

PRODUCCIÓN Y ANÁLISIS DEL USO DE GLUTATIÓN EN APLICACIONES  
COSMÉTICAS

DEICY P. ORDOÑEZ PEÑA

UNIVERSIDAD ICESI

FACULTAD DE INGENIERÍA, DISEÑO Y CIENCIAS APLICADAS

QUÍMICA FARMACÉUTICA

CALI

2024

PRODUCCIÓN Y ANÁLISIS DEL USO DE GLUTATIÓN EN APLICACIONES  
COSMÉTICAS

DEICY P. ORDOÑEZ PEÑA

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DEL PROGRAMA QUÍMICA  
FARMACÉUTICA

JUAN FERNANDO PINILLOS MADRID, PhD

BRANDON ELI ORTIZ DOMINGUEZ, MSc

CALI

2024

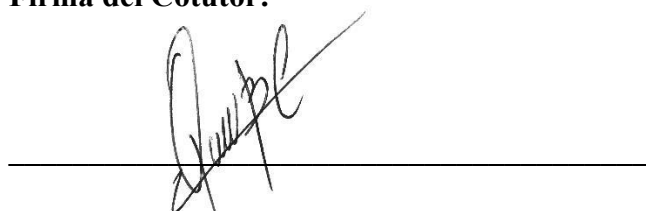
## AVAL PARA LA ENTREGA DE PDG II

**Firma del Asesor:**

A handwritten signature in black ink, written in a cursive style, reading "Juan Fernando Pinillos Madrid". The signature is written above a solid horizontal line.

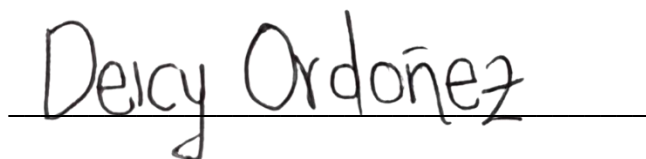
Juan Fernando Pinillos Madrid

**Firma del Cotutor:**

A handwritten signature in black ink, written in a cursive style, reading "Brandon Elí Ortiz Domínguez". The signature is written above a solid horizontal line.

Brandon Elí Ortiz Domínguez

**Firma del estudiante:**

A handwritten signature in black ink, written in a cursive style, reading "Deicy Ordoñez". The signature is written above a solid horizontal line.

Deicy P. Ordoñez Peña

## **Resumen**

Actualmente, existe una creciente necesidad de proteger el medio ambiente debido a los graves problemas derivados de la contaminación. Como respuesta, se han desarrollado diversas estrategias de mitigación, lo que ha generado una alta demanda de productos obtenidos mediante biotecnología. Esta disciplina aprovecha los recursos naturales de forma sostenible, ofreciendo alternativas más respetuosas con el entorno y generando menores emisiones de gases de efecto invernadero, como el dióxido de carbono, en comparación con los métodos tradicionales. Lo anterior, se ha aplicado en diversas industrias con el fin de generar materias primas más amigables con el medio ambiente, dejando de lado métodos tradicionales como la síntesis química y evitando los cultivos tecnificados, que, para abarcar la alta demanda de los productos, son muy extensos, desplazando la biodiversidad nativa de la zona; en la industria cosmética, esta nueva tendencia ha tomado bastante fuerza. Por esta razón, esta investigación se enfoca en desarrollar una micropartícula que haga parte de una potencial formulación cosmética que se use para el cuidado de la piel, utilizando un ingrediente funcional cosmético como el glutatión, el cual será estabilizado en una cápsula de tamaño nanométrico o micrométrico. El objetivo es obtener micropartículas para realizar pruebas de optimización de encapsulado, en donde se evaluará la capacidad de carga de la micropartícula, sus características morfológicas, y evaluar su actividad antioxidante mediante pruebas *in vitro* e *in vivo*, de ser posible en cultivos celulares. Se espera obtener una micropartícula que contiene glutatión, que sea estable y altamente antioxidante que pueda incorporarse en una posible matriz cosmética para el cuidado de la piel.

**Palabras clave:** Antioxidante, producto cosmético, glutatión, nanopartículas, biotecnología.

## 1. Introducción

En las últimas décadas, la industria cosmética ha experimentado una transformación significativa, impulsada por la creciente demanda de productos que no solo sean efectivos, sino que también sean seguros y amigables con el medio ambiente. Los consumidores están cada vez más preocupados por los efectos a largo plazo de los productos que utilizan en su piel, así como por el impacto ambiental que estos productos pueden tener. Este cambio en las preferencias del consumidor ha llevado a la industria a explorar ingredientes naturales y biotecnológicos que puedan cumplir con estas expectativas<sup>1</sup>. En países desarrollados como China, Francia, Alemania y España, se introducen y desarrollan productos amigables con el medio ambiente con base biotecnológica para reducir la contaminación y el uso de productos de síntesis química<sup>2</sup>.

La alta demanda de productos naturales ha impulsado el uso de cultivos tecnificados, intensificando la agricultura y poniendo en riesgo la biodiversidad, especialmente a través de monocultivos y el uso de pesticidas. Para abordar este desafío, la biotecnología se presenta como una solución sostenible para obtener productos naturales. Por ejemplo, permite el cultivo de células vegetales o animales in vitro, haciendo uso de un biorreactor, sin necesidad de extensas tierras ni el uso de químicos agresivos<sup>3</sup>. Además, incluyen técnicas como la fermentación microbiana, la biocatálisis y el cultivo de algas para obtener antioxidantes como vitaminas, biopigmentos y compuestos relacionados<sup>4</sup>.

En la industria alimentaria, los antioxidantes se emplean para prevenir el deterioro de las grasas y los aceites, prolongando la vida útil de los productos. Además, se utilizan como aditivos en los productos alimenticios para mejorar el sabor y el atractivo visual. En el sector cosmético, los antioxidantes se utilizan para proteger la piel del daño oxidativo inducido por los radicales libres usados en productos para el cuidado de la piel por sus propiedades aclaradoras, como en el caso del Glutatión<sup>5</sup>. Incluso, los antioxidantes se utilizan en el ámbito médico por sus atributos terapéuticos y sus posibles ventajas para la salud.

En general, los antioxidantes desempeñan un papel fundamental en múltiples industrias al ofrecer una defensa contra el estrés oxidativo, fomentar la salud y el bienestar en general. En consecuencia, se han introducido en el mercado una variedad de productos antioxidantes que satisfacen las necesidades de los consumidores en diversos aspectos como el cuidado de la

piel, las mejoras dietéticas para contrarrestar los efectos del envejecimiento mediante la lucha contra los radicales libres y las aplicaciones farmacéuticas que incluyen medicamentos para combatir las enfermedades cardiovasculares o neurodegenerativas, entre otros usos <sup>5</sup>.

Por otro lado, el estrés oxidativo se asocia comúnmente con diversas enfermedades crónicas como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas y el envejecimiento<sup>6</sup>. Esto se debe a que los radicales libres causantes de esta condición son moléculas inestables, generalmente se habla de las especies reactivas de oxígeno (ROS), que contienen un electrón desapareado que provoca una búsqueda frenética de interacción con otras moléculas, lo que desencadena en daño a células, proteínas, ADN y lípidos <sup>6</sup>.

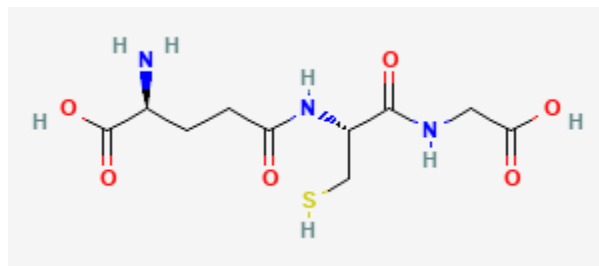
El origen de los radicales libres puede ser endógeno, es decir, que se encuentra en el interior de nuestro cuerpo: gracias al metabolismo aeróbico celular, daño oxidativo por las células fagocíticas, isquemia; o exógeno, por fuera del cuerpo: gracias a radiación ultravioleta (encontrada en los rayos solares), contaminación ambiental, humo de tabaco, pesticidas, etc<sup>7</sup>.

Ahora bien, las especies reactivas de oxígeno como radical anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical óxido nítrico pueden provocar daños en moléculas como el colágeno y la elastina, y favorecer la acumulación de lipofuscina, conocida como el pigmento del envejecimiento<sup>7</sup>.

Lo anterior está relacionado con el mecanismo por el cual se induce a la apoptosis de los queratinocitos y está asociado con la activación de vías de señalización intracelular, como la caspasa 3 y las MAPK, que al final de cuentas pueden provocar la muerte de estas células productoras de queratina, una proteína estructural presente en alrededor del 80 a 95% de la superficie de la piel<sup>8</sup>. Además, el daño en la piel ocasionado por la luz solar da lugar a radicales libres que, al superar los mecanismos de los antioxidantes endógenos, promueven la peroxidación lipídica de las membranas celulares e imposibilitan la correcta replicación y transcripción del material genético<sup>7</sup>. Es decir, imposibilita la regeneración celular, de ahí se deriva la importancia de los antioxidantes.

Uno de los compuestos antioxidantes que ha ganado atención en la industria cosmética es el glutatión, un tripéptido compuesto por los aminoácidos glutamato, cisteína y glicina (ver ilustración 1). Este antioxidante endógeno, es decir, que se encuentra en gran medida en

nuestro cuerpo, ha demostrado ser uno de los más potentes en el ámbito biológico, jugando un papel crucial en la protección celular contra el daño oxidativo, ocasionado por radicales libres <sup>5</sup>. Además de su capacidad para neutralizar ROS, un tipo de radical libre, y ser partícipe de la regeneración de otros compuestos, como la vitamina C, lo convierte en un ingrediente ideal para productos cosméticos diseñados para combatir los signos del envejecimiento y mejorar la salud general de la piel <sup>7</sup>.



**Ilustración 1.** Estructura molecular del glutatión<sup>9</sup>.

El glutatión, sin embargo, presenta desafíos significativos en su aplicación cosmética debido a su inestabilidad cuando se expone a factores como pH (menor a 3 y mayor a 7) y la temperatura (mayor a 60°C) <sup>10</sup>. Además, al ser un fuerte antioxidante, se le debe de proteger de esas condiciones oxidativas presentes en el entorno. Estas condiciones pueden degradar el compuesto, reduciendo su eficacia y, por ende, los beneficios que puede ofrecer a la piel.

Para abordar estos desafíos, se ha recurrido a la nanotecnología, una disciplina que ha revolucionado la forma en que se formulan los productos cosméticos al permitir la encapsulación de ingredientes activos en nanopartículas o micropartículas.

La encapsulación se refiere a un método en el que un compuesto activo se envuelve con uno o más materiales de recubrimiento, formando una estructura similar a una cápsula alrededor del ingrediente activo<sup>11</sup>.

La encapsulación en nanopartículas ofrece varias ventajas. En primer lugar, protege el compuesto activo de la degradación causada por factores ambientales, lo que prolonga la vida útil del producto <sup>12</sup>. En segundo lugar, permite un control más preciso sobre su liberación, asegurando que el compuesto se libere de manera gradual y sostenida en la piel, lo que maximiza su eficacia. En tercer lugar, las nanopartículas mejoran la penetración cutánea del

compuesto activo, permitiendo que una mayor cantidad del compuesto alcance las capas más profundas de la piel, donde puede ejercer sus efectos beneficiosos <sup>13</sup>.

Además, la nanoencapsulación tiene la capacidad para transformar las propiedades sensoriales de los productos. Se llevó a cabo un estudio para evaluar las formulaciones que contienen ácido lipoico nanoencapsulado, centrándose en atributos como la extensibilidad, es decir, la capacidad del producto para expandirse uniformemente en la piel; la adhesión, es decir, la capacidad de incorporarse en la piel; la sensación grasosa y el aroma a azufre. Los resultados indicaron discrepancias significativas en cuanto a la extensibilidad, la adhesión y la viscosidad, por lo que los usuarios prefirieron el no encapsulado. Mientras que en cuestión al olor a azufre y las características residuales se prefirió el ácido lipoico nanoencapsulado, teniendo mayor aceptación por los consumidores. Este estudio subraya el potencial de la nanotecnología para influir en los aspectos sensoriales del producto final <sup>14</sup>.

El uso de la nanotecnología en la cosmética no solo ha mejorado la estabilidad y la eficacia de muchos compuestos activos, sino que también ha abierto nuevas posibilidades para la formulación de productos que sean más sostenibles y respetuosos con el medio ambiente. En este contexto, la biotecnología ha jugado un papel fundamental, permitiendo la producción de glutatión y otros compuestos activos de manera más eficiente y con un menor impacto ambiental <sup>15</sup>. En este sentido, la biotecnología verde, en particular, se ha destacado por su capacidad para reducir el uso de recursos naturales y minimizar la generación de residuos, alineándose con las tendencias actuales hacia la sostenibilidad en la industria cosmética.

El interés por el glutatión en la cosmética ha cogido un gran impulso, su aplicación en la cosmética está respaldada por numerosos estudios que han demostrado su capacidad para inhibir la melanogénesis, reducir el estrés oxidativo y mejorar la apariencia de la piel <sup>16</sup>. Estos efectos son particularmente deseables en productos diseñados para combatir el envejecimiento y mejorar la uniformidad del tono de la piel y en general para productos diseñados para el cuidado de la piel<sup>17</sup>.

