

PREPARACIÓN DE SISTEMAS LIPOSOMALES PARA APLICACIÓN COMO
MATRICES DE VEHICULIZACIÓN DE COMPONENTES BIOACTIVOS MODELO

JULIETH DAYANA SÁNCHEZ BENAVIDEZ

UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
PROGRAMA DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS
SANTIAGO DE CALI

2018

PREPARACIÓN DE SISTEMAS LIPOSOMALES PARA APLICACIÓN COMO
MATRICES DE VEHICULIZACIÓN DE COMPONENTES BIOACTIVOS MODELO

JULIETH DAYANA SÁNCHEZ BENAVIDEZ

PROYECTO DE GRADO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE PREGADO EN
QUÍMICA FARMACÉUTICA

TUTOR: CRISTHIAN JAVIER YARCE CASTELLANOS. MSc.

UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS

2018



APROBADO POR:

Constain Hugo Salamanca Ph.D
Evaluador

Cristhian Javier Yarce. MSc
Tutor del Proyecto.

AGRADECIMIENTOS

Le doy gracias a la vida por brindarme la oportunidad de ingresar a la universidad y ofrecerme todos los elementos necesarios para poder culminar una meta más en mi vida.

A mis padres por haberme enseñado desde pequeña que con esfuerzo, dedicación y perseverancia todas mis metas se pueden lograr. Por apoyarme durante todo este proceso, por creerme en mis capacidades, y por estar en los momentos difíciles dándome su amor, paciencia y comprensión.

A mis hermanos, porque ellos siempre estuvieron a mi lado brindándome su apoyo, cariño y sacándome una sonrisa en los momentos en los que más lo necesitaba.

A mis compañeros y amigos que hacen o han hecho parte de mi vida, por compartir conmigo sus conocimientos, por apoyarme en este proceso y vivir conmigo momentos de alegrías y tristezas.

A mi tutor el máster en formulación de productos, Cristhian Yarce y al profesor el Dr. Constain Salamanca, por la formación académica y profesional, por el tiempo dedicado y el apoyo brindado durante el desarrollo de esta investigación.

Finalmente, le doy gracias a todos los que en algún momento fueron mis profesores por haber hecho parte de mi formación académica y profesional.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS.....	7
LISTA DE FIGURAS	8
ABSTRACT.....	10
1. INTRODUCCIÓN.....	11
2. PLANTEAMIENTO DEL PROYECTO Y JUSTIFICACIÓN	13
3. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	14
3.1. MARCO TEÓRICO	14
3.1.1. Acné.....	14
3.1.2. Los peelings químicos en el acné	16
3.1.3. Liposomas.....	16
3.1.4. CLASIFICACIÓN DE LOS LIPOSOMAS	17
3.1.5. Método de preparación de liposomas	18
3.1.6. Tamaño de partícula	20
3.1.7. Potencial Zeta	21
3.1.8. Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)	23
3.1.9. Ácido trans aconítico.....	24
3.2. ESTADO DEL ARTE	25
4. OBJETIVOS	26
5. MATERIALES Y MÉTODOS	27
5.1. MATERIALES.....	27
5.2.1. Preparación de liposomas.....	27
5.2.2. Caracterización de liposomas	29
5.2.3. Cuantificación de ácido trans aconítico encapsulado.....	29
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
7.1.1. Resultados del análisis estadístico.....	31
7.1.2. Análisis de prueba de comparación múltiple de Tukey.....	37
7.1.3. Resumen de la caracterización de liposomas	40
7.1.3. Relación entre la concentración de TAA encapsulado y la eficiencia de encapsulación	42
7.1.4. Predicción de respuestas con base en los resultados del modelo estadístico.....	44
7. CONCLUSIONES.....	46
8. RECOMENDACIONES.....	47
9. BIBLIOGRAFÍA	48

ANEXO 1: ANÁLISIS DE LOS SUPUESTOS DE NORMALIDAD Y HOMOCEDASTICIDAD.....	52
ANEXO 2: DISEÑO EXPERIMENTAL	56
ANEXO 3. CARACTERIZACIÓN DE LIPOSOMAS	62
ANEXO 4. CURVA DE CALIBRACIÓN Y METODOLOGÍA UTILIZADA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO TRANS ACONÍTICO	65
1. PROCEDIMIENTO PARA CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO TRANS ACONÍTICO.....	65
1.1. Preparación de fase móvil:	65
1.2. Preparación de curva de calibración de estándares de ácido trans aconítico:.....	66
1.3. Preparación de la muestra de ácido trans aconítico:	66
1.4. Preparación de las muestras de ácido trans aconítico no encapsulado: 67	
ANEXO 5. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO TRANS ACONÍTICO NO ENCAPSULADO.....	68
ANEXO 6. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO TRANS ACONÍTICO ENCAPSULADO	71
ANEXO 7. PROTOCOLO DE PREPARACIÓN DE SISTEMAS LIPOSOMALES PARA APLICACIÓN COMO MATRIZ DE VEHICULIZACIÓN DE ÁCIDO TRANS ACONÍTICO.....	72

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Diseño experimental.....	29
Tabla 2. Resumen del análisis de varianzas (Minitab Inc, 2015)	31
Tabla 3. Resultados estadísticamente significativos de la prueba de comparación múltiple de Tukey (Minitab Inc, 2015)	37
Tabla 4. Caracterización de liposomas (Minitab Inc, 2015).....	40
Tabla 5. Resumen del análisis de varianzas (Minitab Inc, 2015)	36
Tabla 6. Diseño experimental factorial para determinación de variables óptimas.	56
Tabla 7. Caracterización de liposomas.....	62
Tabla 8. Concentración de TAA antes y después de la preparación de liposomas.....	65
Tabla 9. Datos de áreas obtenidos para los diferentes estándares de TAA	67
Tabla 10. Datos de Área y Concentración de TAA para cada una de las diferentes muestras control evaluadas	68
Tabla 11. Datos de Áreas y Concentración de TAA no encapsulado	69
Tabla 12. Datos de eficiencia de encapsulación de ácido trans aconítico.....	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fisiopatología del acné. a. Obstrucción folicular: acúmulo de sebo; b. proliferación bacteriana de <i>P. acnes</i> : papel en la formación del microcomedón y en la fase inflamatoria; c. hipersecreción sebácea; 1. epidermis; 2. conducto folicular; 3. glándula sebacea (Ballanger & Dreno, 2010).	15
Figura 2. Diferencia entre liposomas y micelas (Tomé, 2014).	16
Figura 3. Clasificación de liposomas y sus tamaños relativos. Vesículas unilaminares simples (SUV), vesículas multilaminares (MLV), vesículas unilaminares grandes (LUV) (Chinnagounder, Leijten, Dijkstra, Karperien, & Post, 2012).	17
Figura 4. Curva de energía neta de interacción (Zeta-Meter, 2015).	22
Figura 5. Potencial Zeta contra distancia (Zeta-Meter, 2015).	22
Figura 6. Visualización de la doble capa (Zeta-Meter, 2015).	23
Figura 7. Diagrama de un sistema de HPLC (Merck, 2017).	24
Figura 8. Estructura química del ácido trans aconítico (Piang-Siong et al., 2017).	24
Figura 9. Procedimiento de preparación de liposomas	28
Figura 10. Gráfica factorial para el diámetro promedio de liposoma (Minitab Inc, 2015).	32
Figura 11. Gráfica factorial para el índice de polidispersidad (Minitab Inc, 2015) ..	33
Figura 12. Gráfica factorial para el potencial zeta (Minitab Inc, 2015)	34
Figura 13. Gráfica factorial para conductividad eléctrica (Minitab Inc, 2015)	35
Figura 16. Diferencias de las medias para Potencial zeta (Fuerza iónica) (Minitab Inc, 2015)	38
Figura 17. Diferencias de las medias para la conductividad eléctrica (Minitab Inc, 2015).	39
Figura 18. Diferencia de las medias del porcentaje de eficiencia de encapsulación (Minitab Inc, 2015).	40
Figura 19. Distribución de tamaño de partícula (Minitab Inc, 2015)	41
Figura 22. Optimización de respuestas para obtener un porcentaje de eficiencia de encapsulación máximo (Minitab Inc, 2015)	44
Figura 23. Optimización de respuestas si se requiere un mínimo índice de polidispersidad y un máxima potencial zeta (Minitab Inc, 2015)	45
Figura 22. Prueba de normalidad de tamaño de partícula (Minitab Inc, 2015)	52
Figura 23. Prueba de normalidad del índice de polidispersidad (Minitab Inc, 2015)	53
Figura 24. Prueba de normalidad del potencial zeta (Minitab Inc, 2015)	53
Figura 25. Prueba de homocedasticidad de varianzas para el tamaño de partícula (Minitab Inc, 2015).	54
Figura 26. Prueba de homocedasticidad de varianzas para el índice de polidispersidad (Minitab Inc, 2015)	55
Figura 27. Prueba de homocedasticidad de varianzas para el potencial zeta (Minitab Inc, 2015)	55
Figura 28. Distribución del potencial zeta (Minitab Inc, 2015)	63
Figura 29. Distribución de la conductividad eléctrica (Minitab Inc, 2015)	64
Figura 30. Curva de calibración	67

RESUMEN

En los últimos años se ha evidenciado la tendencia de la industria cosmética por dirigir sus investigaciones a la obtención de cosméticos funcionales. Además, se busca que gran parte de los componentes utilizados para su fabricación, sean obtenidos a partir de la biodiversidad colombiana. De acuerdo con esto, la vehiculización de ácido trans aconítico (TAA) -compuesto generado a partir de la extracción de caña de azúcar- en sistemas liposomales podría generar una alternativa viable, ya que, a partir de estos, los compuestos activos pueden ser absorbidos de manera eficaz por las células de primera capa de la epidermis.

Teniendo en cuenta lo anterior, durante este estudio se prepararon sistemas liposomales mediante la técnica de inyección de etanol. La composición de estas nanoestructuras es dada por la combinación de colesterol, epikuron 145, epikuron 200 y TAA como componente a encapsular. Los sistemas liposomales obtenidos fueron caracterizados mediante técnicas instrumentales de dispersión de luz dinámica (DLS) y movilidad electroforética, por medio del Zetasizer Malvern Instruments. Mientras que la cantidad de TAA encapsulado fue determinado por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

Los resultados promedio para la caracterización de los liposomas arrojó un tamaño de partícula de 246,54 nm, un índice de polidispersidad de 0,251, un potencial zeta de -9,702 y una eficiencia de encapsulación promedio de 61,49%. Se encontró que las variables significativas en la encapsulación del ingrediente activo son; los niveles de concentración, tiempo de reposo y fuerza iónica. De igual manera, se obtuvo que, si se desea obtener un índice de polidispersidad mínimo, y un potencial zeta y porcentaje de eficiencia de encapsulación máximos, es necesario utilizar una concentración de TAA de 2000 ppm, una fuerza iónica de 10 mM y un tiempo de reposo de 5 minutos. Adicionalmente, debido a la estrategia de diseño experimental utilizada, es posible predecir los valores de eficiencia de encapsulación por medio de la maximización, minimización o definición objetivo de las variables.

Palabras claves: Liposomas, inyección de etanol, ácido trans-aconítico, nanovehiculización, nanosistemas.

ABSTRACT

In recent years, the trend in cosmetic industry points toward researching to obtain functional cosmetics. In addition, it is sought that much of the components used for its manufacture, are obtained from Colombian biodiversity. According to this, the vehiculization of trans aconitic acid (TAA) -compound generated from the extraction of sugar cane- in liposomal systems could generate a great potential, since, from these, the active compounds can be absorbed effectively by the cells of the dermis.

Considering the above, during this study, liposomal systems were performed using the ethanol injection technique, using cholesterol, epikuron 145 and epikuron 200, for the vehiculization of TAA. The liposomal systems obtained were characterized by instrumental techniques of dynamic light scattering (DLS) and electrophoretic mobility, by means of the Zetasizer Malvern Instruments. While the amount of encapsulated TAA was determined by high performance liquid chromatography (HPLC).

The average results for the characterization of the liposomes showed a particle size of 246.54 nm, a polydispersity index of 0.251, a zeta potential of -9.702 and an average encapsulation efficiency of 61.49%. It was found that the significant variables in the encapsulation of the active ingredient are; the levels of concentration, resting time and ionic strength. Likewise, it was obtained that, if it is desired to obtain a minimum polydispersity index, and a zeta potential and percentage of maximum encapsulation efficiency, it is necessary to use a TAA concentration of 2000 ppm, an ionic strength of 10 mM and a time of rest of 5 minutes. Additionally, due to the experimental design strategy used, it is possible to predict encapsulation efficiency values by means of maximization, minimization or objective definition of the variables.

Keywords: Liposomes, ethanol injection method, transconitic acid, nanoencapsulation, nanosystems.

1. INTRODUCCIÓN

Una de las grandes limitaciones del sector cosmético y dermatológico, se encuentra relacionado con la baja absorción de los componentes activos por la piel, lo cual limita la acción de dichos compuestos y aumenta la probabilidad de generar efectos adversos o tóxicos (Vera Toledo, 1995). Una alternativa a la vehiculización de los componentes activos de uso tópico consiste en la implementación de un vehículo de escala nano, pero que además sea afín a los componentes de la piel. Teniendo en cuenta lo anterior, los liposomas representan uno de los vehículos más versátiles a la hora de transportar componentes activos, debido a que, al ser biocompatibles con la piel, incrementan la eficacia de los componentes y minimiza los efectos adversos no deseados al reducir su posible toxicidad (Activos, 2015).

Los liposomas son vesículas lipídicas de tamaño nanométrico, formados por una o múltiples bicapas lipídicas que encierran una fase acuosa. Los liposomas ofrecen múltiples ventajas como portadores de fármacos o componentes activos, por ejemplo; son biodegradables, no tóxicos y pueden encapsular sustancias hidrófilas e hidrófobas. A su vez, son similares a la epidermis con respecto a su composición lipídica, lo que les permite penetrar en la barrera epidérmica en mayor medida en comparación con otras formas de dosificación convencionales. La mayoría de liposomas aplicados tópicamente sobre la piel se acumulan en las capas superiores del estrato córneo y funcionan como un “reservorio” proporcionando una acción más localizada (Hua, 2015).

Dentro de los métodos de preparación de liposomas, se encuentra el método de inyección de etanol. En este método, una fase orgánica se dispersa en una fase acuosa mediante inyección rápida. Desde el punto de vista de fabricación, este método tiene la ventaja de ser rápido, simple, fácilmente escalable y seguro. Además, no promueve la degradación ni la alteración oxidativa de la gran mayoría de lípidos y agentes activos a encapsular (Rodríguez & Moraes, 2011).

Por otro parte, durante la fabricación del azúcar se generan diferentes residuos de desechos, como lo son las hojas, el bagazo y la melaza. Sin embargo, existen otros componentes que se encuentran presentes en el jugo de caña, los cuales son eliminados durante el proceso de extracción o purificación. Dentro de estos componentes es posible encontrar los ácidos orgánicos, como el ácido glicólico, el ácido málico, el ácido cítrico y el ácido aconítico (cis-aconítico y trans-aconítico). De los cuales uno de los que representa mayor porcentaje es el ácido trans aconítico (TAA), el cual ha sido extraído por el grupo de investigación de productos naturales. Por otro lado, se cree que el TAA podría ser utilizado en formulaciones cosméticas y dermatológicas, con un efecto de peeling químico, actuando como exfoliante y, por ende, aumentando la permeabilidad de la piel. (Posada, 2013).

