, <https://docplayer.es/60061308-La-nanocelulosa-propiedades-y-aplicaciones.html> (consultado 5/04/2022)
- <sup>37</sup> Shojaeiarani J. *et al.* Cellulose nanocrystal based composites: A review, *Composites Part C: Open Access*, **5**, 100164 (2021).
- <sup>38</sup> Meyabadi T. *et al.* Spherical cellulose nanoparticles preparation from waste cotton using a green method, *Powder Technology*, **261**, 232-240 (2014).

- 
- <sup>39</sup> Awan F. *et al.* Cellulose Nanocrystal–ZnO Nanohybrids for Controlling Photocatalytic Activity and UV Protection in Cosmetic Formulation, *ACS Omega*, **3** (10), 12403–12411 (2018).
- <sup>40</sup> Leão R. M. *et al.* Environmental and technical feasibility of cellulose nanocrystal manufacturing from sugarcane bagasse, *Carbohydrate Polymers*, **175**, 518-529 (2017).
- <sup>41</sup> Zhang Z. *et al.* Cinnamate-Functionalized Cellulose Nanocrystals as UV-Shielding Nanofillers in Sunscreen and Transparent Polymer Films, *Advanced Sustainable Systems*, **3** (4), 1800156 (2019).
- <sup>42</sup> Mendoza D.J. *et al.* Diethyl sinapate-grafted cellulose nanocrystals as nature-inspired UV filters in cosmetic formulations, *Materials Today Bio*, **12**, 100126 (2021).
- <sup>43</sup> Grotekles M. *et al.* Science of Synthesis Knowledge Updates 2010, Editorial Thieme, Alemania, **1**, pp. 285-308 (2010).
- <sup>44</sup> Herzog B. *et al.* Physical properties of organic particulate UV absorbers used in sunscreens: II. UV-attenuating efficiency as function of particle size, *Journal of Colloid and Interface Science*, **276** (2), pp. 354-363, (2004).
- <sup>45</sup> Orsi D. *et al.* Simple Extraction and HPLC Determination of UV-A and UV-B Filters in Sunscreen Products, *Chroma*, **64**, 509–515 (2006).
- <sup>46</sup> Oficina de Publicaciones de la Unión Europea (EUR-OP) Cosméticos más seguros para la ciudadanía de la Unión Europea, Reglamento (CE) N° 1223/2009, pp. 59-209 (2019).
- <sup>47</sup> Thorel E. *et al.* Effect of 10 UV Filters on the Brine Shrimp *Artemia salina* and the Marine Microalga *Tetraselmis* sp, *Toxics*, **8** (2), 29-37 (2020).

- 
- <sup>48</sup> Osterwalder U. *et al.* In vitro and in vivo assessment of UVA protection of sunscreens with traditional actives ZnO and avobenzene and new UV absorbers MBBT and BEMT, *Journal of the American Academy Dermatology*, **50** (3), P135 (2004).
- <sup>49</sup> Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS), OPINION ON 2,2'-Methylene-bis-(6-(2H-benzotriazol-2-yl)-4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl) phenol) (nano form), **1546**, pp. 7-22 (2015).
- <sup>50</sup> Scarpin M. S. *et al.* Effects of UV-filter Photostabilizers in the Photostability and Phototoxicity of Vitamin A Palmitate Combined with Avobenzene and Octyl Methoxycinnamate, *Photochem Photobiol*, **97**, 700-709 (2021).
- <sup>51</sup> Couteau C. *et al.* Tris-biphenyl triazine, a new ultraviolet filter studied in terms of photoprotective efficacy, *International Journal of Pharmaceutics*, **487**, 120-123 (2015).
- <sup>52</sup> Allard D. *et al.* Patente Composiciones que comprende 4-terc-butil-4'-metoxidibenzoilmetano, un derivado de 1,3,5-triazina y un ( $\alpha$ -ciano)- $\beta$ , $\beta$ '-difenilacrilato de alquilo y sus usos, FR9608172 (1996).
- <sup>53</sup> Food and Drug Administration (FDA), Advances new proposed regulation to make sure that sunscreens are safe and effective, <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-advances-new-proposed-regulation-make-sure-sunscreens-are-safe-and-effective> (consultado 23/04/2022)
- <sup>54</sup> Santos B. A. *et al.* Molecular modeling for the investigation of UV absorbers for sunscreens: Triazine and benzotriazole derivatives, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **356**, 219-229 (2018).
- <sup>55</sup> Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS), Opinion on 1,3,5-triazine, 2,4,6-tris[1,1'-biphenyl]-4-yl-, **1429**, pp. 3-52 (2011).