Así mismo, se ha descubierto que los antioxidantes tienen efectos fotoprotectores y antienvjecimiento en la aplicación en cosméticos<sup>7</sup>. El glutatión es utilizado en productos para el cuidado de la piel para aclararla, especialmente en el mercado asiático, donde se realizó un ensayo clínico aleatorizado, doble ciego, en Yogyakarta (Indonesia), con 74

mujeres indonesias sanas para evaluar la eficacia y seguridad de los productos cosméticos que contenían glutatión al 0,1 y 0,5%. Los resultados mostraron una piel más clara en el rostro y un aumento significativo en la luminosidad en la segunda semana, especialmente en el grupo que utilizó glutatión al 0,5% <sup>17</sup>.

Lo anterior, se debe a que el glutatión inhibe la actividad de la tirosinasa, una enzima que participa en la producción de melanina, reduciendo así la síntesis de melanina y aclarando potencialmente la piel<sup>16</sup>. Además, el glutatión se ha estudiado por sus efectos antienvjecimiento y antimelanogénicos, y puede estar implicado en la aparición del acné vulgar <sup>18</sup>.

En otro estudio se descubrió que los pacientes con acné vulgar tienen una capacidad antioxidante disminuida, posiblemente debido a una disminución de los niveles de glutatión, especialmente la enzima glutatión peroxidasa. Se encontró que la cantidad de glutatión en el estrato córneo, la capa superior de la piel de los pacientes con acné, fue significativamente menor en comparación con la de los sujetos sanos, lo que sugiere una disminución sistémica de los niveles de glutatión<sup>16</sup>. Se concluye que, los niveles bajos de glutatión están relacionados con la aparición del acné vulgar, por lo que, se es indispensable mantener unos niveles óptimos de antioxidantes, en especial del glutatión.

Con el fin de incorporar el glutatión en una posible matriz cosmética para el cuidado de la piel, se deben tener varias consideraciones mencionadas anteriormente. Entre ellas, definir el tipo de encapsulamiento del ingrediente activo, el cual debido a sus grandes ventajas se hizo de tamaño nanométrico teniendo en cuenta lo que se especificó anteriormente.

El tipo de nanopartícula en el cual se encapsuló el glutatión son los liposomas, debido a que son estructuras que se utilizan como vehículos para la entrega de fármacos, incluyendo su uso en la entrega transdérmica, útil en aplicación cosmética<sup>11</sup>. En un estudio realizado por Ni, Zhang, etc., se prepararon liposomas catiónicos cargados con Undecylenoyl-Phenylalanina (UP) y se modificaron con ácido hialurónico (HA) para mejorar la penetración y retención de la piel. Se observó que los liposomas cargados mostraron un aumento significativo en la penetración dérmica y la retención en la piel comparados con las suspensiones libres de UP <sup>19</sup>. Demostrando así que los liposomas aumentan la penetración dérmica y retención en la piel del ingrediente encapsulado.

Por último, teniendo en cuenta todas las consideraciones anteriores y siguiendo con la premisa de la utilización de biotecnología verde, en este proyecto de grado se buscó, en primer lugar, obtener una nanopartícula liposomal capaz de encapsular el glutatión y poder conservar su actividad antioxidante, posteriormente, optimizar la capacidad de carga y eficiencia de encapsulación de glutatión en la nanopartícula con el fin de medir su actividad antioxidante mediante pruebas químicas o en cultivos celulares, con el fin de poder incorporarlo en una potencial matriz cosmética para el cuidado de la piel.

El desarrollo de este proyecto cosmético ofrece una solución innovadora que podría ser adoptada ampliamente por la industria. La encapsulación del glutatión en nanopartículas permite una mayor versatilidad en su formulación, lo que podría llevar a la creación de una gama más amplia de productos cosméticos basados en este compuesto.

## **2. Metodología**

A continuación, se muestra la metodología utilizada según los objetivos específicos de este proyecto.

### **2.1. Obtener una micropartícula como agente estabilizante de la actividad antioxidante del glutatión.**

Con el fin de crear una nanopartícula liposomal cargadas con glutatión, con una buena capacidad de carga y eficiencia de encapsulación que además logre mantener la actividad antioxidante del glutatión para incorporarlo en una posible matriz cosmética para el cuidado de la piel. Primero se realizó una búsqueda bibliográfica con el fin de encontrar una buena micropartícula que cumpliera con los estándares definidos, por lo que luego de hacer la búsqueda se confirmó el uso de liposomas como micropartícula de tamaño nanométrico, utilizando como agentes encapsulantes principalmente el phospholipon y colesterol.

#### **2.1.1. Diseño experimental 2<sup>k</sup>**

Se planteó un diseño experimental 2<sup>2</sup> en donde se varió únicamente la concentración del agente encapsulante (phospholipon) y el agente encapsulado (glutatión), lo que permitió identificar cuál experimento presentaba mejor distribución del tamaño de partícula y potencial Z, que fueron los parámetros clave que se tuvieron en cuenta para el análisis. Solo

se variaron estas concentraciones debido a que los otros parámetros ya se encontraban estandarizados, ver en la tabla 1.

**Tabla 1.** Diseño experimental 2<sup>2</sup> para la fabricación de liposomas.

<b>Experimento</b>	<b>Concentración de Phospholipon</b>	<b>Concentración de Glutación</b>
1	1 mg/mL	5 mg/mL
2	1 mg/mL	10 mg/mL
3	3 mg/mL	5 mg/mL
4	3 mg/mL	10 mg/mL

### **2.1.2. Metodología de fabricación de los liposomas**

Teniendo en cuenta las condiciones de concentración de cada experimento en la tabla 1, se procedió a preparar las soluciones madre de glutación y phospholipon y sus respectivas diluciones, teniendo en cuenta el protocolo de fabricación de sistemas nano-liposomales recubiertos con polielectrolitos establecido en la Universidad Icesi, con unas modificaciones<sup>20</sup>. Posteriormente, se procede a preparar los liposomas según lo siguiente y a hacer las respectivas mediciones.

#### **2.1.2.1. Preparación de la fase acuosa**

En una balanza analítica se pesaron 100 mg del estándar de glutación y se agregó a un balón aforado de 10 mL. Luego se añadió agua tipo I, se agitó hasta solubilizar y posteriormente se llevó al aforo. Obteniendo una solución de 10 mg/mL de glutación, el cual se rotuló como “solución madre Glutación”. Para el nivel más bajo de concentración se tomó 5 mL de la solución madre y se agregó a un balón aforado de 10 mL, posteriormente se aforó con agua tipo I, obteniendo una solución de 5 mg/mL rotulada como “Glutación 5 mg/mL”.

#### **2.1.2.2. Preparación de la fase orgánica**

En una balanza analítica se pesaron 75 mg de phospholipon y 22,5 mg de colesterol, se agregaron a un balón aforado de 25 mL. Posteriormente, al balón se agregó etanol al 96%, se agitó para solubilizar y posteriormente se llevó al aforo. Obteniendo una solución de 3

mg/mL de phospholipon, el cual se rotuló como “solución madre Phospholipon”. Para el nivel más bajo de concentración, se tomó 8,3 mL de la solución madre y se agregó a un balón aforado de 25 mL, posteriormente se aforó con etanol 96%, obteniendo una solución de 1 mg/mL rotulada como “Phospholipon 1 mg/mL”.

### 2.1.3. Preparación de liposomas

Con ayuda de una micropipeta de 1000  $\mu$ L se tomaron 1000  $\mu$ L de las soluciones correspondiente según la tabla 1. Es decir, para el experimento 1, se tomó 1 mL de la solución de glutatión 5 mg/mL y un mililitro de la solución de phospholipon 1 mg/mL y se agregaron a un tubo de ensayo debidamente rotulado como “Experimento 1 Repetición 1”.

Luego, se tomó esa mezcla y se inyectó al dosificador de agujas (ver ilustración 2), al cual se le indicó un flujo de inyección de 1 mL/min. En el otro extremo del dosificador, se depositó un beaker de recolección debidamente rotulado como “Experimento 1 Repetición 1”, que tenía en su interior 18 mL de agua tipo I y un magneto que giraba gracias al agitador magnético, configurado a unos 360 rpm.

Posteriormente, se llevó la solución con una concentración de liposomas 2/20 mL a maduración en constante agitación por 30 min. Lo anterior, se repitió para el experimento rotulado como “Experimento 1 Repetición 2” y así hasta completar los 4 experimentos y su respectiva repetición.



**Ilustración 2.** Montaje con dosificador de aguja y plancha de agitación.

### 2.1.4. Medición de Potencial Z y tamaño de partícula

Luego de obtener los liposomas, se procedió a hacer un análisis utilizando el equipo Zetasizer para determinar el tamaño de partícula de cada experimento y repetición que se hizo. Lo anterior, con el fin de determinar que experimento mostraba mejores resultados y replicarlo

para alcanzar el objetivo número dos de este proyecto: optimización de la eficiencia de encapsulación y capacidad de carga de la nanopartícula.

#### **2.1.5. Análisis estadístico: superficie de respuesta del diseño experimental 2<sup>2</sup>**

Una vez obtenidos los resultados del Zetasizer, se aplicó un análisis de superficie de respuestas con los datos haciendo uso del programa R Studio con el fin de determinar la relación entre una o más respuestas, en este caso Potencial Z y tamaño de partícula, y las variables independientes que las determinan, es decir, la concentración de phospholipon y glutatión. El objetivo de la superficie de respuesta es encontrar las condiciones óptimas de operación de un sistema para optimizar las respuestas<sup>21</sup>. Luego de realizar el análisis se concluyó que el experimento que mejor respuesta tuvo fue el número 4, que contiene las concentraciones más altas de los componentes de la matriz liposomal, glutatión 10 mg/mL y phospholipon 3 mg/mL. Con lo anterior, se da por culminado el primer objetivo.

#### **2.2. Optimización de la eficiencia de encapsulación y capacidad de carga de la nanopartícula**

Una vez identificado las condiciones o variables independientes que obtuvieron mejor respuesta, en este caso el experimento número 4. Se elaboró nuevamente con el fin de controlar aún más los parámetros clave para poder determinar la capacidad de carga y eficiencia de encapsulación haciendo uso de las mismas condiciones y equipos especificados en el apartado 2.1.2.

Lo anterior, con el fin de cuantificar la concentración del glutatión libre, luego de separarlo de los liposomas y poder hacer una cuantificación indirecta del glutatión que se encapsuló dentro de los liposomas. Y así finalmente determinarlos.

##### **2.2.1. Metodología de preparación de liposomas mejorados**

Aquí se tuvo en cuenta la pureza del estándar (97%) con el que se ha trabajado en el transcurso de todo el proyecto y se hizo ajuste por peso. Por lo que, si se necesitan pesar 100 mg reales de glutatión, entonces se pesaron 103,1 mg de glutatión estándar del 97%. Se intentó hacer nuevamente por duplicado el experimento #4, sin embargo, el dosificador de

aguja falló, generando fugas por lo que solo se tuvo una repetición. Luego, se siguió el mismo procedimiento detallado en el apartado 2.1.2.

### 2.2.2. Ultrafiltración

Luego de obtener los liposomas, se procedió a montar el acoplamiento necesario para llevar a cabo la de la solución con el fin de separar el glutatión encapsulado del no encapsulado. El montaje consistió en una bomba que proporciona el vacío (40 psi) conectada a un equipo de ultrafiltración que lleva en su interior una membrana de 10 kDa, por lo que deja pasar partículas de aproximadamente 10 nm. El anterior procedimiento se llevó a cabo en constante agitación a 300 rpm (ver ilustración 3). Dentro del beaker de recolección se encuentra el glutatión que no se encapsuló dentro de los liposomas, por tanto, se obtuvieron los liposomas purificados. Se midió el volumen total que se obtuvo y se determinó la concentración total de glutatión 100 mg/44 mL, es decir, 2,27 mg/mL.



**Ilustración 3.** Montaje de Ultrafiltración

### 2.2.3. Cuantificación de glutatión mediante Uv

Con el fin de identificar cuántas moléculas de glutatión lograron ser encapsuladas por los liposomas. Se llevó a cabo una reacción para poder hacer el análisis bajo un espectrofotómetro ya que no se puede cuantificar el glutatión por este medio sin un tratamiento previo. Para ello se usó la siguiente metodología.

#### 2.2.3.1. Elaboración de curva de calibración del estándar

En primer lugar, se hizo una solución madre a partir de glutatión estándar 97% de pureza con una concentración de 2000 ppm en 100 mL. Para ello, en una balanza analítica se pesaron 206,2 mg haciendo la corrección por pureza y se llevó a un balón aforado de 100 mL para aforar con agua tipo II. De esta solución madre se tomaron los volúmenes correspondientes de la tabla 2, según el nivel de la curva y se llevaron a un balón de 10 mL.

Posteriormente, se llevó al aforo con agua tipo II, es decir, para el nivel 1, con una concentración de glutatión de 100 ppm, se tomaron 500  $\mu\text{L}$  con ayuda de una micropipeta de 1000  $\mu\text{L}$  y se trasvasó a un balón de 10 mL para luego aforar con agua tipo II.

**Tabla 2.** Curva de calibración para estándar glutatión

<b>Nivel</b>	<b>Concentración glutatión (ppm)</b>	<b>Volumen de solución madre (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
<b>1</b>	100	500
<b>2</b>	300	1500
<b>3</b>	500	2500
<b>4</b>	700	3500
<b>5</b>	900	4500

Lo anterior se hizo por triplicado, por lo que se obtuvieron 15 balones aforados de 10 mL correspondientes a cada nivel de la curva y sus repeticiones.

#### **2.2.3.2. Reacción para cuantificar en el espectrofotómetro**

Para ello, se siguió el siguiente protocolo. En primer lugar, a los 15 tubos de ensayo, debidamente rotulados con el nivel de la curva y la repetición correspondiente, se añadió 1 mL de Buffer fosfato 0,4 M (pH 8) a todos los tubos. Posteriormente, se adicionaron 2 mL de la muestra correspondiente y por último 1 mL de Alloxán al 1%. Es decir, en el tubo rotulado como “Nivel 1 repetición 1” se añadieron 2 mL del balón aforado rotulado como “Nivel 1 repetición 1”. Así para todos los casos.