Teniendo en cuenta que uno de los probables usos del TAA se encuentra en el sector cosmético y dermatológico y, la similitud de los componentes de los sistemas liposomales, con los de la piel junto con potencial de los liposomas en el transporte y vehiculización de medicamentos y componentes activos a través de las diferentes capas de la esta, se prepararon liposomas mediante la técnica de inyección de etanol para la vehiculización de TAA. Todo esto con el objetivo de evaluar la encapsulación componentes bioactivos como el TAA en sistemas liposomales que puedan contribuir en el sector cosmético.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROYECTO Y JUSTIFICACIÓN

¿PUEDE SER UTILIZADO EL ÁCIDO TRANS ACONÍTICO COMO COMPONENTE BIOACTIVO EN SISTEMAS LIPOSOMALES?

Se estima que para el 2032 Colombia será reconocida como líder mundial en producción y exportación de cosméticos, productos de aseo del hogar y absorbentes de alta calidad con base en ingredientes naturales. Para lo cual, el Programa de Transformación Productiva (PTP), se ha propuesto promover el uso comercial de ingredientes naturales de la biodiversidad colombiana, garantizando con esto el acceso a insumos a precios competitivos, diversificar hacia nuevos mercados e implementar mejores prácticas productivas, de sostenibilidad e innovación (Programa de Transformación Productiva, 2016).

Por otra parte, el laboratorio de productos naturales de la universidad Icesi ha venido trabajando en los últimos años en la extracción de ácido trans aconítico. El ácido trans aconítico es uno de los ácidos orgánicos desechados en el proceso de extracción y purificación del jugo de caña de azúcar, dado que se convierte en una interfaz de este proceso. Dentro de los ácidos orgánicos desechados en este proceso se encuentran, el ácido málico, el ácido cítrico, el ácido glicólico y el ácido aconítico (cis-aconítico y trans-aconítico), los cuales han sido utilizados en formulaciones cosméticas y dermatológicas por su uso como peeling químico. Por ende, es de pensarse que el ácido trans aconítico tenga gran potencial como componente en formulaciones cosméticas (Posada, 2013).

A su vez, el grupo de investigación de fisicoquímica farmacéutica de la universidad Icesi se encuentra trabajando en el diseño y formación de liposomas. Dentro de las aplicaciones de los liposomas se encuentra su uso como matriz cosmética, dado que, al ser formados mediante componentes biocompatibles y no tóxicos, lo hacen fácilmente absorbibles por las células de la dermis.

Por tanto, el uso de ácido trans aconítico como componente bioactivo en sistemas liposomales, permite innovar en las investigaciones del área cosmética en Colombia. Además, este proyecto podría aportar en el PTP, dado que implementa componente de la biodiversidad colombiana que normalmente son desechados. Al mismo tiempo, se estaría disminuyendo los desechos de la caña de azúcar y contribuyendo al desarrollo de la bioprospección de productos naturales en el Valle del Cauca.

3. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

3.1. MARCO TEÓRICO

3.1.1. Acné

El acné es una de las disfunciones dermatológicas más frecuentes de la piel. Puede presentarse en cualquier edad, aunque suele ser más común durante la pubertad, llegando a afectar a un 80% de la población en alguna de sus formas. Es una condición inflamatoria crónica de las unidades pilosebáceas de la piel, caracterizada por la formación de pápulas, quistes, comedones, pústulas y, en algunas ocasiones, nódulos o cicatrices. Estas lesiones se suelen localizar en el rostro y en los hombros, aunque se pueden extender a tronco, brazos y piernas (Bernabéu, 2008).

Se puede definir el acné como una enfermedad inflamatoria de etiología multifactorial que afecta la unidad pilosebácea con la intervención del *Propionibacterium acnes* y otras bacterias como *Staphylococcus aureus* y *albus* (Grimalt, 2007).

Los factores etiopatogénicos del acné se pueden dividir en tres (ver Figura 1):

- **Hiperseborrea e influencia hormonal.**

La hiperseborrea es un aumento de la producción de sebo por parte de la glándula sebácea como consecuencia de una acción hormonal. Por medio de la enzima 5-alfa-reductasa, la testosterona se transforma en dihidrotestosterona (DHT). El DHT tiene un receptor específico en los sebocitos de la glándula sebácea, lo cual se traduce en mayor producción de sebo cuando los niveles de testosterona se encuentran aumentados (Bernabéu, 2008). Sin embargo, en la mayoría de los pacientes acnéicos no existe alteración hormonal y la concentración de testosterona se encuentra dentro de los niveles normales. Una explicación de este hecho es la hipersensibilidad de los receptores a los andrógenos (testosterona y dihidrotestosterona) a nivel de la glándula sebácea y por un aumento de la producción de andrógenos mediante un precursor sulfato de dehidroepiandrosterona (S-DHEA), a través de los sistemas enzimáticos presentes no sólo a nivel de la glándula sebácea sino también a nivel de los queratinocitos del infundíbulo folicular (Ballanger & Dreno, 2010).

- **Hiperqueratinización folicular anómala y obstrucción infundibular.**

La hiperqueratinización es la formación de microcomedones causados por la proliferación acelerada y anormal de los queratinocitos intracanaliculares y a un aumento de la adhesión de los corneocitos entre ellos. La secuenciación completa de *P. acnes* ha permitido comprobar que esta bacteria participa en la formación del microcomedón y, por ende, en las lesiones de origen obstructivo, ya que produce un pegamento biológico que le permite adherirse a las paredes epiteliales y organizarse a modo de biopelícula. El pegamento biológico secretado por *P. acnes*,

mezclado con el sebo, es lo que permite la adhesión de esta bacteria y también de los corneocitos (Ballanger & Dreno, 2010). Por otra parte, según el grado de bloque del conducto, hoy en día se conocen dos tipos de microcomedones. Los comedones abiertos o puntos negros, los cuales no suelen dar lugar a lesiones inflamatorias si no se manipula, y los comedones cerrados o puntos blancos, que si pueden causar inflamación (Bernabéu, 2008).

- **Papel primordial de *P. acnes* en la fase inflamatoria del acné.**

La hiperqueratinización y el aumento del sebo generan un ambiente anaerobio que favorece la colonización bacteriana de *Staphylococcus epidermidis*, y *P. acnes* a nivel del folículo pilosebáceo. Estos microorganismos liberan lipasas y proteasas que hidrolizan triglicéridos de sebo generando ácidos grasos libres, que son irritantes y comedogénicos. Además, estos ácidos grasos tienen capacidad quimiotáctica y atraen neutrófilos y macrófagos que interviene en la aparición de la lesión inflamatoria (Bernabéu, 2008). Por otra parte, en la actualidad no existe una correlación demostrada entre la importancia de las lesiones inflamatorias acnéicas y el número de bacterias de *P. acnes* en la superficie de la piel, lo que hace suponer que *P. acnes* actúa más por un mecanismo inflamatorio que infeccioso (Ballanger & Dreno, 2010).

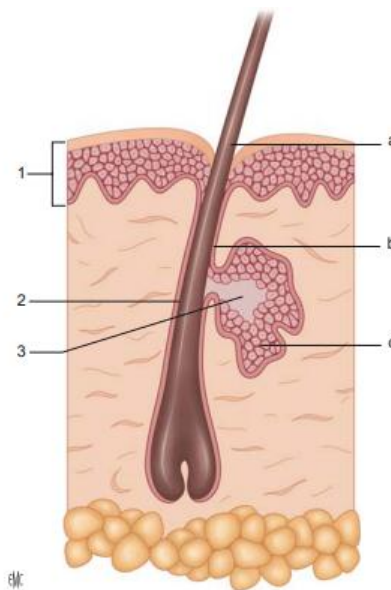


Figura 1. Fisiopatología del acné. **a.** Obstrucción folicular: acúmulo de sebo; **b.** proliferación bacteriana de *P. acnes*: papel en la formación del microcomedón y en la fase inflamatoria; **c.** hipersecreción sebácea; **1.** epidermis; **2.** conducto folicular; **3.** glándula sebácea (Ballanger & Dreno, 2010).

3.1.2. Los peelings químicos en el acné

El peeling químico es un procedimiento ampliamente utilizado en el tratamiento del acné y las cicatrices de este. Los peelings químicos se utilizan para; crear una lesión controlada de la piel inducida por químicos, destruir la epidermis (peeling superficial) y parte de la dermis (peeling medio o profundo), promover la regeneración de la piel y remodelar los tejidos. Los agentes de peeling usados con mayor frecuencia se encuentran son ácido salicílico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido mandélico, solución de Jessner, ácido tricloroacético y fenol (Kontochristopoulos & Platsidaki, 2017).

3.1.3. Liposomas

Los liposomas se descubrieron por primera vez en 1961 por Brangham y colaboradores, quienes observaron que algunos lípidos formaban estructuras membranosas cuando estaban en disolución acuosa. A partir de ahí se dedujo que los liposomas son vesículas que se encuentran formadas por una bicapa de fosfolípidos, y que, además, puede tener incorporados colesterol, tocoferol, sondas fluorescentes u otros materiales (Ruano, 2013). En las bicapas, los fosfolípidos se disponen orientados con las cadenas hidrófobas situadas paralelamente entre si - constituyendo una capa- y opuestas a las cadenas hidrófobas de la otra capa. Dado que todas las cabezas polares se encuentran en un mismo lado, es posible aislar una amplia zona hidrófoba, lo cual forma una estructura concéntrica, alternando con compartimientos acuosos. La distribución descrita, resulta similar a las micelas formadas mediante tensoactivos en medio acuoso, con la diferencia que las micelas pueden contener lípidos en su estructura interna, mientras que los liposomas en su cavidad interna solo contienen agua o una solución acuosa de un principio activo. En la Figura 2 se muestra la diferencia estructural entre liposomas y micelas (Naveros, 2003).

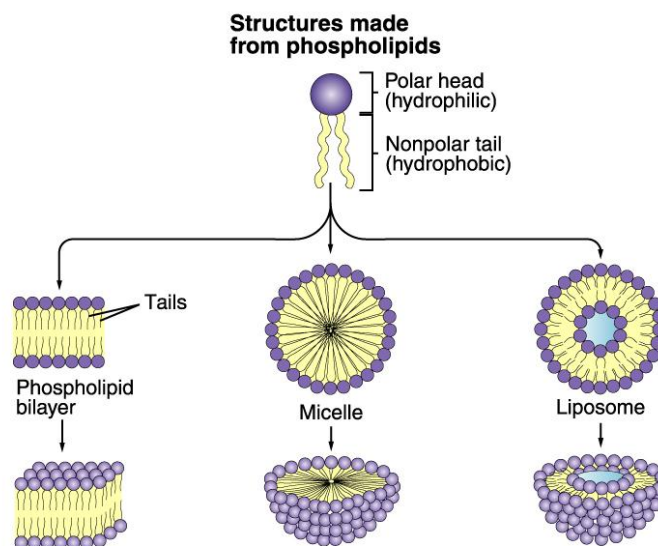


Figura 2. Diferencia entre liposomas y micelas (Tomé, 2014).

Las células vivas utilizan liposomas para el transporte de moléculas, como parte de su metabolismo. Teniendo en cuenta que los liposomas se preparan mediante lípidos que se encuentran presentes en el organismo (haciéndolos biocompatibles), es posible utilizar liposomas artificiales para el transporte de principios activos. Por otra parte, los liposomas pueden atrapar compuestos hidrófobos e hidrófilos, evitando la descomposición de las combinaciones atrapadas y liberando los atrapados a los objetivos designado. Lo anterior permite que este tipo de sistemas prolonguen la permanencia del principio activo en el organismo y mejoren la distribución del mismo (Bayas & Brito, 2009). Por tanto, la biocompatibilidad, biodegradabilidad, baja toxicidad y aptitud para atrapar fármacos tanto hidrófilos y lipofílicos les permiten a los liposomas ser ampliamente utilizados como portadores de numerosas moléculas en la industria cosmética y farmacéutica. Asimismo, la industria alimentaria y agrícola ha estudiado ampliamente el uso de liposomas para desarrollar sistemas liposomales que puedan atrapar compuestos inestables (por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes y elementos bioactivos) y proteger su funcionalidad (Akbarzadeh et al., 2013).

3.1.4. CLASIFICACIÓN DE LOS LIPOSOMAS

El tamaño de los liposomas puede variar desde vesículas muy pequeñas (0,0025 μm), a vesículas grandes (2,5 μm). Además, los liposomas pueden tener de una o más bicapas. Estos parámetros afectan la cantidad de encapsulación de los componentes en los liposomas. Teniendo en cuenta el tamaño y número de bicapas, los liposomas también se pueden clasificar en dos categorías: vesículas multilaminares (MLV) y vesículas unilaminares (UV). A su vez, las vesículas UV se clasifican en dos categorías: vesículas unilaminares grandes (LUV) y vesículas unilaminares pequeñas (SUV) (Figura 3). En los liposomas unilaminares, la vesícula es una esfera formada por una sola bicapa de fosfolípidos, mientras que los liposomas multilaminares tienen una estructura como la de una “cebolla”, es decir, varias vesículas unilaminares en el interior de otra, formando una estructura multilaminar de esferas de fosfolípidos concéntricas separadas por capas de agua.

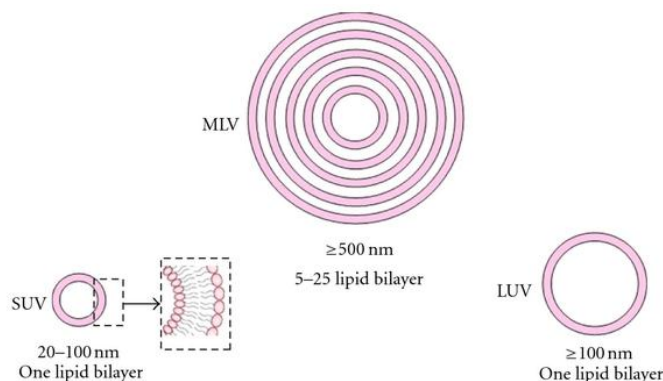


Figura 3. Clasificación de liposomas y sus tamaños relativos. Vesículas unilaminares simples (SUV), vesículas multilaminares (MLV), vesículas unilaminares grandes (LUV) (Chinnagounder, Leijten, Dijkstra, Karperien, & Post, 2012).

3.1.5. Método de preparación de liposomas

Todos los métodos de preparación de liposomas implican cuatro etapas básicas: secado de los lípidos del disolvente orgánico, dispersión del lípido en medio acuoso, purificación de los liposomas resultantes y análisis del producto final (Akbarzadeh et al., 2013). La mayoría de los liposomas se fabrican mediante procedimientos en los cuales los materiales hidrófilos (solubles en agua) se adicionan utilizando soluciones acuosas en alguna etapa durante la fabricación, lo cual permite que estos materiales queden atrapados en el interior de las vesículas. A su vez, los materiales lipófilos (solubles en lípidos) se solubilizan en la solución orgánica, quedando atrapados en la película de los liposomas. Estas técnicas se denominan de carga pasiva, dado que implican la carga de los agentes atrapados antes o durante el procedimiento de fabricación. Sin embargo, ciertos tipos de compuestos con grupos ionizables, y aquellos que muestran tanto solubilidad en lípidos como en agua, se pueden introducir en los liposomas después de la formación de vesículas intactas. Estas técnicas se denominan de carga remota (Dua, Rana, & Bhandari, 2012).