---

<sup>56</sup> Lin Q. *et al.* UV Protection and Antioxidant Activity of Nanodiamonds and Fullerenes for Sunscreen Formulations, *ACS Applied Nano Materials*, **2** (12), 7604-7616 (2019).

<sup>57</sup> Meng-Si W. *et al.* Nanodiamonds protect skin from ultraviolet B-induced damage in mice, *Journal of Nanobiotechnology*, **13**, 35 (2015).

<sup>58</sup> Perevedentseva E. *et al.* Optical Studies of Nanodiamond-Tissue Interaction: Skin Penetration and Localization, *Materials*, **12** (22), 3762 (2019).

<sup>59</sup> Blázquez M. Universidad Complutense de Madrid, Trabajo fin de grado, Nanotecnología en Dermofarmacia, España, pp. 4-11 (2018.)

<sup>60</sup> Caddeo C. *et al.* Effect of resveratrol incorporated in liposomes on proliferation and UV-B protection of cells, *International Journal of Pharmaceutics*, **363** (1-2), 183-191 (2008).

<sup>61</sup> Allaw M. *et al.* Formulation of liposomes loading lentisk oil to ameliorate topical delivery, attenuate oxidative stress damage and improve cell migration in scratch assay, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **144**, 112351 (2021).

<sup>62</sup> Orive, G. *et al.* Biomateriales para promover la protección, reparación y regeneración cerebral, *Nature Reviews Neurociencia*, **10**, 682–692 (2009).

<sup>63</sup> Figueroa-Robles A. *et al.* Encapsulation of phenolic compounds with liposomal improvement in the cosmetic industry, *International Journal of Pharmaceutics*, **593**, 120125 (2021).

<sup>64</sup> Chen-Tan *et al.* Biopolymer-liposome hybrid systems for controlled delivery of bioactive compounds: Recent advances, *Biotechnology Advances*, **48**, 107727 (2021).

<sup>65</sup> Stockert J. C. *et al.* MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets, *Acta Histochemica*, **114** (8), 785-796 (2012).

- 
- <sup>66</sup> Barone A. *et al.* Ammonium glycyrrhizate skin delivery from ultradeformable liposomes: A novel use as an anti-inflammatory agent in topical drug delivery, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **193**, 111152 (2020).
- <sup>67</sup> Katopodi A. *et al.* Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers of natural products as promising systems for their bioactivity enhancement: The case of essential oils and flavonoids, *Colloids & Surfaces A*, **630**, 127529 (2021).
- <sup>68</sup> Suter F. *et al.* Heptapeptide-loaded solid lipid nanoparticles for cosmetic anti-aging applications, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **108**, 304-309 (2016).
- <sup>69</sup> Steiner D. *et al.* Influence of process and formulation parameters on the preparation of solid lipid nanoparticles by dual centrifugation, *International Journal of Pharmaceutics: X*, **3**, 100085 (2021).
- <sup>70</sup> Hong B. *et al.* Kinetics on formation of super water repellent surfaces from phase transformation in binary mixtures of trimyristin and tripalmitin, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **396** (20), 130-136 (2012).
- <sup>71</sup> Soeda K. *et al.* Impact of Poloxamer 188 Material Attributes on Proteinaceous Visible Particle Formation in Liquid Monoclonal Antibody Formulations, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **111** (8), 2191-2200 (2022).
- <sup>72</sup> Fazly-Bazzaz B. *et al.* Solid lipid nanoparticles carrying *Eugenia caryophyllata* essential oil: the novel nanoparticulate systems with broad-spectrum antimicrobial activity, *Letters in Applied Microbiology*, **66**, 506-513 (2018).
- <sup>73</sup> Cirri M. *et al.* Development of a new delivery system consisting in “drug – in cyclodextrin – in nanostructured lipid carriers” for ketoprofen topical delivery, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **80** (1), 46-53 (2012).