Una vez adicionado el reactivo Alloxán, los tubos de ensayo se llevaron a agitar en un sheaker por 20 min a 150 rpm. Luego de cumplir este tiempo de reacción, se adicionó 1 mL de NaOH 1 N para finalizar la reacción y fijar el producto. Posteriormente, se realizó una siguiente dilución, tomando 500  $\mu\text{L}$ , con ayuda de una micropipeta de 1000  $\mu\text{L}$ , de cada una de las muestras y se trasvasaron nuevamente a un balón de 10 mL. Para finalmente, leer a 320 nm en el espectrofotómetro. Así para todos los casos.

#### **2.2.3.3. Cuantificación de glutatión no encapsulado**

Para la preparación de la muestra, se hizo una solución madre de 500 ppm. Para ello, se tomaron 500  $\mu\text{L}$ , con ayuda de una micropipeta de 1000  $\mu\text{L}$ , de la solución de glutatión no encapsulado obtenida en el apartado 2.2. con una concentración de 10 mg/mL o 10000 ppm. Estos 500  $\mu\text{L}$  se depositaron en un balón aforado de 10 mL, el cual se llevó al aforo con agua tipo II. Se rotuló como “muestra repetición 1” y se hizo el mismo procedimiento con el fin de tener otra repetición.

#### **2.2.3.4. Reacción para cuantificar en el espectrofotómetro**

Una vez obtenida esta solución, se realizó el mismo tratamiento que para el estándar, expresado en el apartado 2.2.3.2. Posteriormente, se llevó a leer en el espectrofotómetro a 320 nm sin ninguna dilución adicional.

### **2.3. Evaluación de la actividad antioxidante de las micropartículas por métodos químicos**

El diseño general del análisis para medir la actividad antioxidante del glutatión y los liposomas cargados con glutatión es el siguiente. En primer lugar, se toma la solución madre del analito, ya sea glutatión estándar, trolox o liposomas para generar una curva stock y poder tomar un volumen fijo de cada nivel para servirlo en la placa junto con el DPPH. Por tanto, habrá una concentración distinta en la placa que en la curva stock encontrados en los tubos eppendorf. Se tomaron 60  $\mu\text{L}$  de la curva stock de las muestras para servirlo en la placa y 140  $\mu\text{L}$  de DPPH con el fin de determinar el  $\text{IC}_{50}$  y los equivalentes trolox del glutatión estándar y los liposomas. Lo anterior basado en el siguiente protocolo de la Universidad Icesi.

#### **2.3.1. Curva de calibración**

En primer lugar, se establecieron 7 niveles para la curva de calibración como se observa en la tabla 3. Esta concentración corresponde a la que se encuentra en el pozo, útil para hacer los cálculos correspondientes, luego de la adición de los 60  $\mu\text{L}$  de la muestra y los 140  $\mu\text{L}$  de DPPH 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , es decir, un volumen total de 200  $\mu\text{L}$ .

**Tabla 3.** Curva de calibración para medir la actividad antioxidante de glutatión, trolox y liposomas.

<b>Nivel</b>	<b>Concentración de analito (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>
<b>1</b>	4,69
<b>2</b>	9,38
<b>3</b>	18,75
<b>4</b>	37,50
<b>5</b>	75,01
<b>6</b>	150,01
<b>7</b>	300,03

### **2.3.1.1. Preparación de solución madre**

#### **2.3.1.1.1. Glutatión estándar**

Se preparó una solución madre de 1000  $\mu\text{g/mL}$  con un volumen total de 4 mL. Entonces se pesaron 4 mg y se trasvasó a un tubo eppendorf de 15 mL. Con ayuda de una micropipeta de 1000  $\mu\text{L}$  se tomaron 4 mL de Etanol al 50%, posteriormente se agitó para solubilizarlo y se rotuló como “solución madre glutatión”.

#### **2.3.1.1.2. Trolox**

Se repitió el mismo procedimiento expuesto en el apartado anterior 2.3.1.1.1 para el trolox grado estándar, utilizando como diluyente el etanol al 96%.

#### **2.3.1.1.3. Liposomas**

Se tomaron 1,762 mL con ayuda de una micropipeta de 1000  $\mu\text{L}$ , de la solución de liposomas que presentaba una concentración de 2270  $\mu\text{g/mL}$ , y se trasvasaron a un tubo eppendorf de 15 mL. Posteriormente, se tomaron 2,238 mL de Etanol 50% y se adicionó para completar un volumen final de 4 mL. Se rotuló como “solución madre liposomas”.

### 2.3.2. Desnaturalización de liposomas

A esta solución se le tuvo que hacer un tratamiento previo para destruir los liposomas y que pudiera desprenderse el glutatión y ejercer su actividad antioxidante ya que en un ensayo previo no se observó actividad. Para ello, se tomó 1 mL de Etanol al 96% y se agregó a la solución madre, la cual tenía en su interior 2 mL debido al ensayo previo. Luego de agregarse el etanol se procedió a llevar al ultrasonido por 5 min.

### 2.3.3. Preparación de la solución de DPPH

Se pesaron 7,143 mg de DPPH en una balanza analítica, se llevó a un balón aforado de 50 mL y se agregó aproximadamente 25 mL de Etanol al 96%. Posteriormente, se llevó al ultrasonido por 5 min con el fin de que se solubilizara completamente para luego llevar al aforo. Con ello, se tiene una solución de 100 ppm o  $\mu\text{g/mL}$ .

### 2.3.4. Curva de calibración stock

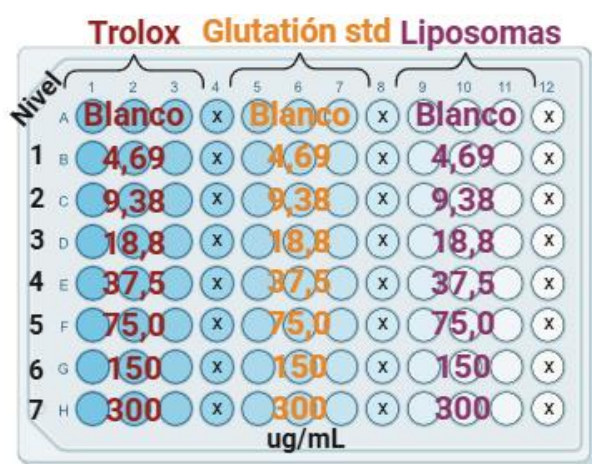
Con el fin de obtener la concentración establecida en la tabla 3, se planteó realizar una curva de calibración stock de la cual se deriva de las soluciones madres. Con el objetivo de tomar un volumen establecido para todos los pozos y sus niveles. Para ello, se tomó el volumen correspondiente de la solución madre, según la tabla 4. Luego, se llevó a tubos eppendorf de 2 mL y se completó con el volumen de diluyente, en este caso etanol al 50% hasta completar 1 mL.

**Tabla 4.** Curva de calibración stock

Nivel	Concentración del analito ( $\mu\text{g/mL}$ )	Volumen de solución madre ( $\mu\text{L}$ )	Volumen de diluyente ( $\mu\text{L}$ )
1	15,625	15,6	984,4
2	31,25	31,3	968,7
3	62,5	62,5	937,5
4	125	125	875
5	250	250	750
6	500	500	500
7	1000	1000	0

### 2.3.5. Diseño de la placa

Una vez obtenida la curva stock, se procede a servir la placa, teniendo en cuenta la ilustración 4. En donde el blanco se trató de una mezcla de 60  $\mu\text{L}$  de etanol al 50% y 140  $\mu\text{L}$  de etanol al 96% para todas las muestras, es decir, trolox, glutatión estándar y liposomas. Cada análisis se hizo por triplicado con el fin de tener mayor significancia estadística. En el caso de la muestra se toman 60  $\mu\text{L}$  del nivel correspondiente y se sirvió por triplicado. Luego de servir todos los pozos de muestra, se agregó rápidamente 140  $\mu\text{L}$  de DPPH para que no se altere significativamente el reactivo con la exposición a la luz.



**Ilustración 4.** Diseño de la placa para el análisis de actividad antioxidante.

### 2.3.6. Reacción entre DPPH y muestra

Tan pronto servida la placa, se llevó a incubar en un horno a 37°C por mínimo 20 min. Por último, la placa se llevó a leer inmediatamente en el lector de placas a una temperatura del horno a 37°C y 515 nm.

## 3. Resultados y discusión

A continuación, se muestran los resultados obtenidos según los objetivos específicos de este proyecto.

### 3.1. Obtener una micropartícula como agente estabilizante de la actividad antioxidante del glutatión.

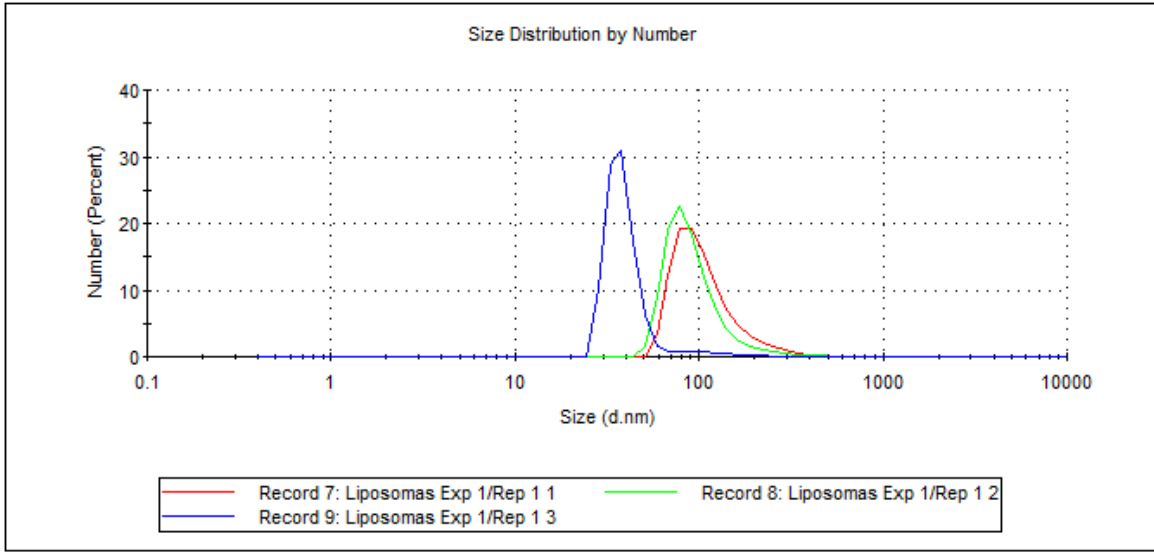
Como se especificó anteriormente en la metodología, en este apartado se realizó un diseño experimental  $2^2$  que se examinó bajo R Studio en un análisis de superficies.

### 3.1.1. Potencial Z y tamaño de partícula

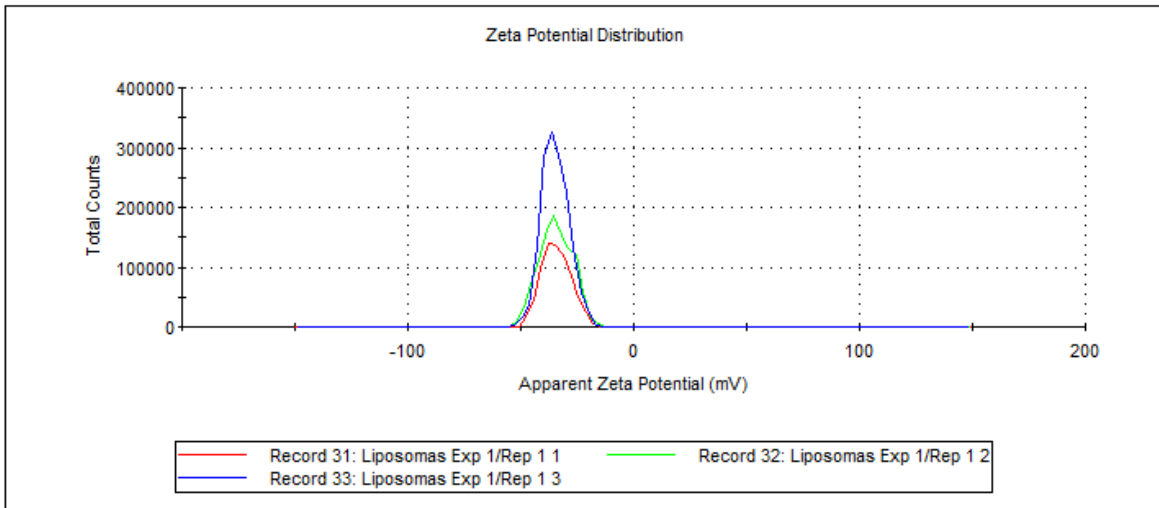
Determinar estos parámetros es muy importante al momento de caracterizar una micropartícula, ya que da indicios de estabilidad bajo soluciones, capacidad de encapsulación y liberación, penetración cutánea, irritación, etc. <sup>22,23</sup>. Para ello, primero se obtuvieron los datos arrojados por el equipo Zetasizer sobre el tamaño de partícula y potencial Z de cada experimento junto con su respectiva repetición, los datos se encuentran en la tabla 5. Además, se puede observar mejor en las gráficas, expuestas en las ilustraciones 5-20.

**Tabla 5.** Datos del tamaño de partícula medido por volumen y ángulo de 173° y Potencial Z de cada experimento y su repetición.