Las técnicas de carga pasivas incluyen tres métodos diferentes, métodos de dispersión mecánica, de dispersión de disolvente y de eliminación del detergente, los cuales se describen a continuación:

MÉTODOS DE DISPERSIÓN MECÁNICA

Sonicación: La sonicación es uno de los métodos más ampliamente utilizados para la preparación de liposomas de SUV. En este método, las MVL son sonicadas mediante un sonicador tipo baño o un sonicador de sonda bajo una atmósfera pasiva. Sin embargo, este método presenta diferentes desventajas, como lo son: baja eficacia de encapsulación, la posible degradación de los fosfolípidos y los compuestos a encapsular y, además, producen liposomas de diferentes tamaños (principalmente MLV con SLV). Lo anterior, hace que esta técnica no sea fácilmente escalable (Akbarzadeh et al., 2013).

Extrusión: La extrusión o celda de presión francesa implica la extrusión de MLV a 20,000 psi a 4 °C a través de un pequeño orificio. El método tiene varias ventajas sobre el método de sonicación. Es un método simple, rápido, reproducible y, además, los liposomas resultantes son SUV más grandes que sonicados. Los inconvenientes del método son que la temperatura es difícil de alcanzar y los volúmenes de trabajo son relativamente pequeños (aproximadamente 50 ml máximo) (Dua et al., 2012).

Liposomas congelados-descongelados: En el procedimiento de los liposomas congelados-descongelados, estos son rápidamente congelados y lentamente descongelados. La sonicación de corta duración utilizada en este método dispersa los materiales agregados a LUV. La creación de vesículas unilaminares se genera mediante la fusión de SUV a lo largo de los procesos de congelación y descongelación. La repetición del proceso de congelación-descongelación produce

alteraciones físicas en la bicapa de los fosfolípidos de los liposomas. Por otra parte, se ha observado que eficacias de encapsulación del procedimiento es del 20 al 30% (Akbarzadeh et al., 2013).

MÉTODOS DE DISPERSIÓN DE DISOLVENTE

Inyección de éter (vaporización del disolvente): El método de inyección de etanol consiste en la inyección lenta de una solución de lípidos disueltos en éter dietílico o mezcla éter/metanol en una solución acuosa del material a encapsular a 55-65 °C o bajo presión reducida. Posteriormente, se elimina el éter mediante vacío, lo que genera la formación de los liposomas. Los principales inconvenientes de este método son la generación de una población heterogénea (70 a 200 nm) y la exposición de los compuestos a encapsularse a disolventes orgánicos o a altas temperaturas (Akbarzadeh et al., 2013).

Inyección de etanol: El método de inyección de etanol fue descrito por primera vez por Batzri y Korn, y ha demostrado ser eficaz en la preparación de SUV. En este método, los fosfolípidos y otras sustancias lipófilas se disuelven en un medio orgánico (etanol), y posteriormente, se inyectan en una gran cantidad de tampón acuoso, generando así la formación espontánea de SUV. Sin embargo, en algunas investigaciones se ha descrito que la formación de los liposomas no se encuentra relacionada con el sistema de inyección, sino que es la expansión de una fase orgánica -miscible en agua- en una fase acuosa, lo que desencadena el autoensamblaje de los fosfolípidos para formar liposomas. Dentro de las ventajas de la utilización de este método, se destacan que es un procedimiento simple, rápido y se lleva a cabo bajo condiciones suaves. No obstante, generan una población heterogénea (30-100 nm), se presenta el riesgo de degradación de la molécula activa por etanol, al realizar una dilución significativa de los liposomas se genera una baja eficacia de encapsulación, y se dificulta la eliminación del etanol debido a la formación de azeótropos con agua (Sala, Miladi, Agusti, Elaissari, & Fessi, 2017).

Es importante reconocer que este método de obtención de liposomas es el que mayor interés representa, ya que, teniendo en cuenta las ventajas descritas anteriormente, será el método utilizado en este proyecto.

Evaporización de la fase reversa: Mediante el método la evaporización de la fase inversa se pueden obtener vesículas con un espacio central acuoso más voluminoso. En este método se parte de una solución de fosfolípidos en un solvente orgánico los cuales se mezclan con una fase normalmente acuosa, esta mezcla se emulsifica obteniendo una suspensión de micelas invertidas. Posteriormente, se elimina el solvente produciendo, una agregación de micelas que conduce a la formación de una estructura tipo gel, la cual se rompe cuando se incrementa el grado de vacío aplicado para lograr la completa eliminación del disolvente. Las monocapas lipídicas que constituyen las micelas se sitúan cerca unas de otras, dando lugar a la formación de la bicapa lipídica que constituyen la pared de los liposomas (Ramírez, 2015).

Este método permite obtener un alto rendimiento de encapsulación de hasta un 65% en un medio de baja fuerza iónica, por ejemplo, NaCl 0,01 M, y encapsular pequeñas, grandes y macromoléculas. El principal inconveniente de este método es el contacto de los materiales a encapsular con los disolventes orgánicos, y los breves períodos de sonicación. Estas condiciones pueden resultar en la ruptura de las cadenas de ADN o la desnaturalización de algunas proteínas (Akbarzadeh et al., 2013).

MÉTODOS DE ELIMINACIÓN DE DETERGENTE (ELIMINACIÓN DE MATERIAL NO ENCAPSULADO)

Los disolventes en su concentración crítica micelar (CMC) han sido utilizados para solubilizar los lípidos. A medida que se elimina el detergente, las micelas se vuelven ricas en fosfolípidos de manera progresiva, y finalmente se combinan para formar LUV. Los detergentes pueden ser eliminados mediante diálisis. Las ventajas del método de diálisis es una excelente reproducibilidad y producción de población de liposomas que son de tamaños homogéneos (Akbarzadeh et al., 2013). Los principales inconvenientes de esta técnica son la baja concentración final de vesículas en el medio, la baja eficacia en la encapsulación de compuestos hidrofóbicos, la larga duración del proceso y los residuos de detergente en el medio (Muñoz, 2011).

3.1.6. Tamaño de partícula

Una de las propiedades físicas más relevante de las muestras es el tamaño de partícula. La dispersión de luz dinámica (DLS) es una técnica ampliamente utilizada para la medición de esta propiedad. Esta técnica mide el movimiento browniano y lo relaciona con el tamaño de las partículas. El movimiento browniano, es el movimiento aleatorio de las partículas debido al bombardeo de las moléculas de solvente que las rodean. Una característica importante del movimiento browniano para DLS es que las partículas pequeñas se mueven rápidamente y las partículas grandes se mueven más lentamente (Malvern Instruments Ltd., 2015).

El principio básico de DLS consiste en la emisión de un rayo láser a través de la muestra, la cual emite fluctuaciones que son detectadas en un ángulo específico. Estas fluctuaciones de intensidad en la luz dispersa con el tiempo determinan el coeficiente de difusión transicional (D), y posteriormente el diámetro hidrodinámico. Por lo tanto, el tamaño de partícula es calculado mediante el coeficiente de difusión transicional y la ecuación de Stokes-Einstein (Curtillas, 2014):

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad \text{(Ecuación 1)}$$

Donde:

$d(H)$ = Diámetro hidrodinámico

D = Coeficiente de difusión traslacional

K = Constante de Boltzmann

T = Temperatura absoluta

η = Viscosidad

Cabe señalar que el diámetro medido en DLS es un valor que se refiere a como la partícula se difunde dentro de un fluido por lo que se conoce como un diámetro hidrodinámico. Además, el diámetro que se obtiene con esta técnica es el diámetro de una esfera que tiene el mismo coeficiente de difusión traslacional que la partícula, es decir, la velocidad de difusión es la misma que la media de las velocidades de difusión de sus diferentes orientaciones espaciales. Por lo tanto, el coeficiente de difusión de traslación no dependerá solo del tamaño de partícula, sino también de factores como la estructura de la superficie, así como de la concentración y el tipo de iones en el medio, ya que estos factores afectan la velocidad de difusión y en consecuencia alteran de valor del diámetro hidrodinámico (Malvern Instruments Ltd., 2004).

3.1.7. Potencial Zeta

El potencial Zeta es una medida de la magnitud de la repulsión o atracción electrostática o de carga entre las partículas (Figura 4) (Malvern, n.d.). Esta medida, refleja la diferencia de potencial entre la doble capa eléctrica de las partículas electroforéticamente móviles y la capa de Stern que las rodea (Figura 5). El modelo de la doble capa se utiliza para visualizar la atmosfera iónica de una partícula y para explicar cómo actúan las fuerzas eléctricas de repulsión. En este modelo, la atracción de la partícula negativa hace que algunos iones formen una rígida capa adyacente alrededor, denominada capa de Stern. Mientras que la capa difusa resulta de un equilibrio dinámico, formado cuando otros iones positivos son atraídos por la partícula, pero son rechazados por la capa de Stern y por otros iones positivos que intentan acercarse a la partícula (Figura 6). La partícula negativa y su atmosfera cargada positivamente producen un potencial eléctrico que tiene un valor máximo en la superficie y disminuye gradualmente con la distancia, aproximándose a cero fuera de la capa difusa (Zeta-Meter, 2015).

Por otra parte, si todas las partículas en suspensión tienen un gran potencial zeta (negativo o positivo), es decir, se encuentran fuertemente cargadas, van a tender a repelerse entre sí, evitando la formación de agregados. Sin embargo, si las partículas tienen valores bajos de potencial zeta, entonces no hay fuerza para evitar

que las partículas interacciones y se agreguen. La línea divisoria general entre suspensiones estables e inestables se toma a ± 30 mV. Las partículas con potenciales zeta más positivos que +30 mV o más negativos que -30 mV se consideran normalmente estables (Malvern Instruments Ltd., 2004).

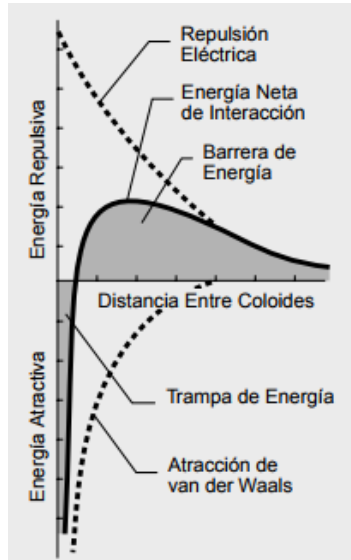


Figura 4. Curva de energía neta de interacción (Zeta-Meter, 2015).

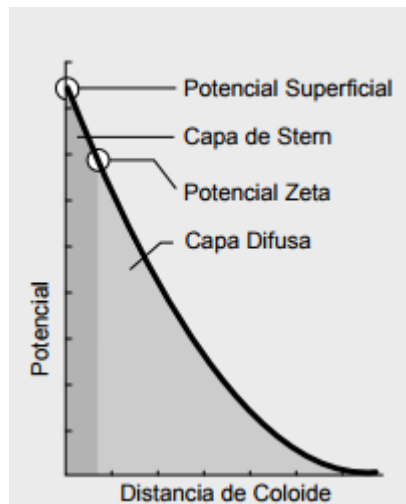


Figura 5. Potencial Zeta contra distancia (Zeta-Meter, 2015).

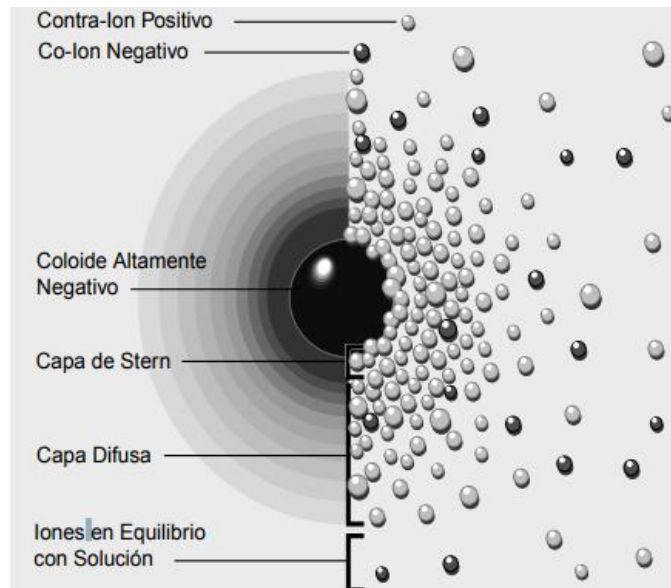


Figura 6. Visualización de la doble capa (Zeta-Meter, 2015).

3.1.8. Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)

La cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) es una de las técnicas analíticas de separación más ampliamente utilizadas. Esta tiene la capacidad de separar, identificar y cuantificar los compuestos que están presentes en cualquier muestra que pueda disolverse en un líquido. La HPLC se puede aplicar, y se ha aplicado, a casi cualquier muestra, como productos farmacéuticos, cosméticos, matrices ambientales, muestras forenses y productos químicos industriales (Waters, 2017).

En la HPLC la separación se logra a través de la distribución de los analitos entre una fase estacionaria empaquetada en una columna y una fase móvil líquida que se bombea a través de la columna. Tradicionalmente, la fase estacionaria era polar (por ejemplo, sílice), mientras que las fases móviles utilizadas eran relativamente no polares. Este modo de HPLC se denomina fase normal. Otro modo de HPLC es el de fase inversa, en el cual, la columna se empaqueta con partículas hidrófobas, por ejemplo, una fase unida a C-18. La fase móvil es cualquier combinación miscible de agua (o agua modificada con ácido o base, o tampones) y un disolvente orgánico como metanol y acetonitrilo. Un modo diferente de HPLC es la cromatografía de extrusión por tamaño, en el que la columna contiene partículas con un tamaño de poro definido que permite que solo pequeñas moléculas penetren en ellas. Las moléculas más grandes en la muestra llegarán primero al detector, seguidas por las más pequeñas y las moléculas del solvente (Merck, 2017).

Un sistema de HPLC se compone de seis módulos básicos (deposito, bomba, inyector, columna, detector y sistema de datos) que se encuentran conectados por tubos y accesorios apropiados, como se muestra en la Figura 7 (Merck, 2017).

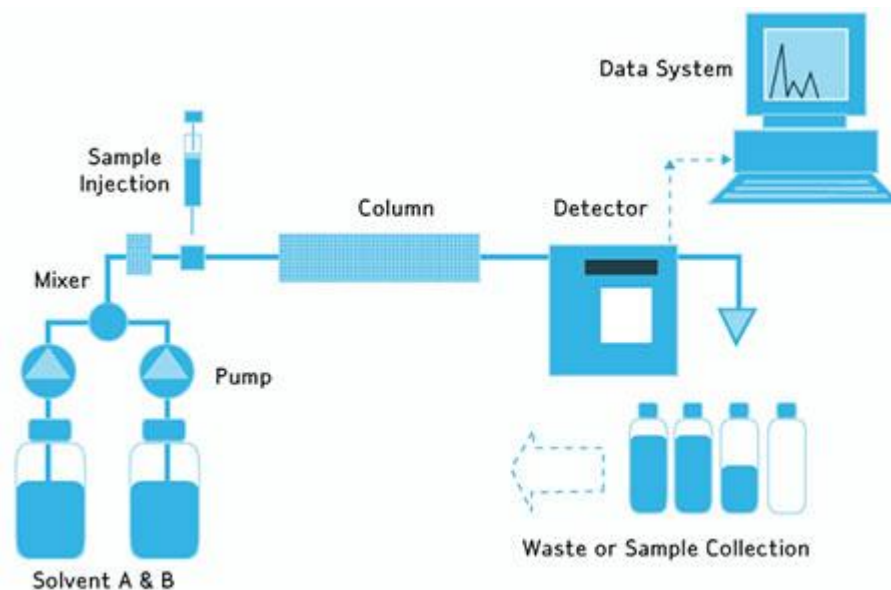


Figura 7. Diagrama de un sistema de HPLC (Merck, 2017).