---

<sup>74</sup> Datt N. *et al.* Development and characterization of griseofulvin loaded nanostructured lipid carrier gel for treating dermatophytosis, *Food Hydrocolloids for Health*, **2**, 100074 (2022).

<sup>75</sup> Mendes F. S. *et al.* On the diffusion of ketoprofen and ibuprofen in water: An experimental and theoretical approach, *The Journal of Chemical Thermodynamics*, **178**, 106955 (2023).

<sup>76</sup> Zhao X. *et al.* Griseofulvin dissolved in binary aqueous co-solvent mixtures of N,N-dimethylformamide, methanol, ethanol, acetonitrile and N-methylpyrrolidone: Solubility determination and thermodynamic studies, *The Journal of Chemical Thermodynamics*, **151**, 106250 (2020).

<sup>77</sup> Pantoja-Romero W. *et al.* Efficient molecular packing of glycerol monostearate in Langmuir monolayers at the air-water interface, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **508** (8), 85-92 (2016).

<sup>78</sup> Patil S. *et al.* Galangin loaded galactosylated pluronic F68 polymeric micelles for liver targeting, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **112**, 108691(2019).

<sup>79</sup> Mall C. *et al.* Studies of binding of oxazine and thiazine dyes with cetyltrimethylammonium bromide and tween 80 surfactant spectrophotometrically for the photogalvanic cell for solar energy conversion and storage, *Surfaces and Interfaces*, **27**, 101547 (2021).

<sup>80</sup> Gu L. *et al.* Nanostructured lipid carriers for the encapsulation of phloretin: preparation and in vitro characterization studies, *Chemistry and Physics of Lipids*, **242**, 105150 (2022).

<sup>81</sup> Alam M. N. *et al.* Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity, *Saudi Pharmaceutical Journal*, **21** (2), 143-152 (2013).

---

<sup>82</sup> Mousavi S. *et al.* Fullerene nanoparticle in dermatological and cosmetic applications, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, **13** (3), 1071-1087 (2017).

<sup>83</sup> Mikheev I. V. *et al.* Green and rapid preparation of long-term stable aqueous dispersions of fullerenes and endohedral fullerenes: The pros and cons of an ultrasonic probe, *Ultrasonics Sonochemistry*, **73**, 10553 (2021).

<sup>84</sup> Guo K. *et al.* Fullerenes and derivatives as electrocatalysts: Promises and challenges, *Green Energy & Environment*, **7** (6) (2022).

<sup>85</sup> Biby T.E. *et al.* Toxicity of dextran stabilized fullerene C<sub>60</sub> against C<sub>6</sub> Glial cells, *Brain Research Bulletin*, **155**, 191-201 (2020).

<sup>86</sup> Xia Z. *et al.* Effects of conjugates of ε-polylysine-dextran created through Maillard reaction on quality and storage stability of the chicken gel, *Food Research International*, **164**, 112360 (2023).

<sup>87</sup> Kyzyma O. *et al.* State of aggregation and toxicity of aqueous fullerene solutions, *Applied Surface Science*, **483**, 69-75 (2019).

<sup>88</sup> Benatto L. *et al.* Comparing C<sub>60</sub> and C<sub>70</sub> as acceptor in organic solar cells: Influence of the electronic structure and aggregation size on the photovoltaic characteristics, *Thin Solid Films*, **697**, 137827 (2020).