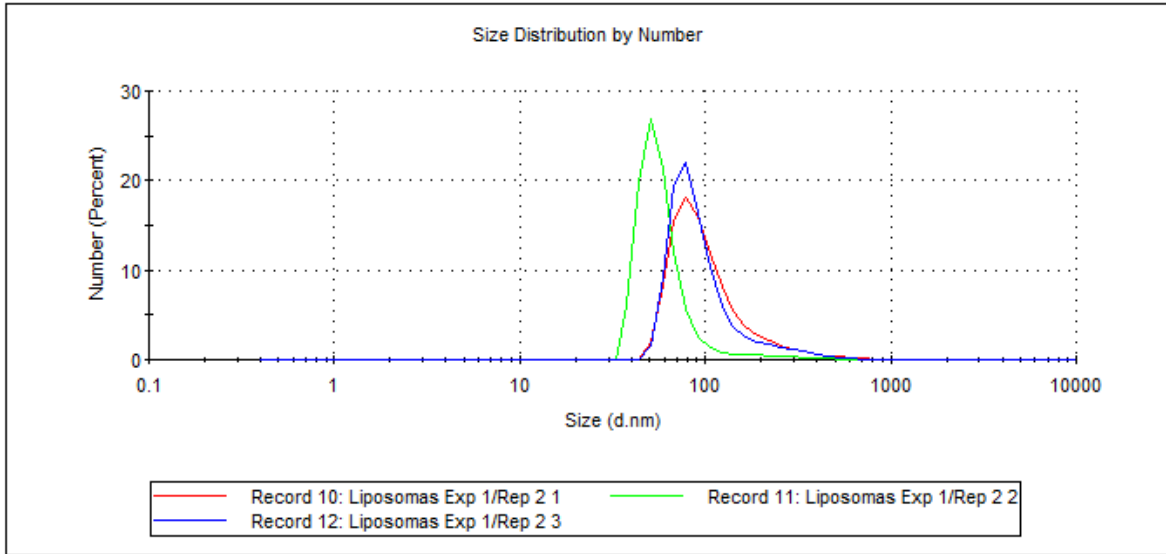
Análisis	Tamaño de partícula (nm)				Potencial Z (mV)			
	Exp.1	Exp.2	Exp.3	Exp.4	Exp.1	Exp.2	Exp.3	Exp.4
Rep.1	198,9	268	435,7	230,0	-34,3	-24,5	-14,3	-8,86
	199,5	265,6	436,8	227,9	-34,4	-22,6	-14,3	-4,97
	197,8	268,6	431	232,5	-34,8	-24,9	-14,4	-5,77
Rep.2	269,1	179,5	165,2	296,1	-36,3	-20,5	-10,1	-7,64
	278,2	176,2	166,2	294,6	-35,6	-22,5	-10,9	-6,98
	269,2	179,9	166,2	287,5	-36,4	-24,6	-10,2	-7,07
Promedio	235,5	222,9	300,2	261,4	-35,3	-23,3	-12,4	-6,88
Desviación estándar	36,8	44,5	134,3	31,4	0,85	1,56	1,98	1,25



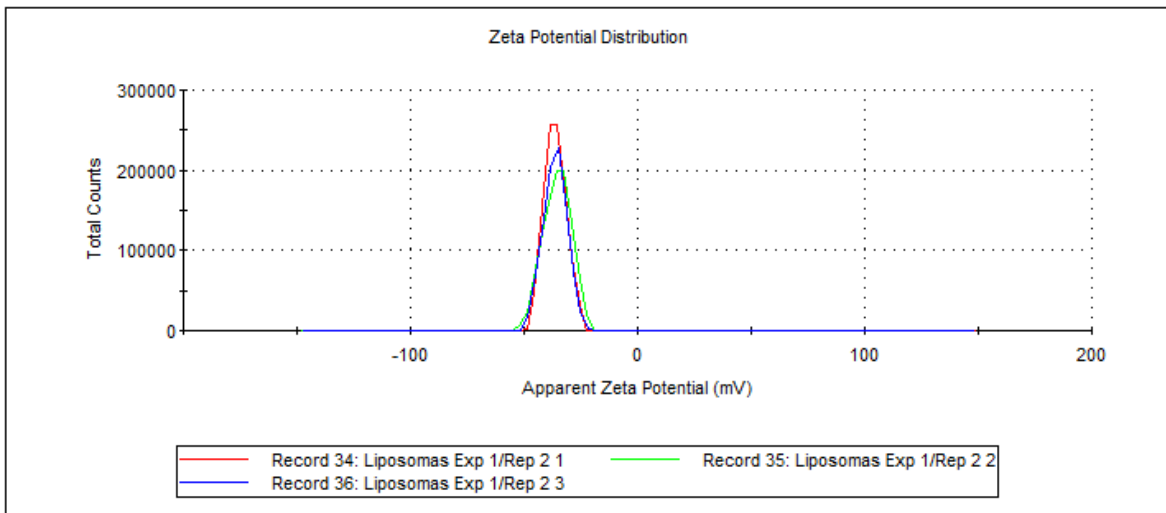
**Ilustración 5.** Distribución del tamaño de partícula por ángulo 173° de Liposomas exp. 1 rep. 1.



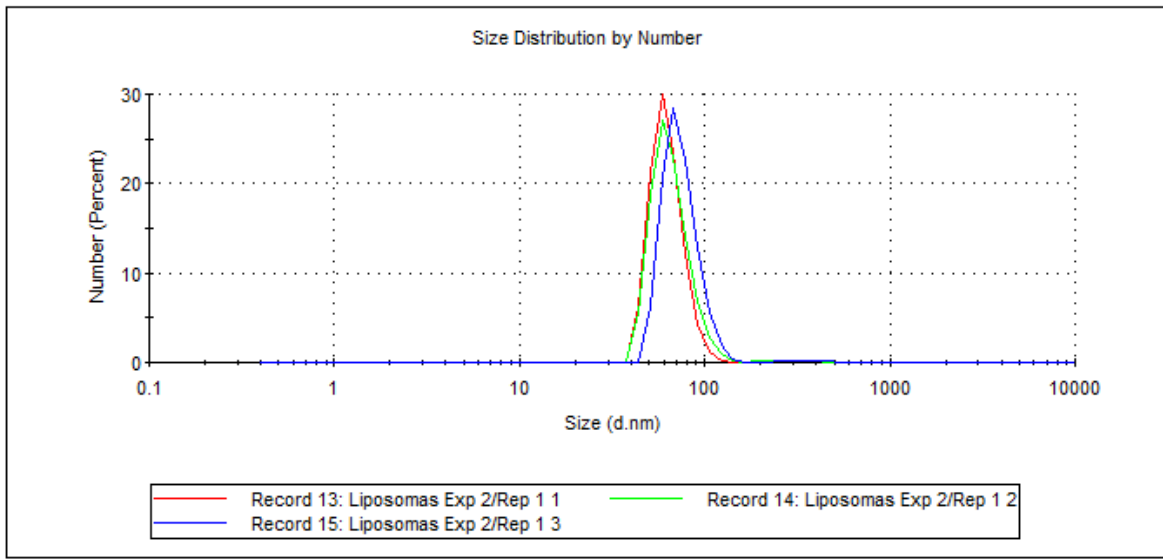
**Ilustración 6.** Potencial Z de Liposomas exp.1 rep. 1.



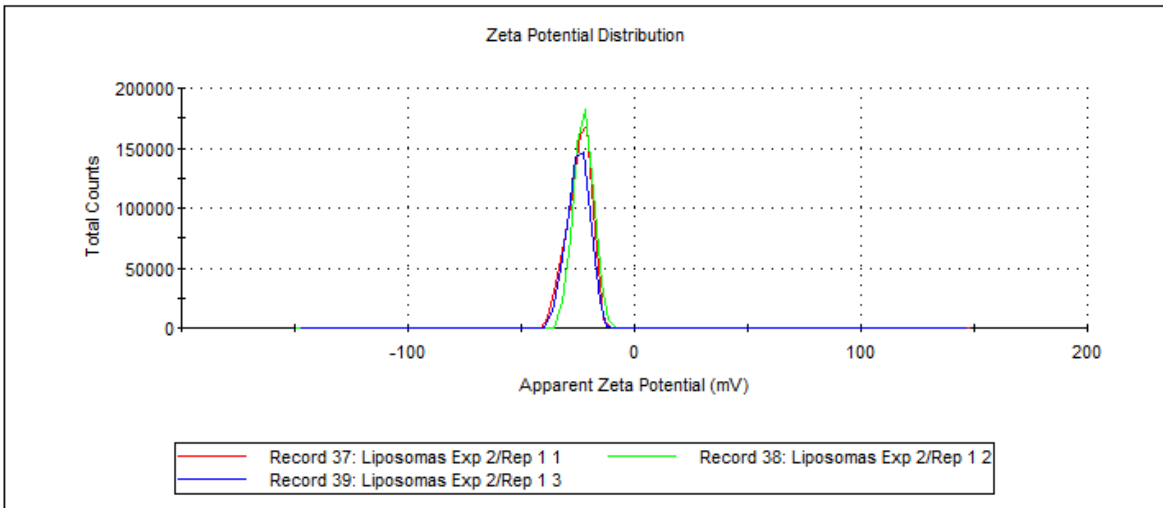
**Ilustración 7.** Distribución del tamaño de partícula por ángulo 173° de Liposomas exp. 1 rep. 2.



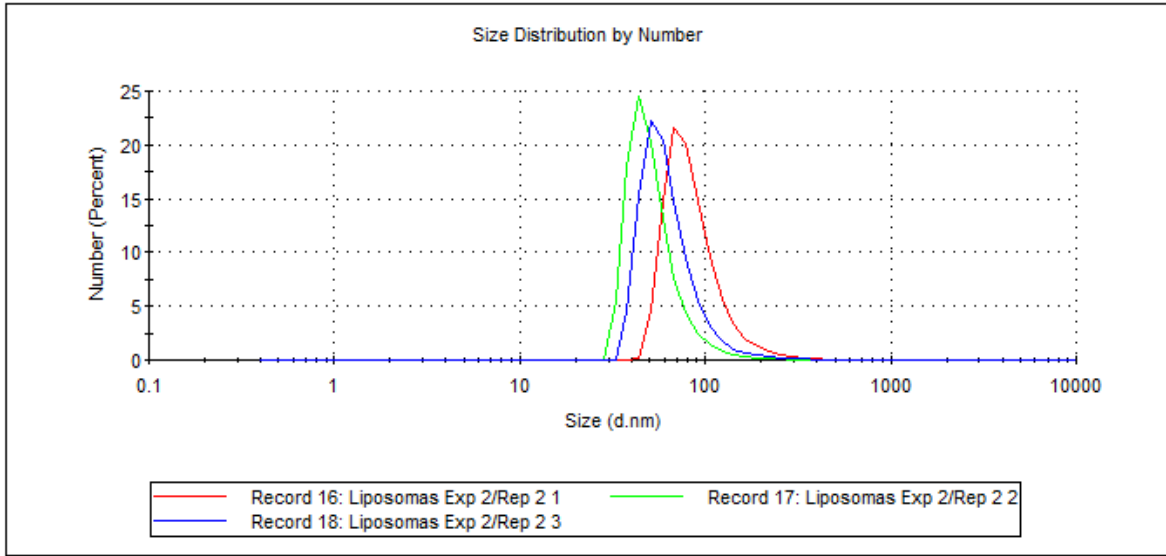
**Ilustración 8.** Potencial Z de Liposomas exp.1 rep. 2.



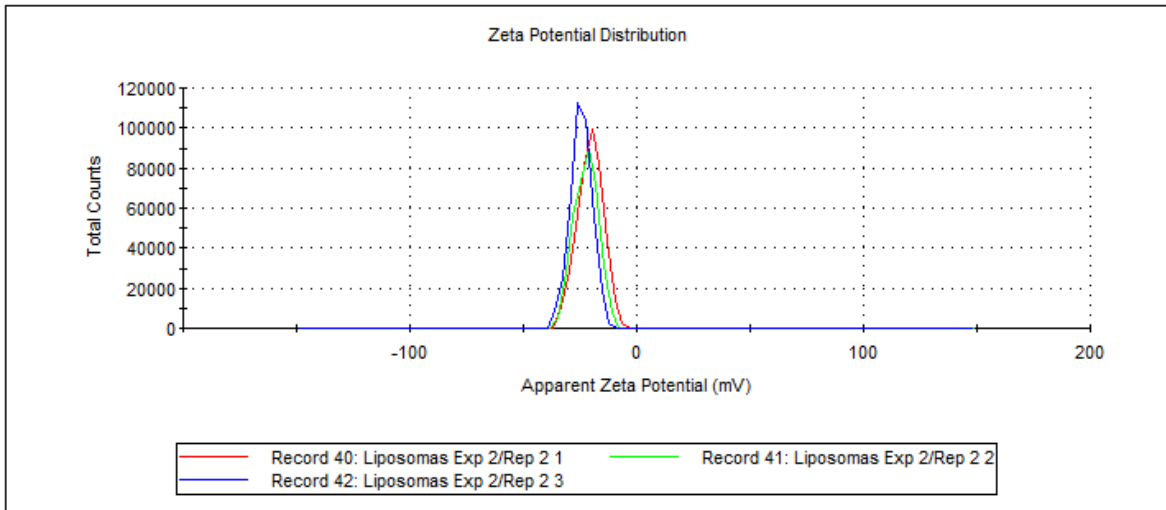
**Ilustración 9.** Distribución del tamaño de partícula por ángulo 173° de Liposomas exp. 2 rep. 1.