Dentro de los componentes de HPLC se observa un depósito que contiene el solvente, también llamado “fase móvil”. Una bomba de alta presión encargada de generar un caudal específico de fase móvil. Un inyector que introduce (inyecta) la muestra en la corriente de fase móvil que fluye continuamente, llevando la muestra a la columna de HPLC. La columna se puede denominar el corazón de la HPLC, dado que contiene el material de empaquetamiento cromatográfico (fase estacionaria) necesario para generar la separación. Un detector es usado para observar las bandas de compuestos separados a medida que eluyen de la columna de HPLC. El cambio en el eluyente es detectado por un detector en forma de señal electrónica. Por último, una computadora registra la señal eléctrica necesaria para generar el cromatograma, el cual representa la separación de los analitos (Merck, 2017).

3.1.9. Ácido trans aconítico

El ácido aconítico ($C_6H_6O_6$), M_w 174 g/mol, pK_a 4.46, es un ácido alifático tribásico insaturado que existe en dos formas geométricas diferentes, el isómero trans (TAA) (Figura 8) y el isómero cis. TAA es un sólido cristalino de color blanco o amarillento, con un punto de fusión de $195^\circ C$. Es soluble en agua y alcohol. La solubilidad en agua incrementa de 18,6 g/100 mL a $13^\circ C$ a 110,7 g/100 mL a $90^\circ C$ (Gil, 2007).

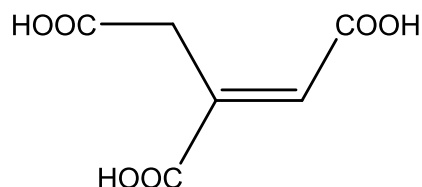


Figura 8. Estructura química del ácido trans aconítico (Piang-Siong et al., 2017).

El isómero cis-aconítico en el cultivo de caña de azúcar es bajo debido a que se usa durante el ciclo de Krebs y no se almacena en la planta, mientras que el isómero trans-aconítico se encuentra disponible en la planta ya que se acumula (Gil, 2007).

Por otra parte, se ha observado que ácidos orgánicos como el ácido glicólico, el ácido málico, el ácido cítrico y el ácido aconítico, los cuales se encuentran presentes en la matriz o jugo de caña de azúcar y son descartados durante los procesos de extracción y purificación, han sido utilizados en formulaciones cosméticas y dermatológicas por sus efectos de peeling químico, actuando como exfoliantes y por tanto aumentando la permeabilidad de la piel. Por ende, uno de los usos potenciales de TAA se encuentra en la industria cosmética, razón por la cual será utilizado en la realización de este proyecto (Posada, 2013).

3.2. ESTADO DEL ARTE

El Ministerio de Industria y Comercio con apoyo de Proexport Colombia, están llevando a cabo el programa de transformación productiva (PTP), que busca fomentar la productividad y la competitividad de 16 sectores de clase mundial, dentro del que se encuentra el sector cosmético. El proyecto está encaminado a mejorar las exportaciones y generar empleo en el país. En el PTP se ha determinado que Colombia en el año 2032 será reconocida como líder mundial en producción y exportación de cosméticos, productos de aseo del hogar y absorbentes de alta calidad con base en ingredientes naturales (Propaís, 2016).

Por otra parte, Colombia cuenta con muy buenas condiciones para desarrollarse en el sector cosmético, por características tales como la biodiversidad e ingredientes naturales en los productos. (Propaís, 2016). Dentro de los compuestos que pueden contribuir en la fabricación de cosméticos a base de productos naturales y con esto en el PTP se encuentra el ácido trans aconítico (TAA). El TAA es un compuesto orgánico presente en la matriz o jugo de la caña de azúcar, el cual es desechado durante el proceso de extracción y purificación. Además, se cree que posee un efecto en peeling químico y que, por ende, puede ser utilizado en formulaciones cosméticas.

Por otra parte, en la actualidad los liposomas se han venido utilizando como ingrediente en algunas cremas y tratamientos de belleza, ya que están diseñados mediante compuestos biocompatibles y no tóxicos para el cuerpo. Además, poseen naturaleza hidrófila y lipófila, lo que les permite transportar muchos compuestos, evitar que estos se degraden y ser absorbidos de manera adecuada por las células de la dermis.

Una de las nuevas líneas de investigación del laboratorio de fisicoquímica farmacéutica se encuentra enfocado en la preparación y utilización de sistemas liposomales. Por ende, este proyecto tiene como objetivo preparar sistemas liposomales que pueden ser utilizados como matrices de vehiculización del ácido trans aconítico. Además, se espera contribuir con la bioprospección y producción de cosméticos con base en ingredientes naturales.

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar sistemas liposomales como sistemas de vehiculización de componentes bioactivos como el ácido trans aconítico de aplicación en la formulación de productos de innovación dirigidos al sector cosmético.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer una metodología de diseño de experimentos, para conocer como afecta la concentración de ácido trans aconítico, tiempo de reposo y fuerza iónica en la preparación de liposomas.
- Evaluar la estabilidad física de los liposomas por medio de la determinación de tamaño de partícula y potencial zeta.
- Obtener un protocolo de preparación de liposomas para vehiculizar ácido trans aconítico con una eficiencia de encapsulación superior al 40%, a partir del método de inyección de etanol.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. MATERIALES

Para la realización de este proyecto se utilizará como agente activo o producto a encapsular el ácido trans aconítico, el cual fue suministrado por el laboratorio de productos naturales de la universidad Icesi. Adicionalmente, se utilizarán como fase orgánica: epikuron 145, epikuron 200 y colesterol, y como fase acuosa, buffer pH 5.5. El agua utilizada fue tipo 1 o ultrapura, obtenida por medio del sistema Elix Essential Millipore®.

5.2. MÉTODOS

5.2.1. Preparación de liposomas

Inicialmente se prepararon 100 μL de fase orgánica, compuesta por 42,4 μL de colesterol, 42,4 μL de Epikuron 200 y 15,2 μL de Epikuron 145. Esta fase se inyectó lentamente en 100 μL de fase acuosa, la cual contenía TAA. La muestra se agito por 1 minuto con un sistema vortex y se dejó en reposo. Posteriormente, se inyectó la mezcla en 800 μL de fase acuosa, y se llevó a centrifugación en tubos eppendorf de ultrafiltración a 10000 rpm durante 6 minutos. El material retenido (liposomas purificados) se aforó a 1 mL de volumen, para filtración y determinación de tamaño de partícula y potencial zeta. La Figura 9 muestra un resumen del protocolo de preparación utilizado.

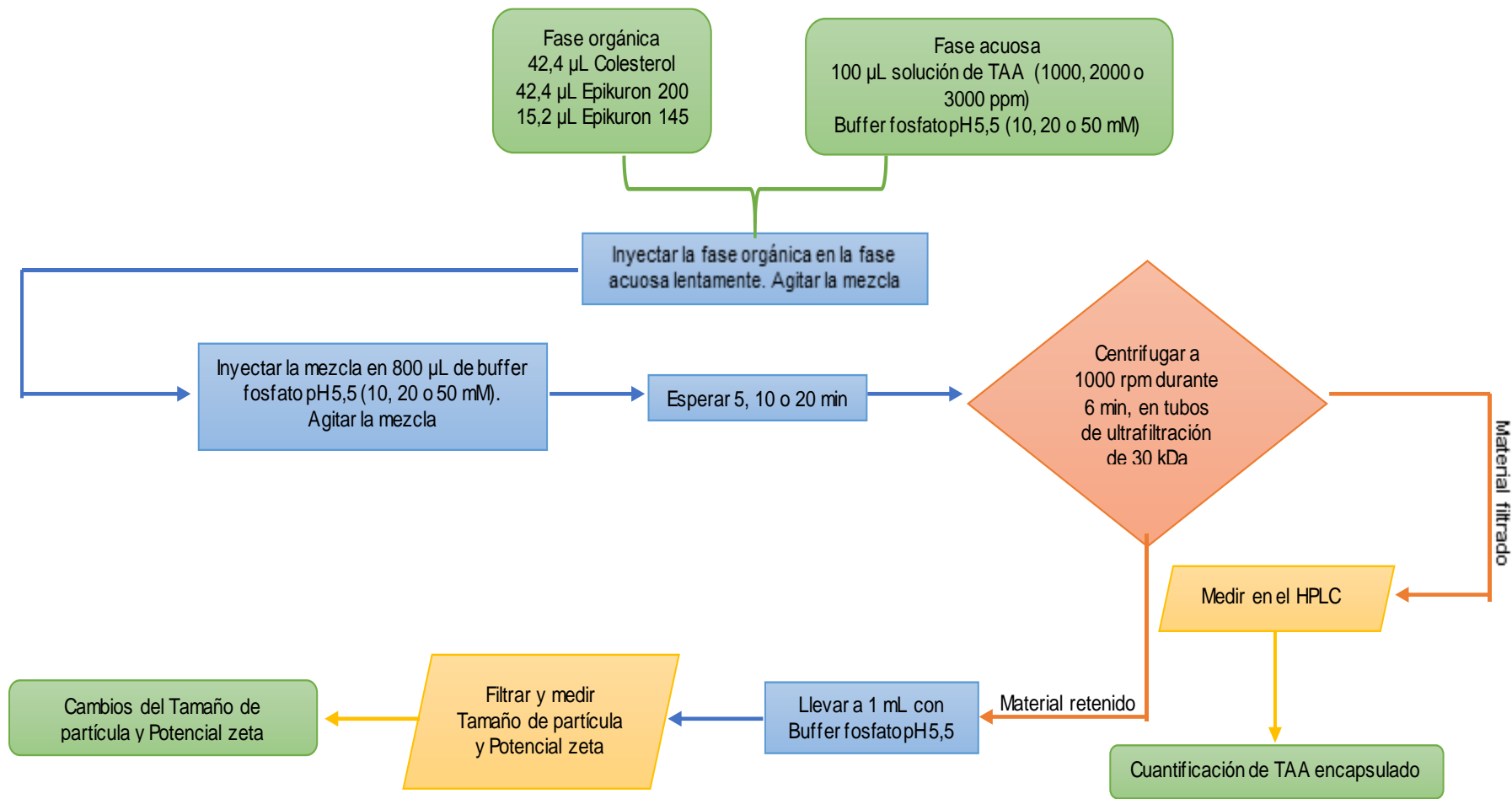


Figura 9. Procedimiento de preparación de liposomas

Posteriormente, se utilizó un diseño factorial completamente aleatorizado, con 2 réplicas para cada punto, evaluando el efecto de (i) la concentración de TAA, (ii) la fuerza iónica del medio acuoso y (iii) el tiempo de reposo de la mezcla de fase acuosa y fase orgánica, tal como se muestra en la Tabla 1. El análisis estadístico se realizó utilizando el software Minitab 17®.

Tabla 1. Diseño experimental

Factores	Niveles	Variables De Respuesta
Concentración de TAA	1000 ppm	Tamaño de partícula -nm- (Size), Potencial zeta (ZP), Índice de polidispersidad (Pdl) y Conductividad eléctrica (CE).
	2000 ppm	
	3000 ppm	
Fuerza iónica del medio	10 Mm	
	20 mM	
	50 mM	
Tiempo de reposo ("aging")	5 min	
	10 min	
	20 min	

Para la fase acuosa se prepararon soluciones buffer fosfato de potasio con un valor de pH de 5,5.

5.2.2. Caracterización de liposomas

Para determinar el valor de tamaño de partícula, índice de polidispersidad, potencial zeta y conductividad eléctrica, se utilizó el equipo Zetasizer Nano ZSP (Malvern Instruments). Todas estas mediciones se realizaron a una temperatura de 25 °C. Para la medición del tamaño de partícula el equipo mide el movimiento browniano, al iluminar las partículas en suspensión con un rayo láser, el cual emite fluctuaciones que son detectadas en un ángulo específico (173°) (Malvern Instruments Ltd., 2004). Estas fluctuaciones de intensidad de luz dispersa se relacionan con la ecuación de Stokes-Einstein y permiten determinar el tamaño de partícula (Curtillas, 2014). Por otra parte, el principio del potencial zeta es la movilidad electroforética, la cual mide la velocidad de las partículas que se encuentran bajo un campo eléctrico y utilizando la aproximación de Smoluchowski determina el potencial zeta (Malvern Instruments Ltd., 2004).

Del equipo se obtuvieron los datos de diámetro promedio de partícula, el índice de polidispersidad, el cual va de 0 (monodisperso) a 1 (polidisperso), el potencial zeta y la conductividad eléctrica. Estos datos se reportaron como el promedio de las mediciones realizadas al duplicado de cada muestra preparada.

5.2.3. Cuantificación de ácido trans aconítico encapsulado

Al terminar el proceso de centrifugación, se tomó la alícuota del filtrado, es decir, la fracción que quedó en el fondo del tubo, para determinar el contenido de TAA. Para realizar esta medición se midió el área a partir del equipo HPLC con detector PDA, usando una longitud de onda de 240 nm y una temperatura de 25°C. La cantidad

de TAA encapsulada se calculó por medio de una interpolación de una curva de calibración.

La curva de calibración se realizó teniendo en cuenta las diluciones realizadas durante el proceso de preparación y las concentraciones iniciales de TAA (1000, 2000 y 3000 ppm). La ecuación de la curva de calibración construida es $y = 36959x + 77228$ con un $R^2 = 0,9935$.

La eficiencia de encapsulación se determinó mediante la cuantificación de la concentración de TAA para cada muestra realizada por duplicado y mediante la ecuación 2.

$$\% \text{ Eficiencia de encapsulación} = \left[\frac{(TAA \text{ total}) - (TAA \text{ filtrado})}{(TAA \text{ total})} \right] \times 100 \text{ (Ecuación 2)}$$

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1.1. Resultados del análisis estadístico

Previo a la aplicación del análisis de varianzas del modelo experimental, se evaluaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad de los datos obtenidos. Lo anterior se realizó, para cada una de las variables estudiadas en el presente diseño de experimentos. Estos resultados es posible encontrarlos en el Anexo 1.

En la Tabla 2 se presenta el resumen del análisis de varianzas del modelo factorial planteado. Los resultados completos del análisis estadístico se encuentran en el Anexo 2. Es importante resaltar que el análisis estadístico se realizó con un 99% de confianza y un nivel de significancia (α) de 0,01.

En el análisis estadístico se tendrá en cuenta el valor p para rechazar o retener la hipótesis nula. Por ende, si el valor p es menor o igual al nivel α (0,01), entonces se rechaza la hipótesis nula, es decir, los datos no presentan diferencias significativas. Si, por el contrario, el valor p es mayor que el nivel α , se retiene la hipótesis nula, es decir, los datos si presentan diferencias significativas (Minitab Inc, 2015).