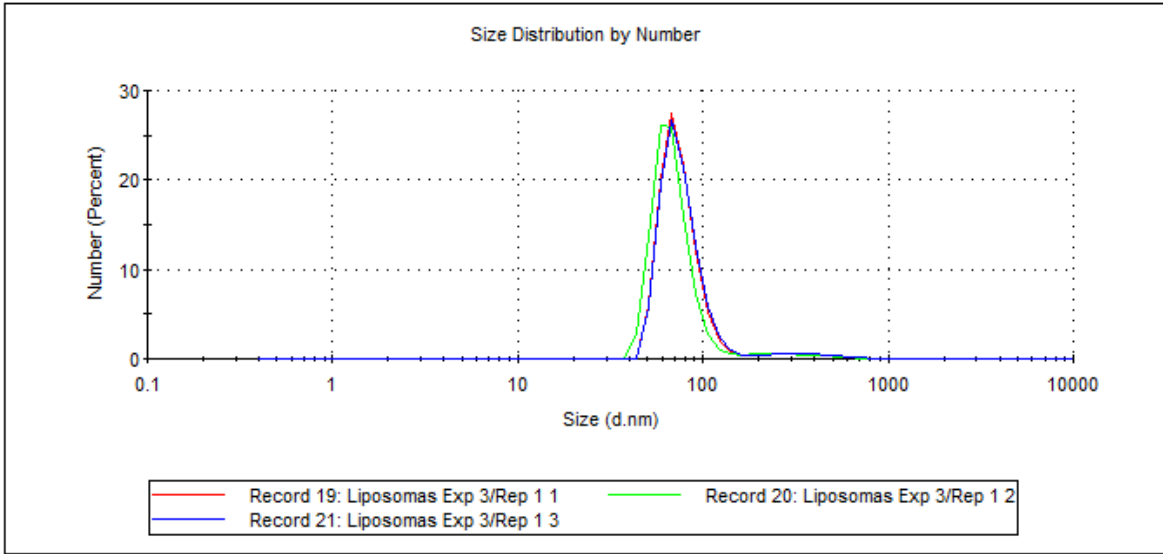
**Ilustración 10.** Potencial Z de Liposomas exp.2 rep. 1.



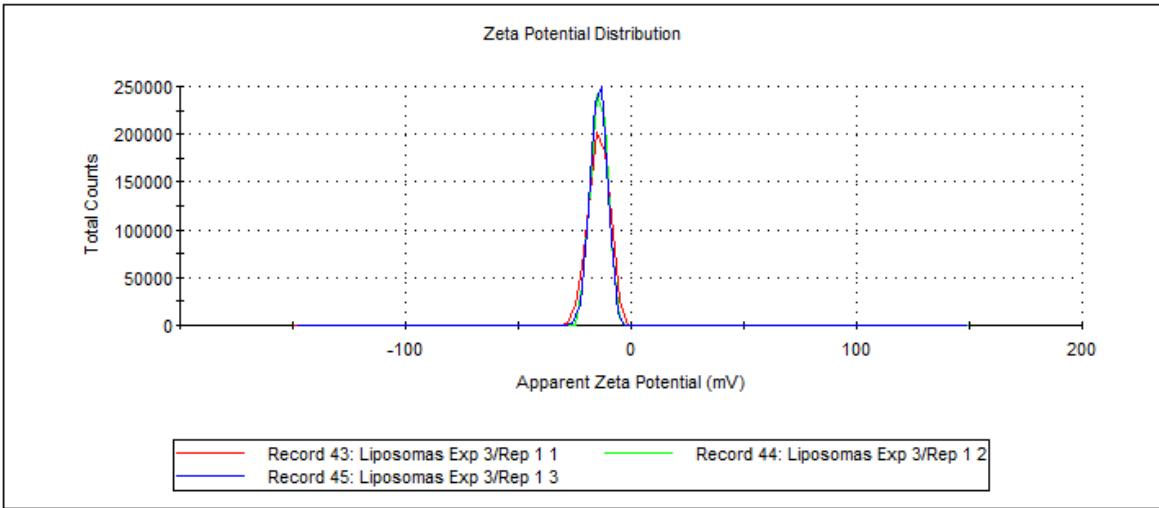
**Ilustración 11.** Distribución del tamaño de partícula por ángulo  $173^\circ$  de Liposomas exp. 2 rep. 2.



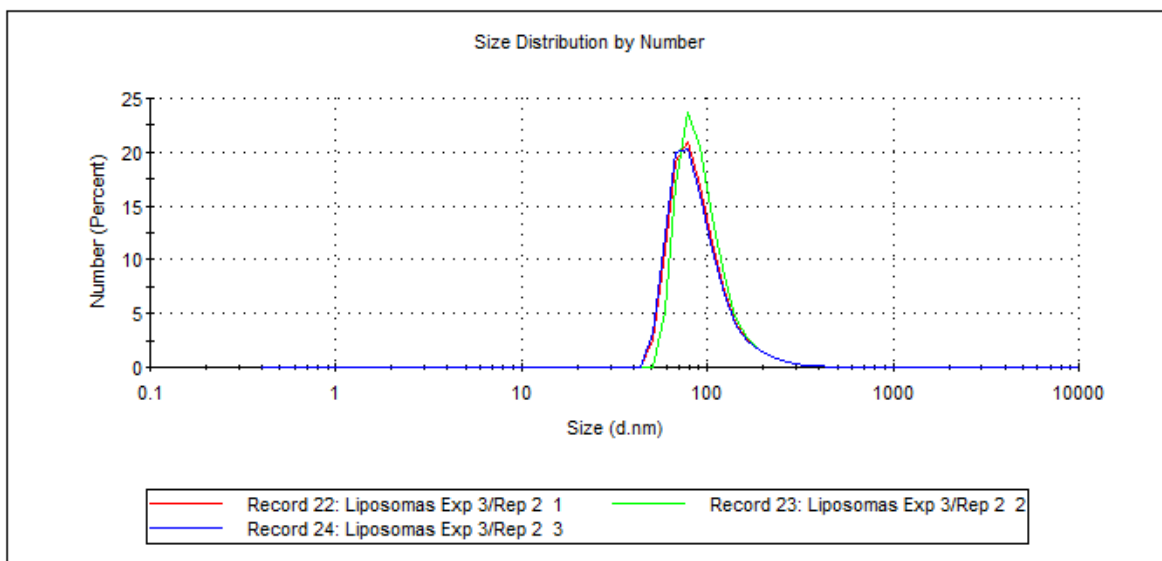
**Ilustración 12.** Potencial Z de Liposomas exp.2 rep. 2.



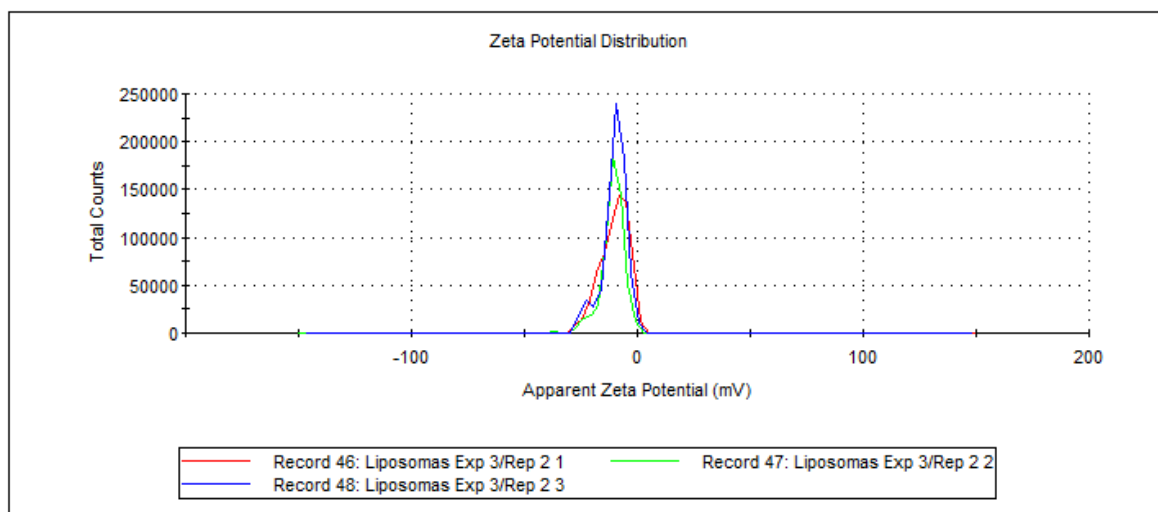
**Ilustración 13.** Distribución del tamaño de partícula por ángulo 173° de Liposomas exp. 3 rep. 1.



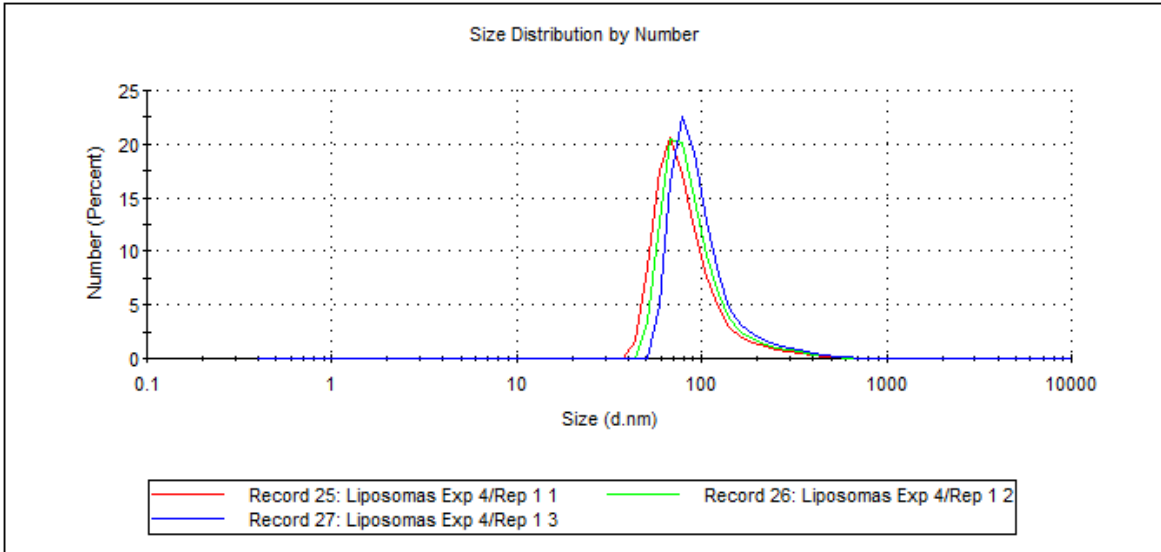
**Ilustración 14.** Potencial Z de Liposomas exp. 3 rep. 1.



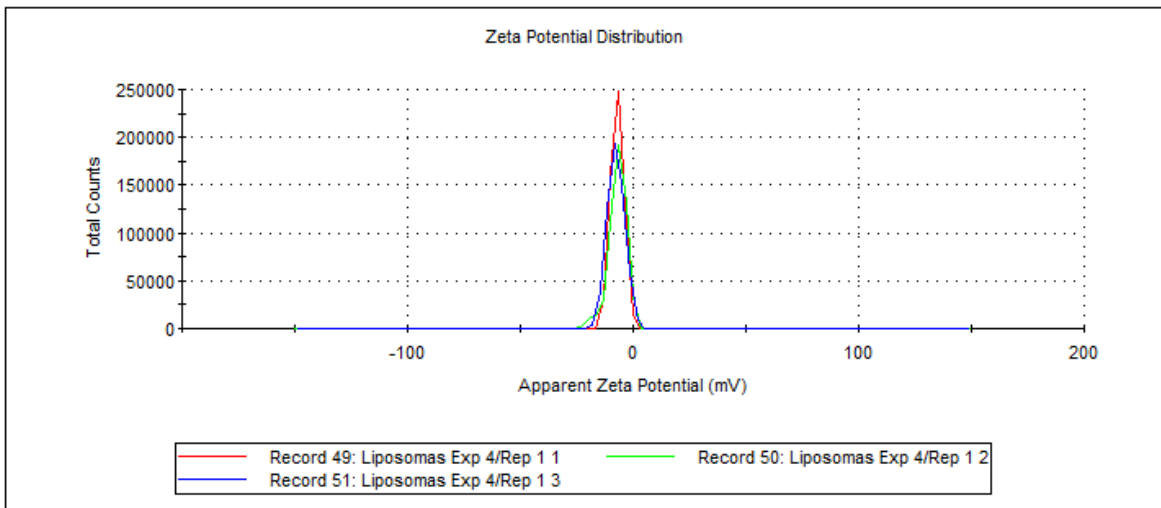
**Ilustración 15.** Distribución del tamaño de partícula por ángulo 173° de Liposomas exp. 3 rep. 2.



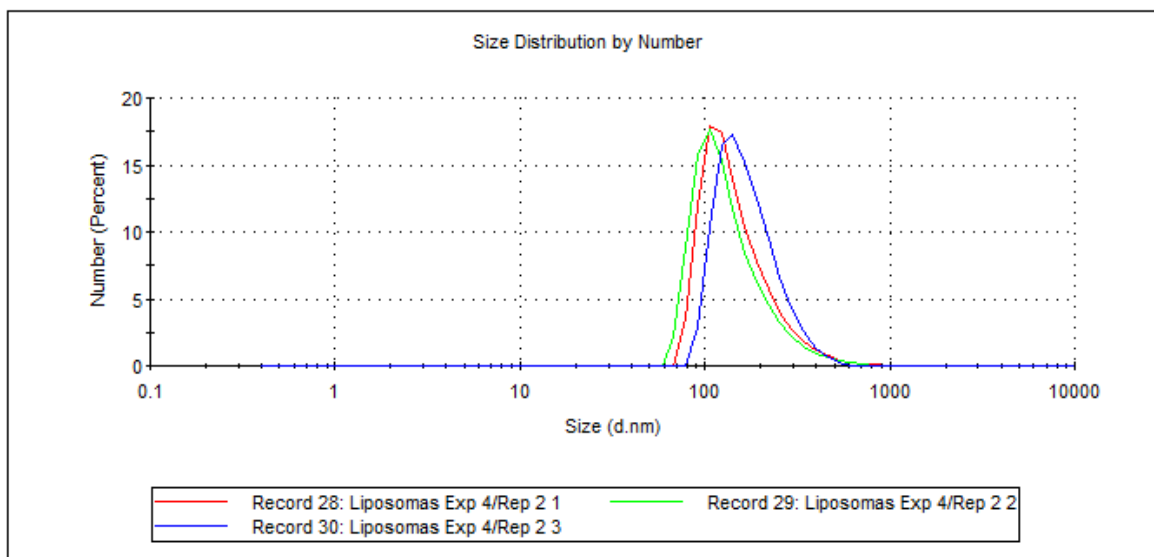
**Ilustración 16.** Potencial Z de Liposomas exp. 3 rep. 2.