Tabla 2. Resumen del análisis de varianzas (Minitab Inc, 2015)

	Concentración	Fuerza iónica	Aging
Tamaño de partícula	valor p = 0,016	valor p = 0,102	valor p = 0,299
Índice de polidispersidad	valor p = 0,713	valor p = 0,069	valor p = 0,096
Potencial Zeta	valor p = 0,024	valor p = 0,000	valor p = 0,022
Conductividad eléctrica	valor p = 0,182	valor p = 0,000	valor p = 0,096

7.1.1.1. Resultados del análisis estadístico para el tamaño de partícula

La gráfica de efectos principales del tamaño de partícula -D_H- (ver Figura 10) y el análisis de varianzas, indica que el factor que afecta en mayor medida esta variable es la concentración de TAA, ya que puede existir una diferencia de hasta 60 nm en el tamaño de las vesículas obtenidas entre el nivel máximo y mínimo evaluado. Por otra parte, aunque en la Figura 10 se observa que la fuerza iónica y el tiempo de reposo también se ven afectadas, el análisis de varianzas muestra que estos factores no son estadísticamente significativos. Esto se puede deber a que la gráfica de efectos principales puede resultar engañosa debido a que no tiene en cuenta los efectos de interacción entre las variables (Minitab Inc, 2015). Por ende, solo se tendrá en cuenta la concentración de TAA como factor que afecta en mayor medida el tamaño de partícula.

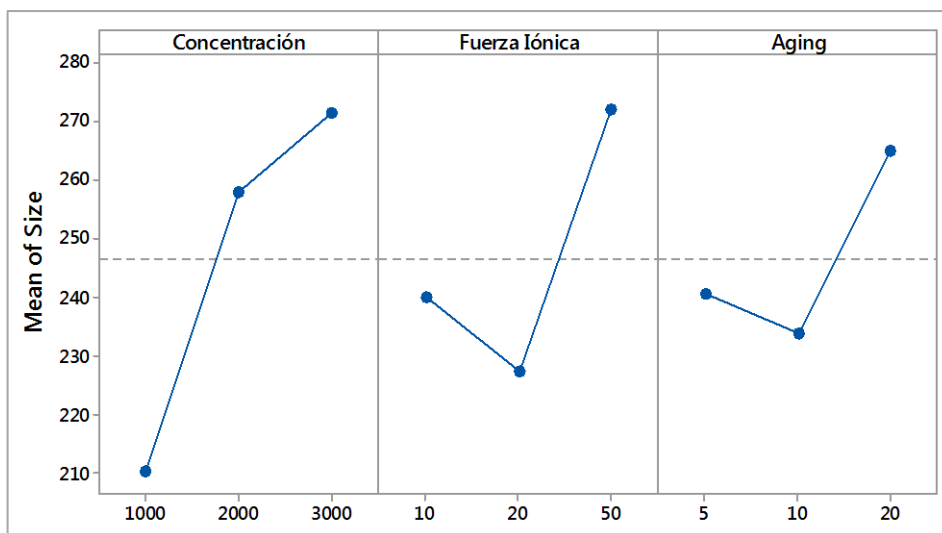


Figura 10. Gráfica factorial para el diámetro promedio de liposoma (Minitab Inc, 2015)

Además, mediante la tabla de coeficientes codificados del análisis del diseño factorial (ver Anexo 2), es posible definir que cuando la concentración de TAA es igual a 1000 ppm, este factor es estadísticamente significativo. A su vez, cuando el nivel de este factor interacciona con una fuerza iónica de 10 mM se genera una interacción estadísticamente significativa.

Teniendo en cuenta lo anterior, el aumento de tamaño de partícula a medida que aumenta la concentración (ver Figura 10), pudo generarse debido a que, a medida que aumenta la concentración, hay disponible en el sistema mayor cantidad de moléculas de TAA para ser encapsuladas en el interior de los liposomas, lo cual se podría traducir en un aumento del tamaño de partícula o radio hidrodinámico del liposoma.

Aunque no se evidenció que el tiempo de reposo (“aging”) fuera una variable estadísticamente significativa, en la Figura 10 se puede observar que a medida que aumenta esta variable, también lo hace el tamaño de partícula. De acuerdo con la metodología de preparación, los liposomas que presentan baja concentración de fosfolípidos constan de dos periodos de tiempo, un periodo de tiempo corto donde los monómeros se mueven fácilmente de los agregados formados, y otro periodo de tiempo más lento en el que se genera la curvatura de la bicapa lipídica y se estabiliza la vesícula. Por tanto, se espera que cuando se tienen mayores tiempos de reposo se genera una mayor aglomeración de los fosfolípidos en la interfase, generando vesículas de mayor tamaño (Ruano, 2013). Sin embargo, se ha visto que cada sistema tiene su tiempo de formación, desde minutos hasta días, por ende, se requeriría evaluar mayor número de niveles de este factor, si se desea conocer un tiempo óptimo en el cual se formen sistemas liposomales estables (Arévalo, 2017).

La interacción estadísticamente significativa encontrada entre la concentración y la fuerza iónica a un determinado nivel concuerda con lo establecido con algunos autores, que han determina que la fuerza iónica es un factor determinante en la obtención de sistemas liposomales estables. Sin embargo, no se ha establecido con precisión, el mecanismo por el cual la fuerza iónica afecta el tamaño de partícula (Sabin, Prieto, Ruso, Hidalgo-Álvarez, & Sarmiento, 2006).

7.1.1.2. Resultados del análisis estadístico para el índice de polidispersidad

Por otro lado, aunque la Figura 11 muestra que el índice de polidispersidad puede verse medianamente afectado por la fuerza iónica, en el análisis de varianzas se observa que los factores evaluados no son estadísticamente significativos. Sin embargo, en la tabla de coeficientes codificados del análisis del diseño factorial (ver Anexo 2) se observa que cuando la fuerza iónica es igual a 20 mM, es factor es estadísticamente significativo. Es importante destacar, que los valores de índice de polidispersidad obtenidos son menores de 0,3, lo cual indica que los sistemas preparados tienden a ser monodisperso (Lancheros, Beleño, Guerrero, & Godoy, 2014).

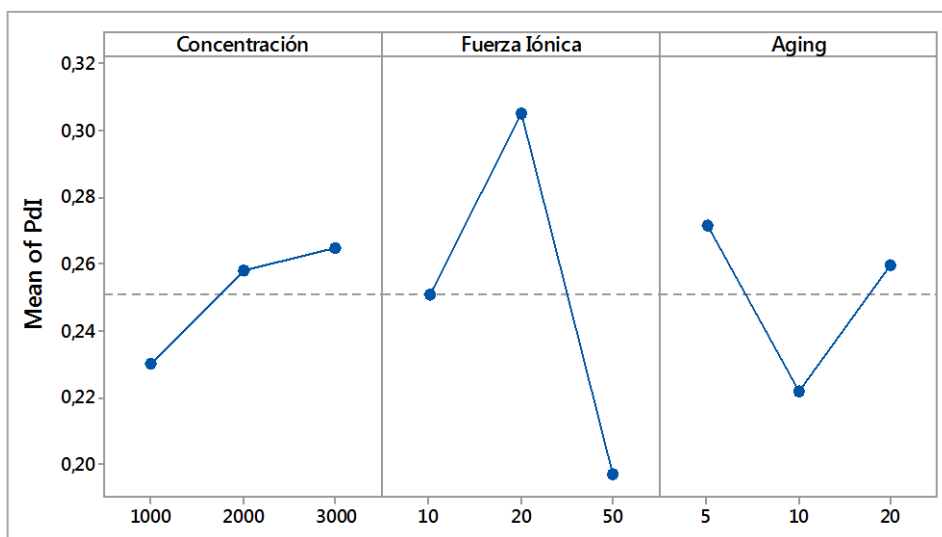


Figura 11. Gráfica factorial para el índice de polidispersidad (Minitab Inc, 2015)

7.1.1.3. Resultados del análisis estadístico para el potencial zeta

En cuanto al potencial zeta, en la Figura 12 se puede observar que, a diferencia de los casos anteriores, los factores evaluados tienen un efecto más marcado. El análisis del diseño factorial confirma que todos los factores evaluados son estadísticamente significativos. Lo cual concuerda con los resultados de Bhattacharjee, quien determinó que debido a que la composición de la capa difusa era dinámica, variaría dependiendo diferentes factores, como el pH, la fuerza iónica, la concentración, entre otros (Bhattacharjee, 2016).

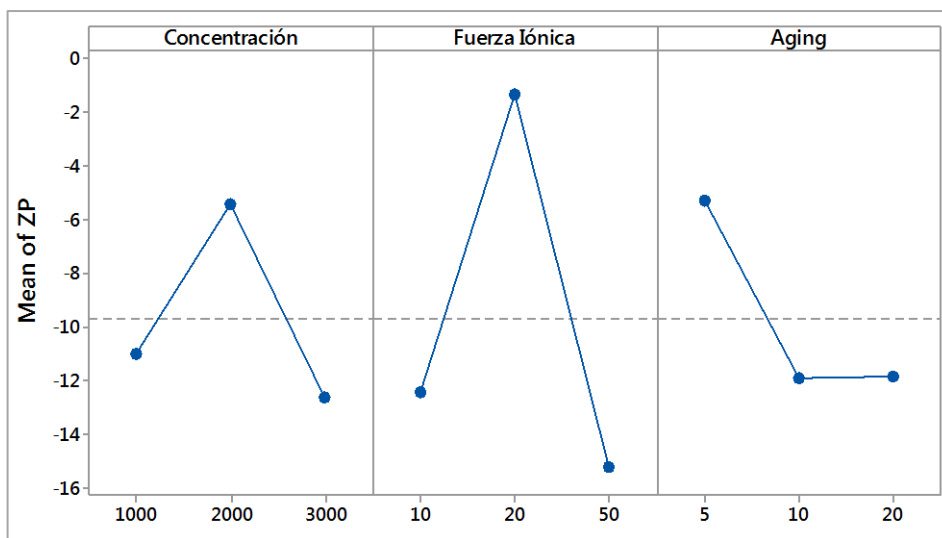


Figura 12. Gráfica factorial para el potencial zeta (Minitab Inc, 2015)

Adicionalmente, la tabla de coeficiente codificados del análisis del diseño factorial señala que los niveles a los cuales los factores son estadísticamente significativos son 2000 ppm, 20 mM y 5 min para la concentración, la fuerza iónica y el tiempo de reposo (“aging”), respectivamente.

En estudios realizados con anterioridad, se estableció que la relación entre concentración y el potencial zeta es compleja. Además, se determinó que esta variable se encuentra determinada tanto por la adsorción de la superficie como por el efecto de la doble capa eléctrica. Pese a la complejidad de esta relación, se puede afirmar que, en general, en condiciones diluidas domina el efecto de adsorción superficial, y, por ende, el potencial zeta aumenta con la concentración. Lo anterior se puede observar en el rango de 1000 a 2000 ppm (ver Figura 12). Sin embargo, el potencial zeta aumenta con la concentración, hasta un punto en el cual la adsorción superficial deja de dominar, y la doble capa eléctrica empieza a dominar, con lo cual, al aumentar la concentración se observa un efecto opuesto, es decir, disminución del potencial zeta. Lo cual se puede observar en rango de 2000 a 3000 ppm (Bhattacharjee, 2016)

Por otra parte, teniendo en cuenta la carga superficial negativa de la bicapa lipídica, se asume la formación de una doble capa eléctrica alrededor de cada vesícula liposomal. Por ende, cuando la concentración de electrolitos aumenta en el medio acuoso también lo hace la concentración de K^+ alrededor de la bicapa, lo que genera una compresión de la capa eléctrica, es decir, cuando la fuerza iónica aumenta, la doble capa eléctrica se comprime mientras que el potencial zeta disminuye (Bhattacharjee, 2016). Esto se puede evidenciar en el rango de 20 a 50 mM (ver Figura 12).

7.1.1.4. Resultados del análisis estadístico para la conductividad eléctrica

Por otra parte, como era de esperarse, la conductividad eléctrica solo se encuentra afectada por la fuerza iónica del sistema. Como se puede observar en la Figura 13, a medida que aumenta la fuerza iónica, también lo hace el valor de conductividad eléctrica, lo cual tiene mucho sentido, debido a que esta variable depende principalmente de la cantidad de iones que se encuentren presentes en el sistema.

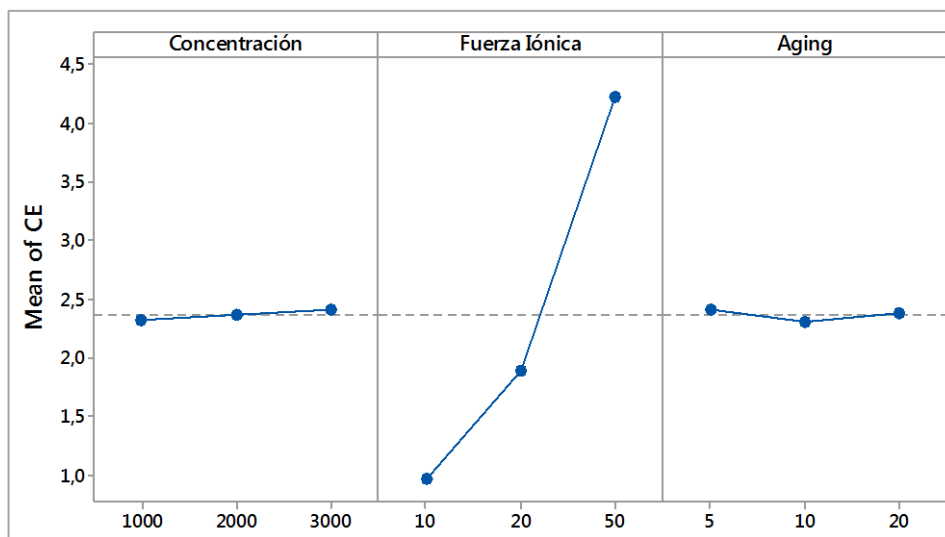


Figura 13. Gráfica factorial para conductividad eléctrica (Minitab Inc, 2015)

Aunque la gráfica factorial y el análisis de varianzas muestran que el único factor que afecta significativamente la conductividad eléctrica, en la tabla de coeficientes codificados del análisis del diseño factorial (ver Anexo 2), se puede observar que, a una fuerza iónica de 10 mM y 20 mM, y un tiempo de reposo (“aging”) de 10 min, estas variables son estadísticamente significativas.

Considerando los resultados del análisis estadístico, se puede decir que los niveles de cada uno de los factores que afectan en menor medida, o no son estadísticamente significativas son 3000 ppm, 50 mM y 20 minutos para la concentración, la fuerza iónica y el tiempo de reposos “aging”, respectivamente. Adicionalmente, teniendo en cuenta que la literatura menciona que las partículas con potencial zeta mayores a ± 30 mV se pueden considerar estables (Malvern Instruments Ltd., 2004), el nivel de estos factores permite obtener valores de potencial zeta más cercanos a -30 mV, por tanto, comparados con los demás factores se obtienen liposomas más estables (ver Figura 12).