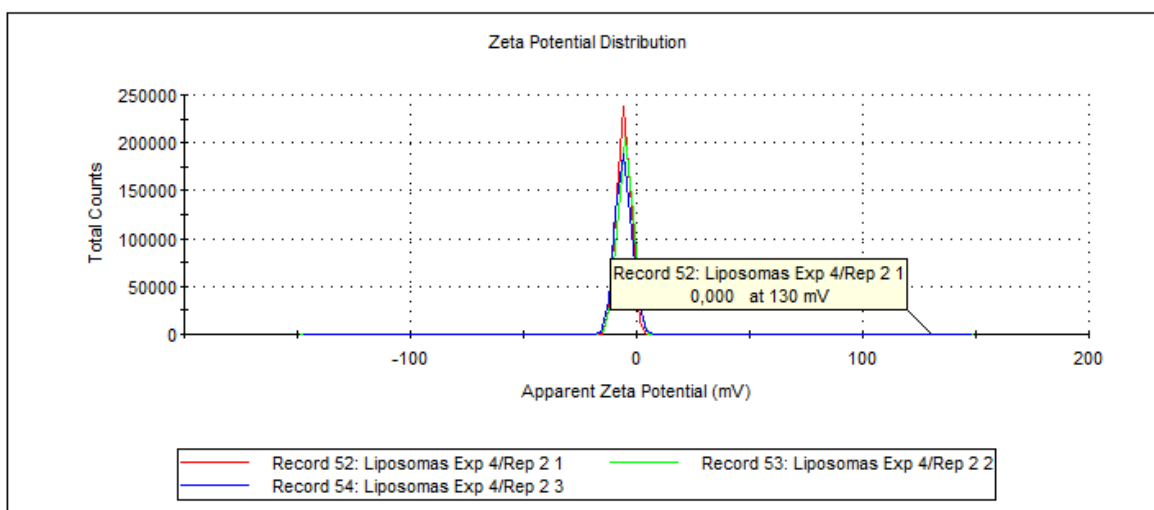
**Ilustración 17.** Distribución del tamaño de partícula por ángulo  $173^\circ$  de Liposomas exp. 4 rep. 1.



**Ilustración 18.** Potencial Z de Liposomas exp. 4 rep. 1.



**Ilustración 19.** Distribución del tamaño de partícula por ángulo 173° de Liposomas exp. 4 rep. 2.



**Ilustración 20.** Potencial Z de Liposomas exp. 4 rep. 2.

En este apartado se pudo evidenciar los valores del potencial Z y tamaño de partícula para cada experimento junto con su repetición, lo cual indicó un promedio para cada respuesta. Para el experimento 1, se obtuvo un promedio de potencial Z de -35,30 mV y para tamaño de partícula un promedio de 235,45 nm, para el experimento 2 un valor de -23,27 mV y 222,97 nm, para el experimento 3 un valor de -12,37 mV y 300,18 nm y finalmente, para el experimento 4 un valor de -6,88 mV y 261,43 nm. Se puede decir entonces que cada valor

de tamaño de partícula de cada experimento, entró dentro del rango nanométrico, lo cual sugiere propiedades de mejor penetración y menor irritación cutánea<sup>11</sup>. En el caso del potencial Z hubo cierta variabilidad, teniendo valores que demuestran una posible inestabilidad en sistemas acuosos y otros un poco más estables debido a que es una medida de la carga superficial de la partícula, lo cual está muy relacionado con las fuerzas de repulsión y atracción de las mismas. Valores cercanos a 0 mV significa en menor fuerza de repulsión y mayor fuerza de atracción por lo que las partículas tienden a agregarse y sedimentarse, en cambio valores cercanos a 40 o -40 mV significa una mejor estabilidad en el sistema, con poca tendencia a la agregación<sup>22</sup>.

Lo anterior, sugiere que posiblemente haya una correlación ya sea directa o inversa con alguna de las variables de concentración, lo cual se confirma con el siguiente análisis de diseño experimental con el fin de identificar el experimento que mejor presenta relación entre ambos parámetros.

### 3.1.2. Diseño experimental RSM

Se presenta la tabla ANOVA para el tamaño de partícula (ver tabla 6) y otro para el potencial Z (ver tabla 7). Posteriormente, se presenta el modelo de regresión para ambas respuestas, ver tablas 8 y 10, respectivamente. En donde DF significa grados de libertad, SUM SQ: suma de cuadrados y MEAN SQ: promedio de cuadrados.

**Tabla 6.** ANOVA para el tamaño de partícula.

<b>Fuente</b>	<b>DF</b>	<b>SUM SQ</b>	<b>MEAN SQ</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor P</b>
<b>Phospholipon</b>	1	12895	12985	0.403	0.560
<b>Glutación</b>	1	611	611	0.019	0.897
<b>Interacción</b>	1	203	203	0.006	0.941
<b>Residuales</b>	4	128762	32190		

**Tabla 7.** ANOVA para el potencial Z.

<b>Fuente</b>	<b>DF</b>	<b>SUM SQ</b>	<b>MEAN SQ</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor P</b>
<b>Phospholipon</b>	1	861.1	861.1	984.14	6.15e-16****
<b>Glutación</b>	1	136.1	136.1	155.57	0.000238***
<b>Interacción</b>	1	28.1	28.1	32.14	0.004774**
<b>Residuales</b>	4	3.5	0.9		

\*\*\* Alta significancia estadística, \*\* Significancia estadística

**Tabla 8.** Modelo de regresión tamaño de partícula.

<b>Coefficientes</b>	<b>Estimación</b>	<b>Error estándar</b>	<b>Valor T</b>	<b>Valor P</b>
<b>Intercepto</b>	359.637	56.781	6.334	0.00145**
<b>Efecto phospolipon</b>	40.288	56.781	0.710	0.50971
<b>Efecto Glutación</b>	-8.737	56.781	-0.154	0.88372

**Tabla 9.** Resultados acerca del modelo de regresión para el tamaño de partícula.

<b>Error estándar residual</b>	<b>DF</b>	<b>R-cuadrado múltiple</b>	<b>R-cuadrado ajustado</b>	<b>F-estadístico</b>	<b>Valor P</b>
160.6	5	0.09537	-0.2665	0.2635 (2, 5 DF)	0.7784

**Tabla 10.** Modelo de regresión potencial Z.

<b>Coefficientes</b>	<b>Estimación</b>	<b>Error estándar</b>	<b>Valor T</b>	<b>Valor P</b>
<b>Intercepto</b>	-19.1250	0.8892	-21.509	4.03e-06***
<b>Efecto phospolipon</b>	10.3750	0.8892	11.668	8.12e-05***
<b>Efecto Glutación</b>	4.1250	0.8892	4.639	0.00564**

**Tabla 11.** Resultados acerca del modelo de regresión para el potencial Z.

<b>Error estándar residual</b>	<b>Grados de libertad (DF)</b>	<b>R-cuadrado múltiple</b>	<b>R-cuadrado ajustado</b>	<b>F-estadístico</b>	<b>Valor P</b>
2.515	5	0.9693	0.957	78.83 (2, 5 DF)	0.0001656

Luego se obtuvo el modelo de regresión para el tamaño de partícula con las variables originales, así como para el potencial Z, véase las tablas 12 y 14.

**Tabla 12.** Modelo de regresión para el tamaño de partícula con las variables originales.

<b>Coefficientes</b>	<b>Estimación</b>	<b>Error estándar</b>	<b>Valor T</b>	<b>Valor P</b>
<b>Intercepto</b>	305.275	212.456471	1.437	0.210
<b>Efecto phospolipon</b>	0.040288	0.056781	0.710	0.510
<b>Efecto Glutación</b>	-0.003495	0.022713	-0.154	0.884

**Tabla 13.** Resultados acerca del modelo de regresión para el tamaño de partícula con las variables originales.

<b>Error estándar residual</b>	<b>Grados de libertad (DF)</b>	<b>R-cuadrado múltiple</b>	<b>R-cuadrado ajustado</b>	<b>F-estadístico</b>	<b>Valor P</b>
160.6	5	0.09537	-0.2665	0.2635 (2, 5 DF)	0.7784

**Tabla 14.** Modelo de regresión para el Potencial Z con las variables originales.

<b>Coefficientes</b>	<b>Estimación</b>	<b>Error estándar</b>	<b>Valor T</b>	<b>Valor P</b>
<b>Intercepto</b>	-52.25	3.327	-15.705	1.90e-05***
<b>Efecto phospolipon</b>	1.038e-02	8.892e-04	11.668	8.12e-05***
<b>Efecto Glutación</b>	1.650e-03	3.557e-04	4.639	0.00564**

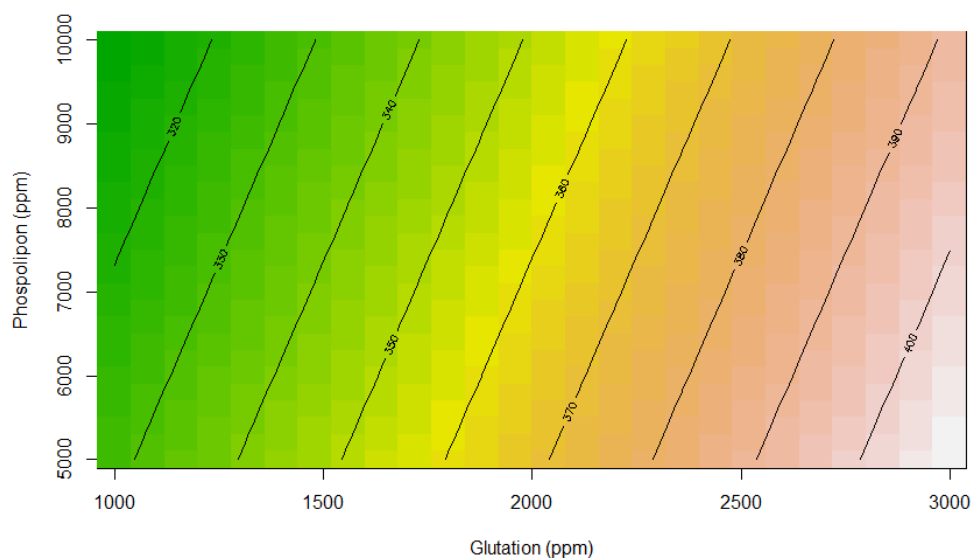
**Tabla 15.** Resultados acerca del modelo de regresión para el potencial Z con las variables originales.

<b>Error estándar residual</b>	<b>Grados de libertad (DF)</b>	<b>R-cuadrado múltiple</b>	<b>R-cuadrado ajustado</b>	<b>F-estadístico</b>	<b>Valor P</b>
2.515	5	0.9693	0.957	78.83 (2, 5 DF)	0.0001656

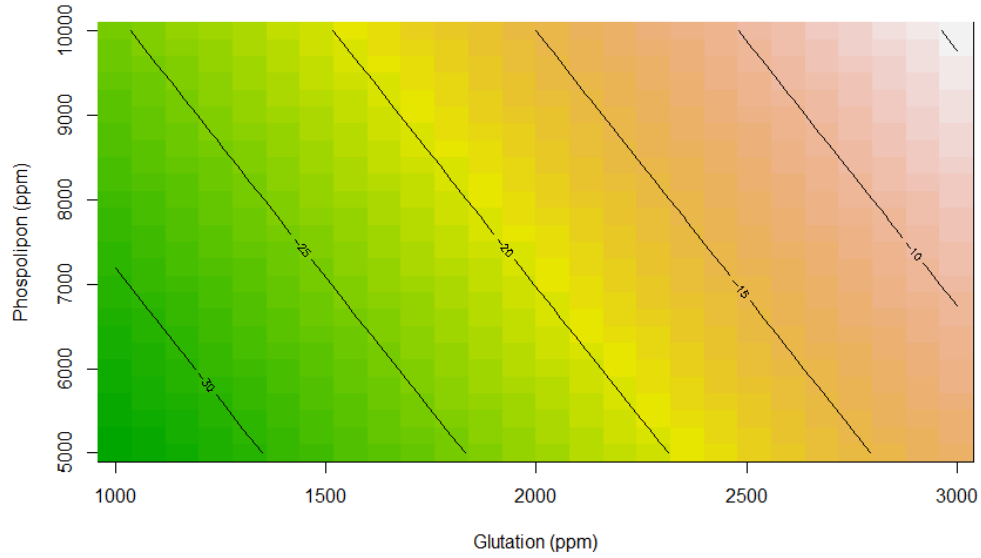
Luego de extraer todos los datos importantes brindados por el programa R Studio. En primer lugar, se puede analizar que el tamaño de partícula no presenta una significancia estadística ya que no se evidenció un marcador en la tabla 6 que lo indica; como si lo hace el potencial

Z en la tabla 7, ya que tiene los asteriscos \*\*\* para “Alta significancia estadística”, es decir, que lo evidenciado no pertenece al azar sino que presenta alta probabilidad de que se pueda explicar bajo el modelo, y \*\* para “Significancia estadística” lo que ayuda a identificar que términos del modelo son realmente importantes<sup>21</sup>. Lo anterior, se puede confirmar con el valor P, ya que si es menor de 0,05 significa alta significancia estadística.

Teniendo esto en cuenta, se puede afirmar que, para el tamaño de partícula, es prácticamente indiferente trabajar con cualquiera de los experimentos ya que no hay una alta correlación entre los datos. En cambio, para el potencial Z si es altamente significativo la variación de las concentraciones, mostrando una relación inversa ya que a mayor concentración de glutatión y a su vez de phospholipon el valor de potencial Z va tomando valores cercanos a 0 mV (menor estabilidad). Lo anterior, se puede observar mejor con el gráfico de contornos, ilustraciones 21 y 22. Por último, se presenta el resumen experimental para ambas respuestas, tablas 16 y 17.



**Ilustración 21.** Gráfico de contorno para el tamaño de partícula.



**Ilustración 22.** Gráfico de contorno para el potencial Z.

**Tabla 16.** Resumen experimental para el tamaño de partícula.

	<b>Phospholipon</b>	<b>Glutathion</b>	<b>Promedio</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>n= #de muestras</b>
<b>1</b>	1000	10000	315.65	90.7218	2
<b>2</b>	1000	5000	323.05	108.1166	2
<b>3</b>	3000	5000	413.70	307.5914	2
<b>4</b>	3000	10000	386.15	119.2889	2

**Tabla 17.** Resumen experimental para el potencial Z.

	<b>Phospholipon</b>	<b>Glutación</b>	<b>Promedio</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>n= #de muestras</b>
<b>1</b>	1000	5000	-35.5	0.7071068	2
<b>2</b>	1000	10000	-23.5	0.7071068	2
<b>3</b>	3000	5000	-11.0	1.4142136	2
<b>4</b>	3000	10000	-6.5	0.7071068	2

Teniendo en cuenta los datos obtenidos en este primer objetivo, se decidió trabajar con el experimento #4, el cual presentaba mejor relación de valor de potencial Z y tamaño de partícula debido a que, como se dijo anteriormente, el tamaño de partícula no presentó una relación con las variables de concentración, es por eso que los datos de desviación estándar de la tabla 16 están muy altos. Sin embargo, el potencial Z fue muy significativo y a pesar de tener el potencial Z menor comparado con otros experimentos, este puede ser adecuado dependiendo de la formulación y la inclusión de estabilizantes como modificadores reológicos<sup>22 23</sup>. Estos agentes en particular, son importantes agregarlos con el fin de que las partículas no se agreguen o floculen entre sí.

Además, con miras a obtener una capacidad de carga y eficiencia de encapsulación cercanas al 100%, se escogió trabajar con este experimento ya que presentaba una alta cantidad del agente encapsulado y presenta un tamaño de partícula 261,43 nm que se encuentra dentro de la escala nanométrica, por lo que sugiere una mejor penetración cutánea y menor irritación<sup>11</sup>. Así mismo, en la tabla 5 se observa que presenta menor desviación estándar lo cual sugiere mejor relación entre el tamaño de partícula y potencial Z a comparación del experimento #3 que también presenta menor tamaño de partícula.

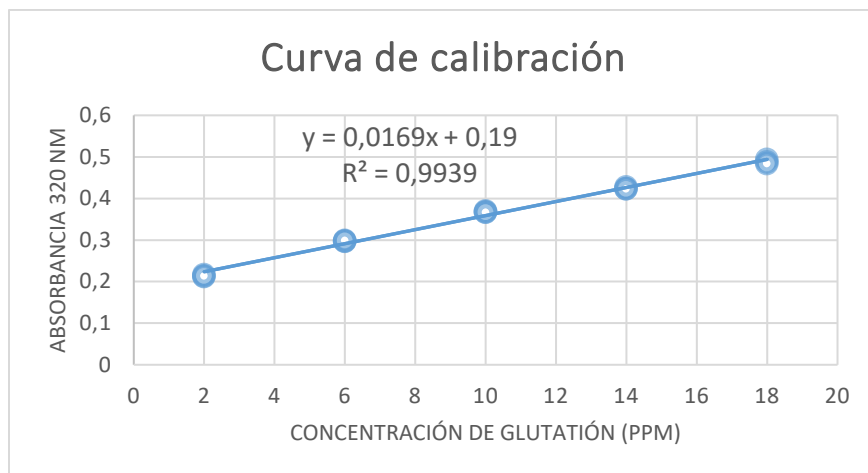
### 3.2. Optimizar la eficiencia de encapsulación y capacidad de carga del glutatión en las nanopartículas.

Para poder determinar la eficiencia de encapsulación y capacidad de carga del glutatión en las nanopartículas, se realizó en primer lugar, una curva de calibración con el estándar de glutatión y se midió la absorbancia por espectrofotometría, ver tabla 18 y la ilustración 23.

#### 3.2.1. Curva de calibración para la cuantificación de glutatión libre

**Tabla 18.** Curva de calibración para la cuantificación de glutatión libre mediante espectrofotometría.

<b>Concentración Glutatión libre (ppm)</b>	<b>Absorbancia a 320 nm</b>
2	0,212
2	0,217
2	0,214
6	0,297
6	0,298
6	0,299
10	0,37
10	0,368
10	0,367
14	0,424
14	0,428
14	0,423
18	0,494
18	0,488
18	0,484
<b>Muestra</b>	0,181
	0,182
<b>Promedio Muestra</b>	0,182



**Ilustración 23.** Curva de calibración para la cuantificación de glutatión libre

### 3.2.1.1. Determinación de la concentración

Obteniendo la ecuación de la recta en la *Ecu. 1*, se reemplaza el valor de  $y$  por el promedio de la absorbancia de la muestra y se despeja  $x$ , con el fin de determinar la concentración de la muestra.

$$\text{Ecu. 1. } y = 0,0169x + 0,19$$

$$x = \frac{(0,182 - 0,19)}{0,0169}$$

$$x = -0,503 \approx 0 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$$

Un valor de alrededor de 0 ppm indica que no es el valor verdadero, sin embargo, nos da un indicio de que la eficiencia de encapsulación y capacidad de carga son muy buenos, cerca del 100 %. Lo cual se puede confirmar bajo la *Ecu 2* y *3*. Además, este valor demuestra que la curva de calibración es apta, pero no se puede determinar la concentración de la muestra con exactitud ya que la concentración del glutatión no encapsulado es muy baja y, por tanto, no se puede realizar una medición directa con el volumen obtenido luego de la ultrafiltración. Por el contrario, para próximos análisis es ideal pre-enriquecer la muestra con una concentración de glutatión estándar conocida para aumentar la sensibilidad de la curva y poder hacer la cuantificación satisfactoriamente.

### 3.2.1.2. Capacidad de carga (C.C.)

Para la determinación de la cantidad de glutatión que se logró encapsular, se hacen los siguientes cálculos, teniendo en cuenta que se pesaron 103,8 mg de glutatión estándar 97%, 75,3 mg de phospholipon y 22,8 mg de colesterol:

$$\text{Ecu 2. C. C. (\%)} = \frac{\text{Cantidad de Glutatión encapsulado}}{\text{Cantidad total de liposomas}} * 100$$

$$\text{C. C. (\%)} = \frac{103,8 \text{ mg Glutatión}}{22,8 \text{ mg Colesterol} + 75,3 \text{ mg Phospholipon}} * 100 = 105,810\%$$

### 3.2.1.3. Eficiencia de encapsulación (E.E.)

$$\text{Ecu 3. E. E. (\%)} = \frac{\text{Cantidad de Glutatión encapsulado}}{\text{Cantidad total de glutatión añadido}} * 100$$

$$\text{E. E. (\%)} = \frac{103,8 \text{ mg Glutatión}}{103,8 \text{ mg Glutatión}} * 100 = 100\%$$

La eficiencia de encapsulación y capacidad de carga son parámetros útiles en el diseño de micropartículas que protejan y liberen compuestos bioactivos como el glutatión. En el caso de la eficiencia de encapsulación, permite evaluar la protección del compuesto, es decir, que tanta cantidad de glutatión logró encapsularse, protegiéndolo de factores externos que pueden degradarlo en una formulación, como oxidación o pH, aspectos cruciales para mantener su actividad antioxidante y estabilidad funcional en el tiempo<sup>11</sup>.

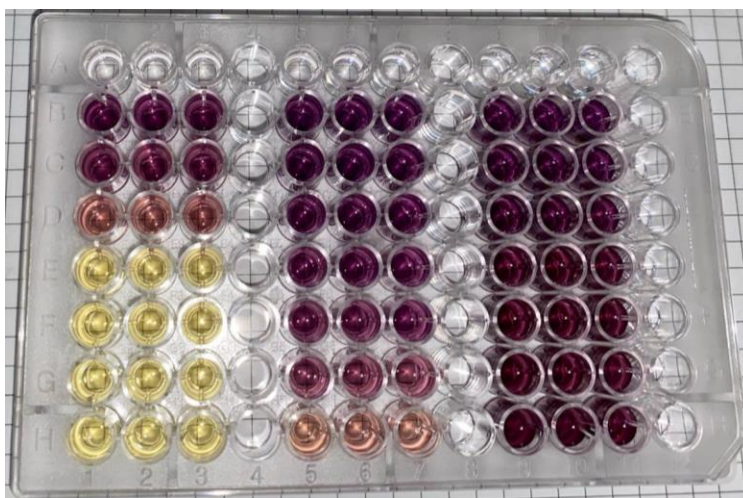
En cuanto a la capacidad de carga, permite maximizar la cantidad de glutatión que puede ser incorporada en un volumen dado de micropartículas. Lo anterior, con el fin de llegar a la concentración necesaria para lograr un efecto antienvjecimiento, aclarador y posible fotoprotector. En este caso, las concentraciones que normalmente se utiliza en aplicaciones cosméticas del glutatión está entre 0,05 y 5 mg/mL<sup>25</sup>, por lo que permite la incorporación de la concentración necesaria de ingrediente activo sin tener que ocupar mucho porcentaje de la formulación, que se podría aprovechar para la integración de otros ingredientes que aporten a la estabilidad y funcionalidad de la formulación.

Por tanto, la selección adecuada de E.E. y C.C. en las micropartículas es clave para lograr una buena compatibilidad con otros componentes de la formulación y una mayor flexibilidad

en su aplicación, lo que facilita su incorporación en diversos productos y sistemas de liberación. Es posible estimar que se obtuvieron estos beneficios debido a que se aprecia que la capacidad de carga y eficiencia de encapsulación son bastante buenos.

### 3.3. Evaluar la actividad antioxidante de las micropartículas por métodos químicos

Se preparó una curva de calibración en una placa de 96 pozos, que se llevó a incubar por 20 min y se leyó en el lector de platos. Los resultados se ven en la ilustración 24.



**Ilustración 24.** Curva de calibración para cuantificar la actividad antioxidante

En esta ilustración, se puede observar un cambio de color a medida que aumenta la concentración de cada molécula de interés, Trolox, Glutación estándar o Liposomas. Esto se debe a que el DPPH, tiene un átomo de Nitrógeno sin aparear por lo que hace una búsqueda frenética de un electrón para poder estabilizarse o neutralizarse, con ello cambia de color de violeta intenso a amarillo, disminuyendo su absorbancia en la región visible<sup>24</sup>. Aquí se puede observar como las últimas dos filas del glutación estándar son similares a las filas 3 y 4 del Trolox, quien es el antioxidante estándar de referencia. Lo anterior, se puede confirmar con el cálculo del  $IC_{50}$ , determinado bajo el programa R Studio.

Se determinó el  $IC_{50}$  nombrada como  $K_m$ , es decir, la concentración mínima inhibitoria que debe tener el antioxidante para neutralizar el 50 % de los radicales libres propuestos por el DPPH. A continuación, se presentan los datos arrojados por R para el trolox y glutación estándar.

### 3.3.1. Determinación de IC<sub>50</sub>

#### 3.3.1.1. Trolox

Formula: Inhibicion ~ Vmax \* Conc\_trolox/(Km + Conc\_trolox)

Parameters:

Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)

Vmax 115.759 7.670 15.093 4.93e-12 \*\*\*

Km 32.179 6.969 4.617 0.000188 \*\*\*

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 12.05 on 19 degrees of freedom

Number of iterations to convergence: 10

Achieved convergence tolerance: 1.49e-08

IC<sub>50</sub> Trolox: 32,179 µg/mL

#### 3.3.1.2. Glutación estándar

Formula: Inhibicion ~ Vmax \* Conc\_Glutation\_std/(Km + Conc\_Glutation\_std)

Parameters:

Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)

Vmax 108.181 4.857 22.28 4.45e-15 \*\*\*

Km 134.568 12.976 10.37 2.92e-09 \*\*\*

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 2.764 on 19 degrees of freedom

Number of iterations to convergence: 8

Achieved convergence tolerance: 1.49e-08

IC<sub>50</sub> Estándar Glutación: 134,568 µg/mL

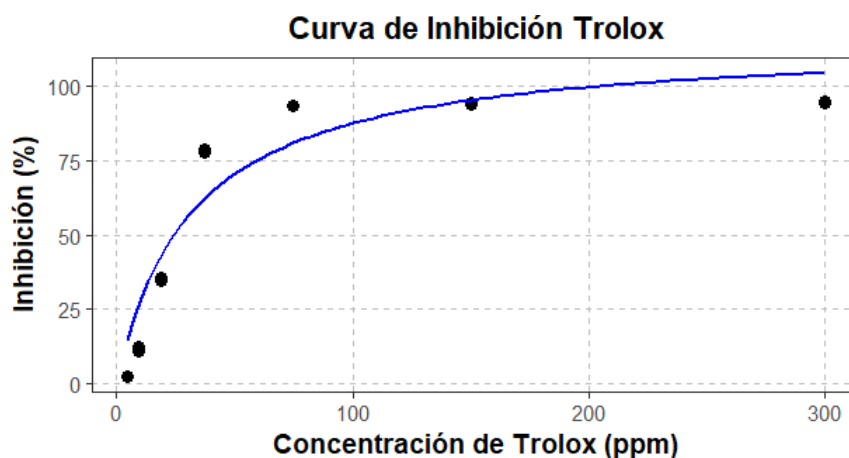
Los valores del IC<sub>50</sub> del glutatión (134,568  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y del Trolox (32,179  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), indica que efectivamente el glutatión presenta actividad antioxidante, aunque no tan potente como la del Trolox ya que un valor más bajo indica una mayor actividad antioxidante<sup>25</sup>. Sin embargo, se puede obtener una relación entre ambos determinando los equivalentes trolox. Para ello, primero se graficó la curva de inhibición que indica la reducción en la formación de radicales libres o en la oxidación de una sustancia determinada.