7.1.1.5. Resultados del análisis estadístico para el porcentaje de eficiencia de encapsulación

En la Tabla 3 se presenta el resumen del análisis de varianzas del modelo factorial planteado. Es importante resaltar que el análisis estadístico se realizó con un 99% de confianza y un nivel de significancia (α) de 0,01.

Tabla 3. Resumen del análisis de varianzas (Minitab Inc, 2015)

	Concentración	Fuerza iónica	Tiempo de reposo
% Eficiencia de encapsulación	valor p = 0,448	valor p = 0,243	valor p = 0,987

En el análisis de varianzas realizado (ver Tabla 3), es posible observar que ninguna de los factores evaluados es estadísticamente significativo. Por ende, es posible decir que ninguna de los factores afecta significativamente esta variable.

Por otras parte, en la Figura 14 es posible observar que tanto la concentración como la fuerza iónica, aumentan los valores del porcentaje de eficiencia de encapsulación a medida que disminuyen el nivel de cada uno de estos factores. Por lo tanto, cuando se tiene una menor concentración (1000 ppm) y una menor fuerza iónica (10 mM) se obtienen mayores porcentaje de eficiencia de encapsulación. Sin embargo, aunque los mayores porcentajes de eficiencia de encapsulación se lograron cuando el tiempo de reposo (aging) era de 10 minutos, en relación con los otros valores, se puede observar que este factor no afecta en gran medida la encapsulación de TAA en los sistemas liposomales.

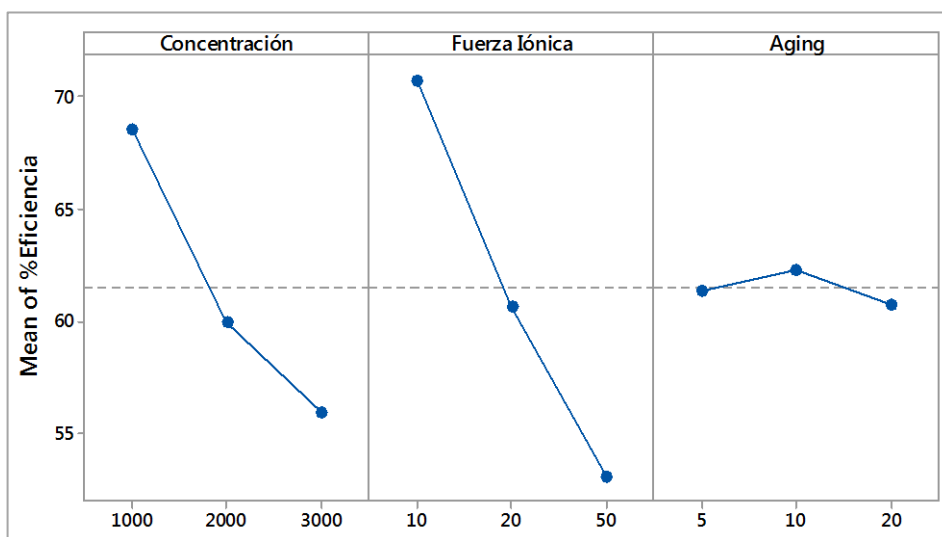


Figura 14. Gráfica factorial para el porcentaje de eficiencia de encapsulación de ácido trans aconítico

Cabe señalar que un óptimo porcentaje de eficiencia de encapsulación no siempre se traduce en un desempeño exitoso de una formulación. Por ende, es posible que, al tener una concentración de 1000 ppm, una fuerza iónica de 10 mM y un tiempo de reposo de 10 min, se obtenga una óptima eficiencia de encapsulación, mas no un desempeño exitoso. Por ende, para determinar si realmente se tiene un desempeño exitoso es necesario realizar diferentes estudios como; permeabilidad, estabilidad, entre otros.

Por otra parte, como se mencionó anteriormente, aunque los niveles de las variables descritas con anterioridad ofrezcan los mayores porcentajes de eficiencia de encapsulación, también se observó que los niveles de estas variables son estadísticamente significativos o muy sensibles a cambios externo, lo cual podría afectar directamente el modelo estadístico. Por consiguiente, podría ser mejor trabajar con variables que son menos sensibles o no son estadísticamente significativas, así la eficiencia de encapsulación obtenida sea más baja.

7.1.2. Análisis de prueba de comparación múltiple de Tukey

7.1.2.1. Análisis de prueba de comparación múltiple de Tukey para tamaño de partícula, índice de polidispersidad, potencial y conductividad eléctrica

Teniendo en cuenta los resultados estadísticamente significativos obtenidos preliminarmente (ver Ítem 7.1.1), se realizó la prueba de comparación múltiple de Tukey utilizando un 99% de confianza para determinar la significancia estadística de las media de los diferentes factores evaluados que presentan diferencias significativas.

En la Tabla 4 se presentan los resultados de aquellos factores que mostraron ser estadísticamente significativos al realizar la prueba de comparación múltiple de Tukey, donde las variables que comparten la misma letra no son estadísticamente diferentes, y a su vez, aquellas que no comparten las mismas letras difieren.

Tabla 4. Resultados estadísticamente significativos de la prueba de comparación múltiple de Tukey (Minitab Inc, 2015)

Variable	Factor	Nivel	Media	Grupo
Tamaño de partícula	Concentración	3000 ppm	271,4	A
		2000 ppm	258,0	AB
		1000 ppm	210,2	B
Índice de polidispersidad	Fuerza iónica	20 mM	0,3057	A
		10 mM	0,2510	A
		50 mM	0,1966	A
Potencial zeta	Fuerza iónica	20 mM	-1,36	A
		10 mM	-12,48	B
		50 mM	-15,27	B
Conductividad eléctrica	Fuerza iónica	50 mM	4,2267	A
		20 mM	1,8844	B
		10 mM	0,9668	C

El análisis de varianzas realizado anteriormente mostraba que el tamaño de partícula era afectado en mayor medida cuando se tenía una concentración de 1000 ppm. Adicionalmente, en Figura 15 y la Tabla 4 se puede observar que la concentración a un nivel de 3000 ppm posee una media significativamente mayor que a 1000 ppm. En contraste con lo anterior, es posible decir que el nivel de concentración que se encuentra más alejado en tamaño de partícula es 1000 ppm.

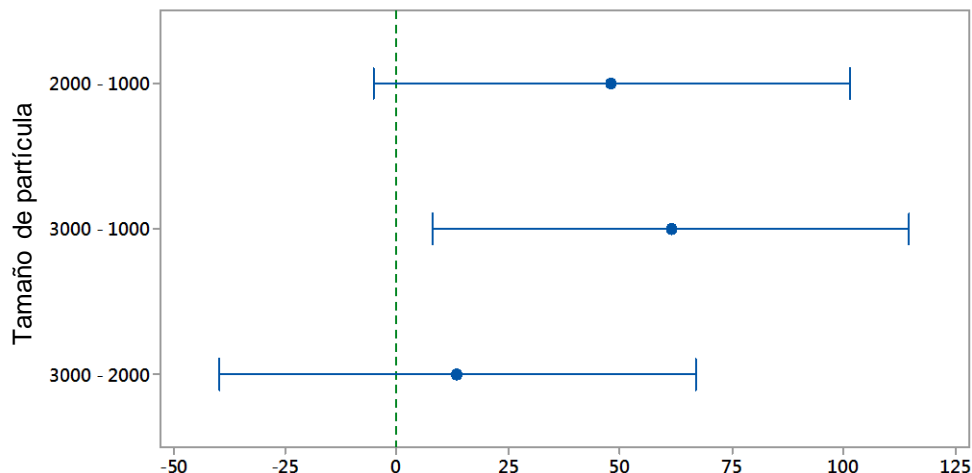


Figura 15. Diferencia de las medias para Tamaño de partícula (Concentración) (Minitab Inc, 2015)

Por otra parte, el análisis de varianza mostraba que el índice de polidispersidad era estadísticamente significativo cuando se tenía una fuerza iónica 20 mM. Sin embargo, en la prueba de comparación múltiple de Tukey, se observó que ninguna de las medias era estadísticamente significativa, concordando con los resultados obtenidos en el análisis de varianza (Ver Tabla 4).

Seguidamente, en el análisis de varianzas realizado para el potencial zeta se encontró que la fuerza iónica era estadísticamente significativa. Lo cual concuerda con los resultados de la prueba de comparación múltiple de Tukey y la gráfica de medias (ver Figura 16), que muestran que la fuerza iónica a un nivel de 20 mM posee una media significativamente menor que los demás niveles evaluados.

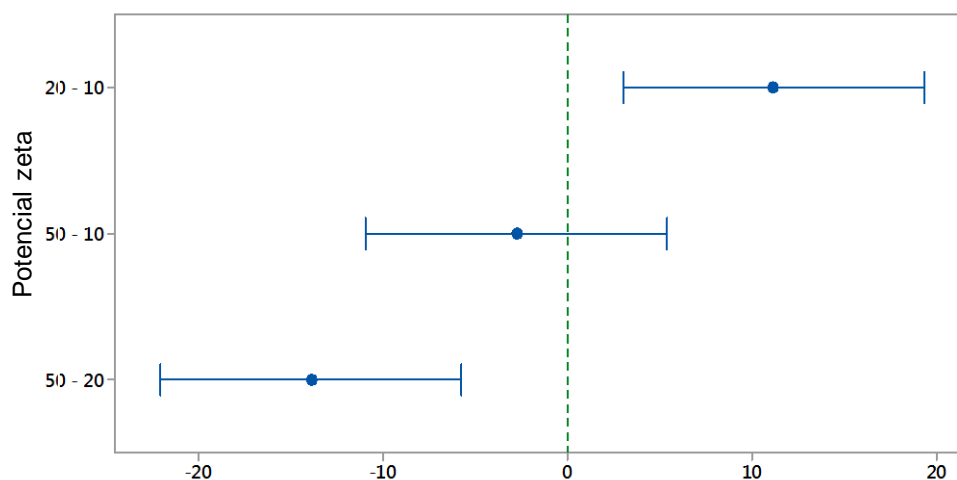


Figura 146. Diferencias de las medias para Potencial zeta (Fuerza Iónica) (Minitab Inc, 2015)

Al igual que en el análisis de varianzas y la gráfica factorial para la conductividad eléctrica evaluadas anteriormente, en la prueba de comparación múltiple de Tukey, se logra observar que el factor estadísticamente significativo para esta variable es la fuerza iónica. Sin embargo, en la Tabla 4 y la Figura 17 se puede observar que las medias de todos los niveles de este factor son estadísticamente significativas.

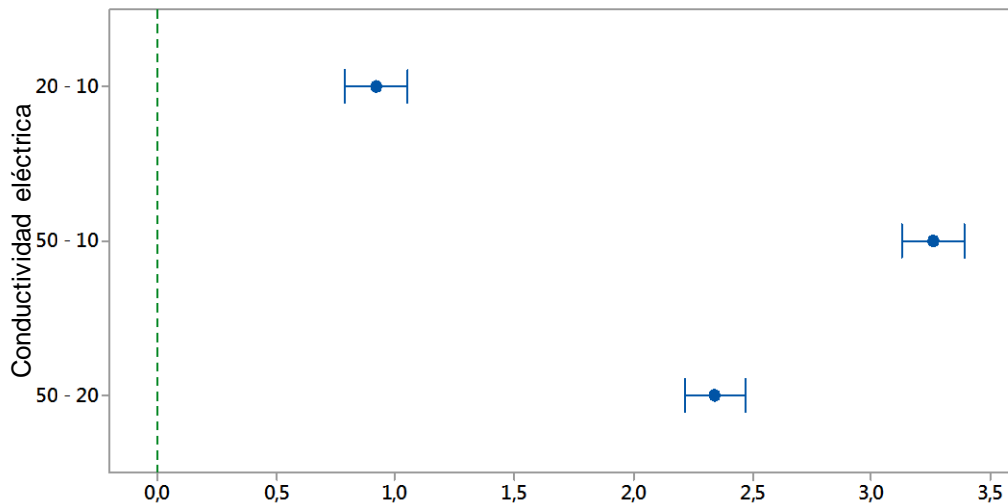


Figura 157. Diferencias de las medias para la conductividad eléctrica (Minitab Inc, 2015)

Por tanto, a partir de los resultados de la prueba Tukey se puede decir que cuando se evalúa el tamaño de partícula con una concentración de 1000 ppm y el potencial zeta con una fuerza iónica de 20 Mm, se obtiene una significancia estadística de las medias de estas variables.

7.1.2.2. Análisis de prueba de comparación múltiple de Tukey para el porcentaje de eficiencia de encapsulación

A diferencia de las variables estudiadas con anterioridad, en el análisis de varianzas y la gráfica factorial para el porcentaje de eficiencia de encapsulación de TAA se encontró que ninguna de las variables era estadísticamente significativa. Lo anterior concuerda con los resultados de la prueba de comparación múltiple de Tukey (ver Figura 18), en la que se puede observar que las diferencias entre las medias no son estadísticamente significativas. Es importante resaltar que la prueba de comparación múltiple de Tukey se realizó con un 99% de confianza.

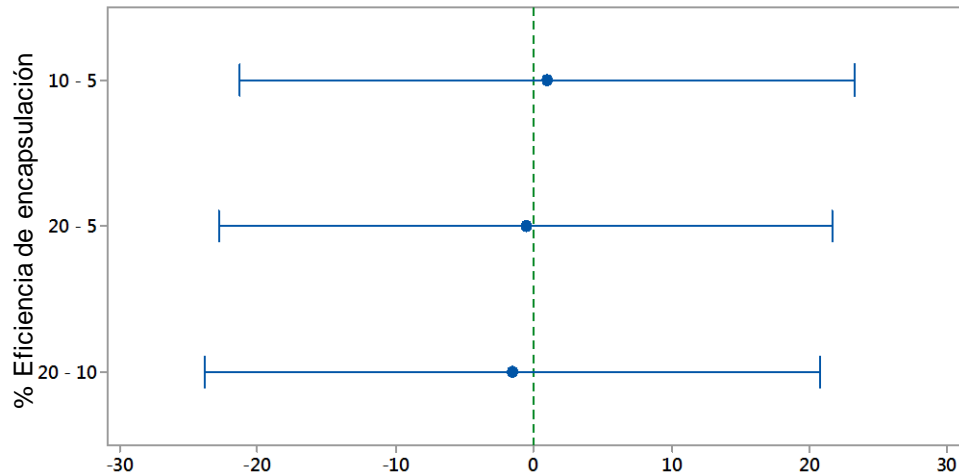


Figura 1618. Diferencia de las medias del porcentaje de eficiencia de encapsulación (Minitab Inc, 2015)

7.1.3. Resumen de la caracterización de liposomas

En la Tabla 5 se presentan el promedio, el intervalo de confianza, la asimetría y la curtosis para las diferentes variables evaluadas. Por otra parte, los valores de tamaño de partícula, índice de polidispersidad, potencial zeta y conductividad eléctrica se reportan en el Anexo 3.

Tabla 5. Caracterización de liposomas (Minitab Inc, 2015)

Variable	Promedio (\bar{X})	Intervalo de confianza	Asimetría	Curtosis
Tamaño de partícula	246,54	(227,35; 265,73)	0,741711	0,820952
Índice de polidispersidad	0,25109	(0,21074; 0,29145)	1,27127	3,05310
Potencial zeta	-9,7023	(-12,8834; -6,5211)	1,26158	1,96529
Conductividad eléctrica	2,3593	(1,9787; 2,7399)	0,47606	-1,47559

El valor de asimetría observado en la Tabla 5 hace referencia al grado en que los datos no son simétricos. Por ende, a medida que los datos se vuelven más simétricos el valor de asimetría se acerca a cero. Sin embargo, si el valor de asimetría es mayor a cero se dice que los datos presentan una asimetría hacia la derecha o una asimetría positiva, es decir, que la “cola” de la distribución apunta hacia la derecha. A su vez, si el valor de asimetría es menor a cero se dice que los datos son asimétricos hacia la izquierda o con asimetría negativa, es decir, la “cola” de la distribución apunta hacia la izquierda (Minitab Inc, 2015).

Por otra parte, el valor de curtosis presente en la Tabla 5, es utilizado para lograr entender las características generales de la distribución de los datos. Esta variable indica la manera en que el pico y las colas de una distribución difiera de la distribución normal. Cuando se tiene una curtosis igual a cero (mesocúrtica), se dice que los datos siguen una distribución normal. En cambio, si la curtosis es positiva (leptocúrtica), se dice que la distribución tiene colas más pesadas y un pico más profundo que la distribución normal. A su vez, un valor de curtosis negativo (platicúrtica), indica que la distribución tiene colas más liviana y un pico más plano que la distribución normal (Minitab Inc, 2015). Por tanto, a diferencia de la distribución platicúrtica, la distribución mesocúrtica tiene una mayor concentración de datos en torno a la media.

Los sistemas obtenidos presentaron un tamaño de partícula de 246,5 nm, con una asimetría y una curtosis positivas, tal como se muestra en la Tabla 5. El valor de asimetría positivo indica que la mayor proporción de datos de tamaño de partícula son menores al valor de promedio, es decir, que es más probable obtener liposomas con tamaños menores de 246,5 nm. Mientras que la curtosis positiva indica que los datos obtenidos no se alejan mucho del valor promedio de tamaño de partícula (ver Figura 19).

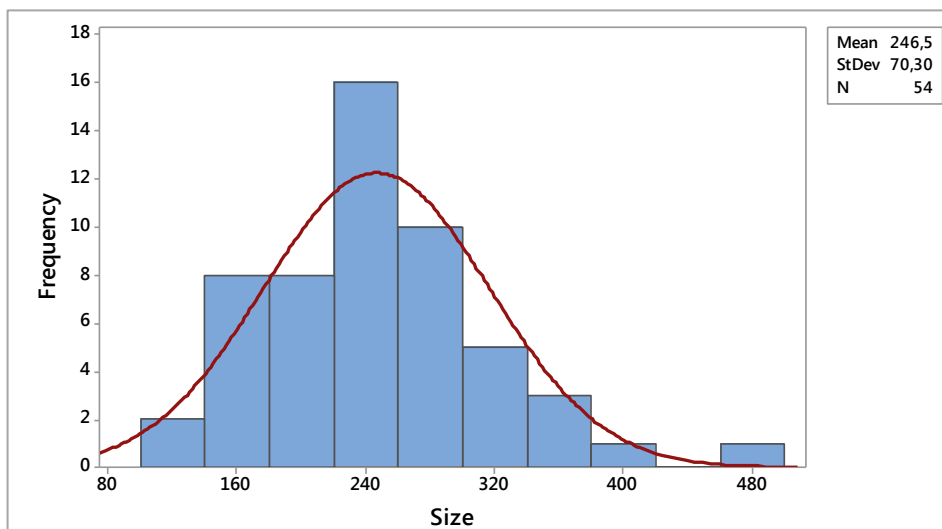


Figura 179. Distribución de tamaño de partícula (Minitab Inc, 2015)

Por otra parte, como se puede observar en la Figura 20, los sistemas liposomales evaluados presentaron un índice de polidispersidad promedio de 0,25, es decir, los sistemas preparados tienden a ser monodispersos. Al igual que el tamaño de partícula, se observó una asimetría y curtosis positivas (ver Tabla 5). Por medio de la asimetría se puede decir que la mayor concentración de datos del índice de polidispersidad es menor a 0,25. Mientras que la curtosis permite afirmar que los datos no se alejan mucho del valor promedio de esta variable.

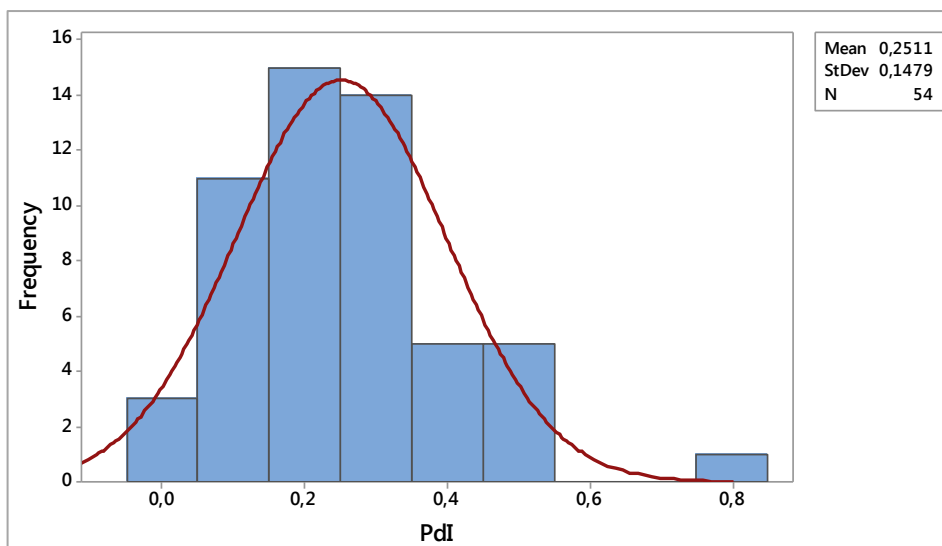


Figura 20. Distribución del índice de polidispersidad (Minitab Inc, 2015)

En la Figura 28 del Anexo 3 es posible observar que el potencial zeta promedio para los sistemas liposomales evaluados era de -9,702. Por tanto, teniendo en cuenta la literatura, los sistemas liposomales preparados no tienden a ser estables (Malvern Instruments Ltd., 2004). Adicionalmente, presenta una asimetría y curtosis positivas.

Por otra parte, la conductividad eléctrica encontrada para los sistemas liposomales evaluados fue de 2,359 mV (ver Anexo 3), con una asimetría positiva y una curtosis negativa.

7.1.3. Relación entre la concentración de TAA encapsulado y la eficiencia de encapsulación

Teniendo en cuenta los datos reportados en la Tabla 12 del Anexo 6, el porcentaje de eficiencia de encapsulación promedio encontrada fue del 61,498% con un intervalo de confianza del 54,302% al 68,693%. Adicionalmente, se encontró un coeficiente de asimetría de -1,040 y una curtosis de 0,938. La asimetría negativa hace referencia a que los valores se encuentran más separados de la media a la izquierda de esta, es decir que es más probable encontrar porcentajes de eficiencia de encapsulación mayores de 61,5%. Mientras que la curtosis positiva refiere que los datos no se encuentran muy dispersos en torno a la media.

Sin embargo, teniendo en cuenta que los sistemas estudiados tenían diferentes variables, el promedio de los valores del porcentaje de eficiencia de encapsulación por sí solo no presenta mayor importancia. Por tanto, es necesario estudiar cada sistema de forma separada para lograr encontrar las condiciones en las cuales se pueda obtener un óptimo porcentaje de eficiencia de encapsulación, lo cual se discute en el ítem 7.1.1.5.

Por otra parte, en la Figura 21 se presenta la correlación entre la concentración y el porcentaje de eficiencia de encapsulación. En esta se puede observar que los resultados guardan una estrecha similitud con lo que se encontró en el diseño experimental, ya que se ve que a medida que aumenta la concentración de TAA la eficiencia de encapsulación disminuye, lo cual concuerda con los resultados anteriormente mencionados. Adicionalmente, la Figura 21 permite representar gráficamente esta correlación, en la cual se observa que estas variables guardan una relación inversamente proporcional de acuerdo con la prueba de correlación de Pearson.

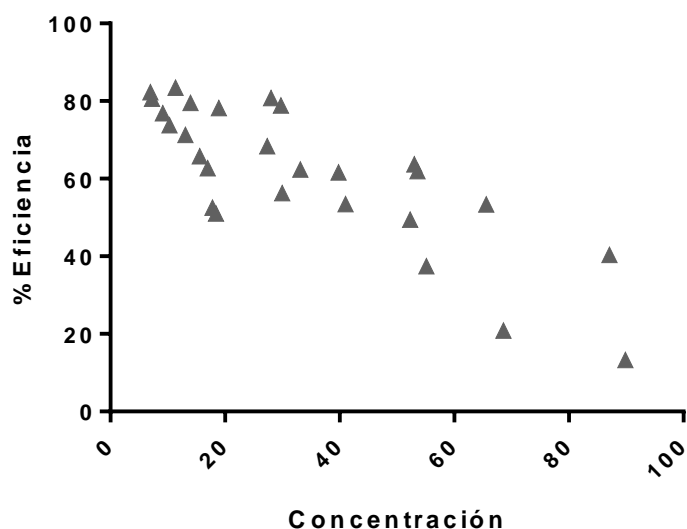


Figura 21. Correlación entre el porcentaje de eficiencia de encapsulación de ácido trans aconítico (GraphPad Prism, 2006)

La prueba de correlación de Pearson como su nombre lo indica, es un método de correlación que permite examinar la fuerza y la dirección de la relación lineal entre dos variables continuas. El valor de coeficiente de correlación puede variar de -1 a 1, y mientras mayor sea el valor absoluto de este coeficiente, más fuerte será la relación entre los valores. Por otra parte, el signo del coeficiente indica la dirección de la relación. Si ambas variables tienen a aumentar o disminuir, el coeficiente es positivo, pero, si una variable tiende a aumentar y la otra a disminuir el coeficiente es negativo. Teniendo en cuenta lo anterior, el coeficiente de correlación obtenido al realizar la prueba de correlación de Pearson en GraphPad Prism, fue de -0,8115, lo cual concuerda con lo anteriormente discutido, es decir, que las variables estudiadas (porcentaje de eficiencia de encapsulación y concentración) son inversamente proporcionales. **7.1.4. Predicción de respuestas con base en los resultados del modelo estadístico**

Teniendo en cuenta lo anterior, a continuación, se presentan dos pruebas de optimización de respuestas realizadas en Minitab, las cuales se realizaron considerando las respuestas obtenidas en el análisis estadístico.

7.1.4. Predicción de respuestas con base en los resultados del modelo estadístico

Teniendo en cuenta lo anterior, a continuación, se presentan dos pruebas de optimización de respuestas realizadas en Minitab, las cuales se realizaron considerando las respuestas obtenidas en el análisis estadístico.

En la Figura 22 se observa que los factores que se deben utilizar si se requiere obtener un porcentaje de eficiencia de encapsulación máximo, son una concentración de 2000 ppm, una fuerza iónica de 10 mM y un tiempo de reposo de 5 minutos. Mientras que en la figura 23 se observa que los factores que se deben utilizar si se requiere un índice de polidispersidad mínimo y un potencial zeta máximo son; una concentración de 2000 ppm, una fuerza iónica de 20 mM o 10 mM y un tiempo de reposo de 5 minutos.

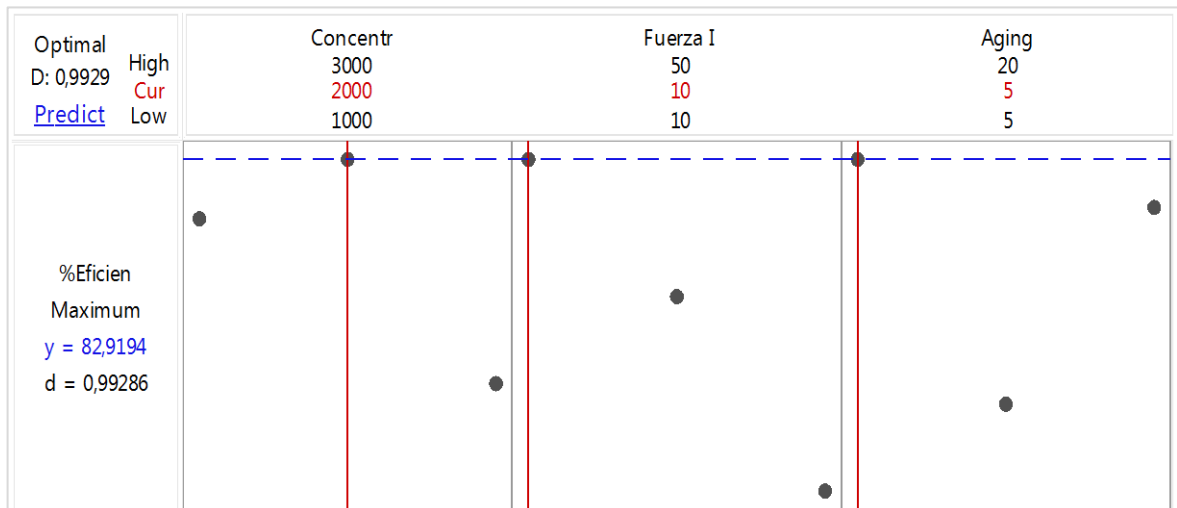


Figura 182. Optimización de respuestas para obtener un porcentaje de eficiencia de encapsulación máximo (Minitab Inc, 2015)

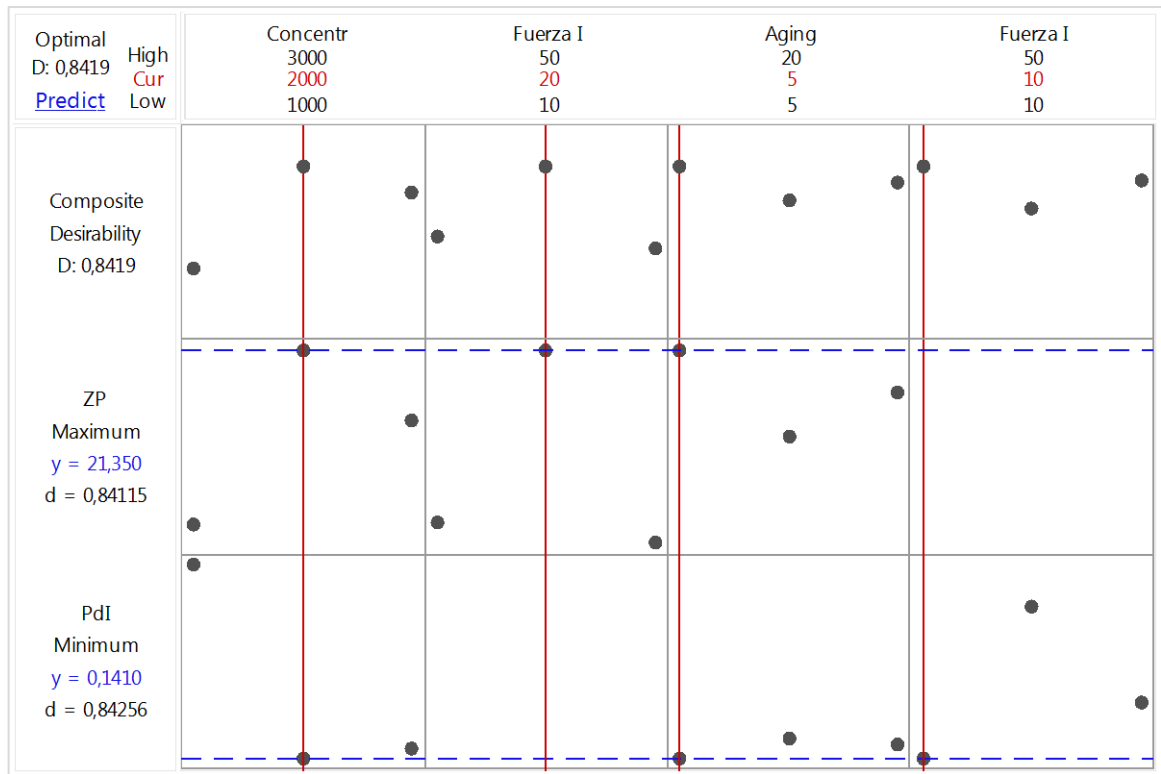


Figura 193. Optimización de respuestas si se requiere un mínimo índice de polidispersidad y un máxima potencial zeta (Minitab Inc, 2015)

Teniendo en cuenta que los valores de la optimización de respuestas para una eficiencia de encapsulación máxima, y un índice de polidispersidad mínimo y un potencial zeta máxima concuerdan, se diseño un protocolo de preparación de sistemas liposomales, el cual se presenta en el Anexo 7.