### 3.3.1.3. Liposomas

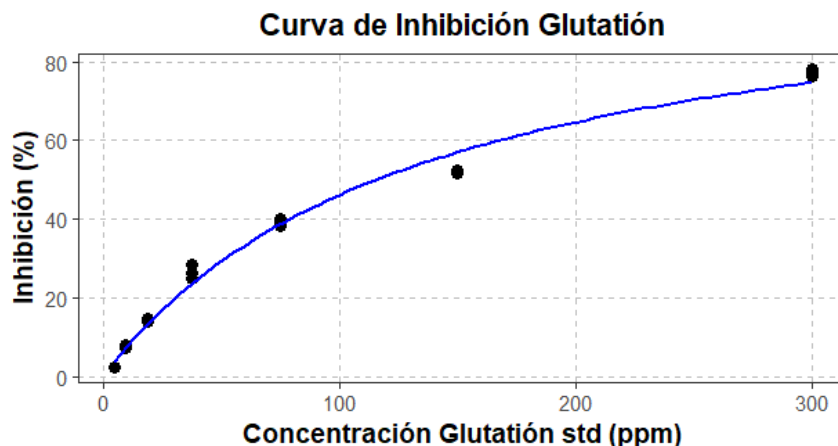
El análisis estadístico de la actividad de los liposomas no es concluyente. Por tal motivo, es imposible analizarlos de manera correcta, su valor de Km (IC<sub>50</sub>) no se puede determinar. Lo anterior se debe a que es importante establecer un protocolo para la desnaturalización de los liposomas con el fin de que liberen el glutatión y se pueda observar una actividad antioxidante mediante este método.

### 3.3.2. Determinación de la curva de inhibición

A continuación, se presentan las gráficas de la curva de inhibición para trolox y glutatión estándar, ver ilustraciones 25 y 26.



**Ilustración 25.** Curva de inhibición (%) Trolox



**Ilustración 26.** Curva de inhibición (%) Glutatión estándar

En cuanto a las curvas, la pendiente de la curva en las concentraciones iniciales refleja la rapidez con la que el antioxidante reacciona con los radicales libres. En el caso del Trolox presentó una pendiente más pronunciada que el glutatión, indicando una reacción inicial más efectiva. El Trolox alcanzó una inhibición mayor a concentraciones más bajas, mostrando que es más eficiente en neutralizar radicales libres en este contexto. El Glutatión requiere mayores concentraciones para lograr un efecto de inhibición comparable, pero no llega a superar el 80% en las condiciones evaluadas. Esto puede indicar que el glutatión, aunque menos eficiente según estas curvas, tiene un papel esencial en sistemas biológicos, ya que su acción antioxidante no solo depende de su capacidad de neutralizar radicales, sino también de su capacidad de regenerarse continuamente en el cuerpo.

### 3.3.3. Determinación de los equivalentes Trolox

Ahora bien, para calcular los equivalentes trolox del estándar de glutatión se realizó el siguiente procedimiento matemático.

$$\frac{32,179 \mu\text{g}}{\text{mL}} \frac{1 \text{ g}}{1000 \mu\text{g}} \frac{1 \text{ mol Trolox}}{304,34 \text{ g}} = \frac{0,105 \text{ mol}}{\text{mL}} \text{ Trolox}$$

$$\frac{134,568 \mu\text{g}}{\text{mL}} \frac{1 \text{ g}}{1000 \mu\text{g}} \frac{1 \text{ mol Glutatión}}{307,33 \text{ g}} = \frac{0,438 \text{ mol}}{\text{mL}} \text{ Glutatión}$$

$$\text{Factor de conversión} = \frac{0,105 \frac{\text{mol}}{\text{mL}}}{0,438 \frac{\text{mol}}{\text{mL}}} = 0,24$$

$$1 \text{ mol Glutatión} * 0,24 = 0,24 \text{ moles de Trolox}$$

Es decir que 1 mol de glutatión tiene la misma capacidad antioxidante que 0,24 moles de Trolox en las condiciones de este ensayo. Lo cual confirma lo anteriormente analizado; el glutatión es menos potente que el trolox, pero puede tener mayor ventaja dentro de los sistemas biológicos, ya que se trata de un antioxidante endógeno.

#### **4. Conclusiones**

Este proyecto pretendía obtener una micropartícula capaz de proteger y encapsular el glutatión, optimizar su capacidad de carga y medir su actividad antioxidante con el fin de hacer una contribución a una posible formulación cosmética para el cuidado de la piel, alineado con tendencias de sostenibilidad y eficacia. Se planeaba trabajar con un lisado de levadura rico en glutatión, es decir, hacer uso de un ingrediente obtenido a partir de procesos biotecnológicos sostenibles. Sin embargo, ese proceso no se pudo estandarizar en la Universidad Icesi, por ello, se realizó el proyecto con glutatión grado estándar.

Para ello, inicialmente se logró obtener una micropartícula de tamaño nanométrico, es decir, con posibles propiedades de mejor penetración y menor irritación cutánea; que presentó un potencial  $Z$  cercano a 0 por lo que es de importancia agregar estabilizantes como modificadores reológicos para evitar la probabilidad de agregación de las partículas. Por lo que se pudo completar el primer objetivo.

Así mismo, se estima que se obtuvo una eficiencia de encapsulación y capacidad de carga cerca del 100 % ya que no fue posible la cuantificación exacta del glutatión libre o si encapsular. Para ello, es recomendable que en futuros análisis no se determine la concentración directamente del volumen obtenido luego de la ultrafiltración, ya que presenta una concentración demasiado baja, por eso es ideal pre-enriquecer la muestra para que entre dentro de la curva y poder cuantificar satisfactoriamente.

Finalmente, se pudo medir la actividad antioxidante únicamente por métodos químicos debido a que no se logró estandarizar de manera oportuna el proceso en cultivos celulares. Se estableció la actividad la del glutatión grado estándar y se pudo hacer una comparación con el trolox, el antioxidante estándar, se obtuvo que 1 mol de glutatión tiene la misma capacidad antioxidante que 0,24 moles de trolox. Así mismo la curva de inhibición evidencia que el glutatión es menos potente que el trolox, pero puede tener una ventaja en la aplicación

en sistemas biológicos ya que no solo depende de su actividad inhibitoria sino también en su capacidad regenerativa en el cuerpo.

No se pudo medir la actividad antioxidante de los liposomas pues no se logró solubilizar completamente el phospholipon y exponer el glutatión para evidenciar una actividad antioxidante. Es por eso que para futuros análisis es importante establecer este método de solubilización o desnaturalización, aumentando la concentración de etanol al 96%.

Se hizo un análisis exploratorio en donde se pudo establecer satisfactoriamente el método de fabricación de los liposomas, que presentó un buen tamaño de partícula, eficiencia de encapsulación y capacidad de carga. Así mismo, para futuros proyectos es ideal poder medir la actividad antioxidante que estos presentan. Todo lo anterior encaja en el propósito visual de contribuir a la industria cosmética para una posible formulación para el cuidado de la piel, con el uso de una molécula con propiedades antienvjecimiento, despigmentante y que puede estar implicada en la aparición del acné.

### **Agradecimientos**

Gracias a la Universidad Icesi, la facultad y el personal que brindaron los materiales y apoyo necesarios para la finalización del proyecto. Así como a familiares, profesores, amigos y pareja que me animaron en los momentos de adversidad. Entre ellos, mis padres y hermano, que siempre me apoyaron en todo mi proceso de formación académica y personal. Así mismo agradezco fuertemente a mi pareja y mi amiga de la universidad, quienes han sido un apoyo emocional y psicológico muy importante y necesario en todo este proceso, no solo del proyecto de grado sino durante una mayor parte de la carrera.

### **Referencias bibliográficas**

1. Rodríguez, A., Aramendis, R., Deana, A., García, R. & Pittaluga, L. *El Aporte de La Biotecnología Médica Frente a La Pandemia Del COVID-19 y Lecciones Para Su Desarrollo Mediante Las Estrategias Nacionales de Bioeconomía: Estudios de Caso de Colombia, Costa Rica y El Uruguay*. <https://hdl.handle.net/11362/46533> (2020).
2. Bisang, R., Campi, M. & Cesa, V. *Biotecnología y Desarrollo*. (2009).
3. Patrícia, S., Gómez, M., Katerine, Y. & Ossa, H. Biotecnología aplicada al desarrollo agropecuario colombiano Biotechnology applied to colombian agricultural development Biotecnología aplicada ao desenvolvimento agricola colombiano. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental* 6, (2015).

4. Revuelta, J. L., Buey, R. M., Ledesma-Amaro, R. & Vandamme, E. J. Microbial biotechnology for the synthesis of (pro)vitamins, biopigments and antioxidants: challenges and opportunities. *Microb Biotechnol* 9, 564–567 (2016).
5. Parcheta, M. *et al.* Recent developments in effective antioxidants: The structure and antioxidant properties. *Materials* vol. 14 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ma14081984> (2021).
6. Pizzino, G. *et al.* Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Hindawi: Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017, (2017).
7. Castellanos Ramos, I. G. & Alcalá Pérez, D. Antioxidants in Dermatology. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica* 8, 272–277 (2010).
8. Megías, M., Molist, P. & Pombal, M. Atlas de Histología Vegetal y Animal. <https://mmegias.webs.uvigo.es/8-tipos-celulares/queratinocito.php> (2023).
9. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 124886, Glutathione. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glutathione> (2024).
10. Alanazi, A. M., Mostafa, G. A. E. & Al-Badr, A. A. Chapter two: Glutathione. *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol* 40, 43–158 (2015).
11. Assali, M. & Zaid, A. N. Features, applications, and sustainability of lipid nanoparticles in cosmeceuticals. *Saudi Pharmaceutical Journal* vol. 30 53–65 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2021.12.018> (2022).
12. Koo, S. H., Lee, J. S., Kim, G. H. & Lee, H. G. Preparation, characteristics, and stability of glutathione-loaded nanoparticles. *J Agric Food Chem* 59, 11264–11269 (2011).
13. Öztürk, E. & Temiz, U. Encapsulation Methods and Use in Animal Nutrition. *Selcuk Journal of Agricultural and Food Sciences* 32, 624–631 (2018).
14. Külkamp-Guerreiro, I. C. *et al.* Influence of nanoencapsulation on the sensory properties of cosmetic formulations containing lipoic acid. *Int J Cosmet Sci* 35, 105–111 (2013).
15. Gomes, C., Silva, A. C., Marques, A. C., Lobo, J. S. & Amaral, M. H. Biotechnology applied to cosmetics and aesthetic medicines. *Cosmetics* 7, (2020).
16. Hiroshi Ikeno, Takumi Tochio, Hiroshi Tanaka & Satoru Nakata. Decrease in glutathione may be involved in pathogenesis of acne vulgaris. *J Cosmet Dermatol* 10, 240–244 (2011).

17. Etnawati, K., Adiwiniarni, D. R., Susetiati, D. A., Sauchi, Y. & Ito, H. The efficacy of skin care products containing glutathione in delivering skin lightening in Indonesian women. *Dermatol Reports* 11, 8013 (2019).
18. Chutoprapat, R. *et al.* Development of solid lipid microparticles (SLMs) containing asiatic acid for topical treatment of acne: Characterization, stability, in vitro and in vivo anti-acne assessment. *Int J Pharm* 654, (2024).
19. Ni, C. *et al.* Hyaluronic acid and HA-modified cationic liposomes for promoting skin penetration and retention. *Journal of Controlled Release* 357, 432–443 (2023).
20. Grupo de Investigación en Diseño y Formulación de Productos Químicos y Derivados. PROTOCOLO PARA EL DESARROLLO DE SISTEMAS NANO-LIPOSOMALES RECUBIERTOS CON POLIELECTROLITOS. *Universidad Icesi Preprint at* (2022).
21. Minitab. ¿Qué son los diseños de superficie de respuesta, los diseños centrales compuestos y los diseños de Box-Behnken? (2024).
22. Kong, W. *et al.* Role of size, surface charge, and PEGylated lipids of lipid nanoparticles (LNPs) on intramuscular delivery of mRNA. *Journal of Nanobiotechnology* 22, (2024).
23. Lewińska, A. *et al.* Targeted hybrid nanocarriers as a system enhancing the skin structure. *Molecules* 26, (2021).
24. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. & Berset, C. *Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity*. vol. 28 (1995).
25. Chen, Guang., Sun, Xiaoyu., Zhang, Xiaoru. Cosmetic product containing GSH lipid nano-emulsion. (2015).