7. CONCLUSIONES

- Se logró preparar sistemas liposomales convencionales para la encapsulación de ácido trans aconítico a través de la técnica de inyección de etanol, utilizando epikuron 145, epikuron 200 y colesterol. Adicionalmente, se encontraron las condiciones adecuadas de proceso para obtener sistemas liposomales de tamaño cercano a 246,54 nm y cargados negativamente en su superficie.
- Se caracterizaron los sistemas liposomales preparados (tamaño de partícula y potencial zeta), utilizando la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS). Encontrando que los tamaños de liposomas y los valores de potencial zeta varían poco de su valor promedio.
- Se determinó que cuando se tiene una concentración de 2000 ppm, una fuerza iónica de 10 ppm y un tiempo de reposo de 5 minutos se logra minimizar el índice de polidispersidad, y maximizar el potencial zeta y la eficiencia de encapsulación.
- Se determinó que la eficiencia de encapsulación de ácido trans aconítico en los sistemas evaluados era de 61,49 %. Sin embargo, esta va a depender de los requerimientos que se deseen estudiar.
- Se espera que el protocolo de preparación de sistemas liposomales que encapsulan ácido trans aconítico con un porcentaje de eficiencia de encapsulación mayor al 40% pueda servir para futuras investigaciones que permitan verificar la utilidad de estos en el campo cosmético.

8. RECOMENDACIONES

- Utilizar técnicas como la microscopia de transmisión electrónica (TEM), que permitan visualizar la morfología de los liposomas preparados con el fin de verificar los resultados obtenidos en este estudio.
- Verificar la estabilidad de los sistemas liposomales obtenidos, mediante el seguimiento de potencial zeta y tamaño de partícula en función de los días, ya que esto puede afectar la disponibilidad de TAA.
- Verificar la permeabilidad a través de la piel los sistemas liposomales preparados mediante la utilización de técnicas como celdas de Franz.
- Realizar evaluación de la eficiencia de los sistemas liposomales sobre las bacterias encargadas de generar acné o realizar análisis que permitan determinar la utilización de estos como peeling químico.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Activos, I. (2015). Ingredientes cosméticos.
- Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., ... Nejati-Koshki, K. (2013). Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters*, 8(1), 102. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-102>
- Arévalo, L. (2017). *Modificación superficial de liposomas mediante un polímero catiónico bioadherente para la vehiculización de ampicilina*. Universidad Icesi.
- Ballanger, F., & Dreno, B. (2010). Acné. {EMC} - *Tratado de Medicina*, 14(2), 1–8. [https://doi.org/http://doi.org/10.1016/S1636-5410\(10\)70507-9](https://doi.org/http://doi.org/10.1016/S1636-5410(10)70507-9)
- Bayas, M., & Brito, D. (2009). Fabricación de liposomas para el encapsulamiento de drogas de uso médico o veterinario. *Revista Politécnica*, 30, 105–108.
- Bernabéu, A. (2008). *Offarm. Acné. Etiología y tratamiento*. Doyma. Retrieved from <http://www.elsevier.es/pt-revista-offarm-4-articulo-acne-etilogia-tratamiento-13126071>
- Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, 235, 337–351. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2016.06.017>
- Chinnagounder, P., Leijten, J. C. H., Dijkstra, P. J., Karperien, M., & Post, J. N. (2012). Nanomaterials for the Local and Targeted Delivery of Osteoarthritis Drugs. *Journal of Nanomaterials*, 2012, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2012/673968>
- Curtillas, V. (2014). *Determinación de los intervalos de solubilidad para la cristalización de las proteínas: TSG101-UEV, Ubiquitina y VP40*. Universidad de Almería. Retrieved from http://repositorio.ual.es/bitstream/handle/10835/3538/1891_Trabajo.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Dua, J. S., Rana, A. C., & Bhandari, A. K. (2012). LIPOSOME: METHODS OF PREPARATION AND APPLICATIONS. *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research E*, 3, 14–20. Retrieved from <https://pdfs.semanticscholar.org/f9f2/608d3eab5ec471f1454580dfa59273a438c9.pdf>
- Gil, N. (2007). *Aconitic acid from sugarcane: production and industrial application*. Universidad Estatal de Lusiana. Retrieved from https://digitalcommons.lsu.edu/cgi/viewcontent.cgi?referer=https://www.google.com.co/&httpsredir=1&article=4739&context=gradschool_dissertations

- Grimalt, R. (2007). Acné. *Protocolos de Dermatología/ Protocolos de La AEP*, 2, 7–13. Retrieved from <https://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/acne.pdf>
- Hua, S. (2015). Lipid-based nano-delivery systems for skin delivery of drugs and bioactives. *Frontiers in Pharmacology*, 6, 219–223. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00219>
- Kontochristopoulos, G., & Platsidaki, E. (2017). Chemical peels in active acne and acne scars. *Clinics in Dermatology*, 35(2), 179–182. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2016.10.011>
- Lancheros, R., Beleño, J., Guerrero, C., & Godoy, R. (2014). Producción de nanopartículas de PLGA por el método de emulsión y evaporación para encapsular N-Acetilcisteína (NAC), 19 (2), 161–168. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/unsc/v19n2/v19n2a09.pdf>
- Malvern. (n.d.). Zeta potencial. Retrieved November 10, 2017, from https://www.malvern.com/en/products/measurement-type/zeta-potential/?gclid=Cj0KCQiAlpDQBRDmARIsAAW6-DMqGepWLS96xzBwNDIXiUfVx5ymPCB0eysJVluQHoUe98dDLf_edkaAoAVEALw_wcB
- Malvern Instruments Ltd. (2004). Zetasizer Nano Series User Manual. Retrieved from http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer_Nano_user_manual_Man0317-1.1.pdf
- Malvern Instruments Ltd. (2015). *Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 minutes*. Retrieved from https://www2.warwick.ac.uk/fac/cross_fac/sciencecity/programmes/internal/the_mes/am2/booking/particlesize/intro_to_dls.pdf
- Merck. (2017). Water for HPLC. Retrieved November 15, 2017, from <https://www.merckmillipore.com/CO/es/water-purification/learning-centers/applications/organic-analysis/hplc/.u6b.qB.UnwAAAFUs.ESsxWy,nav?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com.co%2F>
- Minitab Inc. (2015). Minitab 17. *Minitab Statistical Software*. <https://doi.org/https://www.minitab.com/en-us/products/minitab/features/>
- Muñoz, J. (2011). *Desarrollo del proceso DELOS-susp para la encapsulación de fármacos hidrofílicos en vesículas unilamelares pequeñas*. Universidad Autónoma de Barcelona. Retrieved from https://ddd.uab.cat/pub/trerecpro/2011/hdl_2072_169540/PFC_FcoJavierMunozGarcia.pdf

- Naveros, B. (2003). *Sistemas de transporte y liberación de fármacos de aplicación tópica: Liposomas multilaminares portadores de acetono de triamcinolona*. Universidad de Granada .
- Piang-Siong, W., De Caro, P., Marvilliers, A., Chasseray, X., Payet, B., Shum, A., ... Illien, B. (2017). Contribution of trans-aconitic acid to DPPH scavenging ability in different media. *Food Chemistry*, 214, 447–452. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2016.07.083>
- Posada, L. (2013). *Estandarización de un método para valorar el contenido de ácido trans aconítico en jugos de caña de azúcar*. Universidad Icesi. Retrieved from https://repository.icesi.edu.co/biblioteca_digital/bitstream/10906/77520/3/estandarizacion_metodo_valorar.pdf
- Programa de Transformación Productiva. (2016). *Cosméticos y Aseo*. Retrieved November 18, 2017, from <https://www.ptp.com.co/contenido/categoria.aspx?catID=761>
- Propaís. (2016). *Sector de Cosméticos en Colombia*. Retrieved November 18, 2017, from <http://diveco.co/wp-content/uploads/2016/03/sector-cosmeticos-en-colombia.pdf>
- Ramírez, M. (2015). *Tendencias de innovación en la ingeniería de alimentos*. (M. E. Ramírez Ortiz, Ed.). Barcelona: OmniaScience. <https://doi.org/10.3926/oms.295>
- Rodriguez, O., & Moraes, A. (2011). Analysis of process parameters on the characteristics of liposomes prepared by ethanol injection with a view to process scale-up: Effect of temperature and batch volume. *Chemical Engineering Research and Design*, 89(6), 785–792. <https://doi.org/10.1016/J.CHERD.2010.09.018>
- Ruano, M. (2013). *Fabricación de liposomas y de cápsulas poliméricas*. Universidad Complutense de Madrid.
- Sabin, J., Prieto, G., Ruso, J. M., Hidalgo-Álvarez, R., & Sarmiento, F. (2006). Size and stability of liposomes: A possible role of hydration and osmotic forces. *The European Physical Journal E*, 20(4), 401–408. <https://doi.org/10.1140/epje/i2006-10029-9>
- Sala, M., Miladi, K., Agusti, G., Elaissari, A., & Fessi, H. (2017). Preparation of liposomes: A comparative study between the double solvent displacement and the conventional ethanol injection—From laboratory scale to large scale. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 524, 71–78. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.02.084>
- Tomé, C. (2014, September). *Liposomas, ¿la medicina del futuro?* Retrieved from <http://naukas.com/2014/09/24/liposomas-la-medicina-del-futuro/>

Vera Toledo, J. L. (1995). LIPOSOMAS EN DERMATOLOGÍA. *DERMATOLOGIA VENEZOLANA*, 33, 9. Retrieved from <http://svderma.org/revista/index.php/ojs/article/viewFile/625/609>

Waters. (2017). HPLC - High Performance Liquid Chromatography Explained: Waters. Retrieved November 15, 2017, from http://www.waters.com/waters/es_ES/HPLC---High-Performance-Liquid-Chromatography-Explained/nav.htm?locale=es_ES&cid=10048919

Zeta-Meter, I. (2015). Zeta Potential: A Complete Course in 5 Minutes, 1–8. Retrieved from <http://www.zeta-meter.com/5min.pdf>

ANEXO 1: ANÁLISIS DE LOS SUPUESTOS DE NORMALIDAD Y HOMOCEDESTICIDAD

La prueba de normalidad realizada a cada una de las variables de se realizó con un 99% de confianza y un 0,01 de significancia, mediante la prueba de Kolmogórov-Smirnov. En la Figura 24, 25 y 26 se presenta la prueba de normalidad realizada para el tamaño de partícula, el índice de probabilidad y el potencial zeta, respectivamente.

La hipótesis nula y la hipótesis alterna planteadas se presentan a continuación:

- Hipótesis nula: Los datos no son diferentes de la normalidad.
- Hipótesis alterna: Los datos difieren de la normalidad.

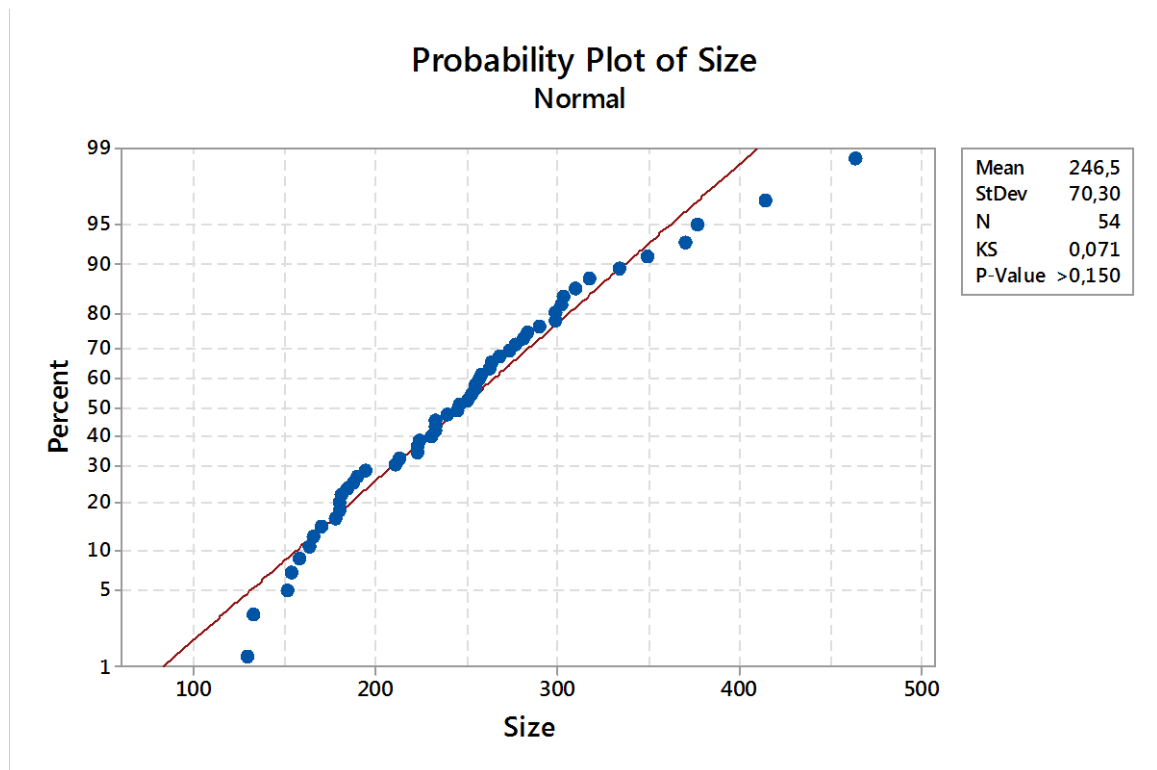


Figura 20. Prueba de normalidad de tamaño de partícula (Minitab Inc, 2015)

Teniendo en cuenta lo establecido por la literatura, si el valor p de la prueba es menor que el nivel de significancia, es decir, 0,01, se rechaza la hipótesis nula y se puede concluir que se trata de una población no normal (Minitab Inc, 2015). Sin embargo, el valor p de todas las pruebas planteadas es mayor a 0,01, por ende, se puede retener la hipótesis nula y concluir que la población no difiere de la normalidad.

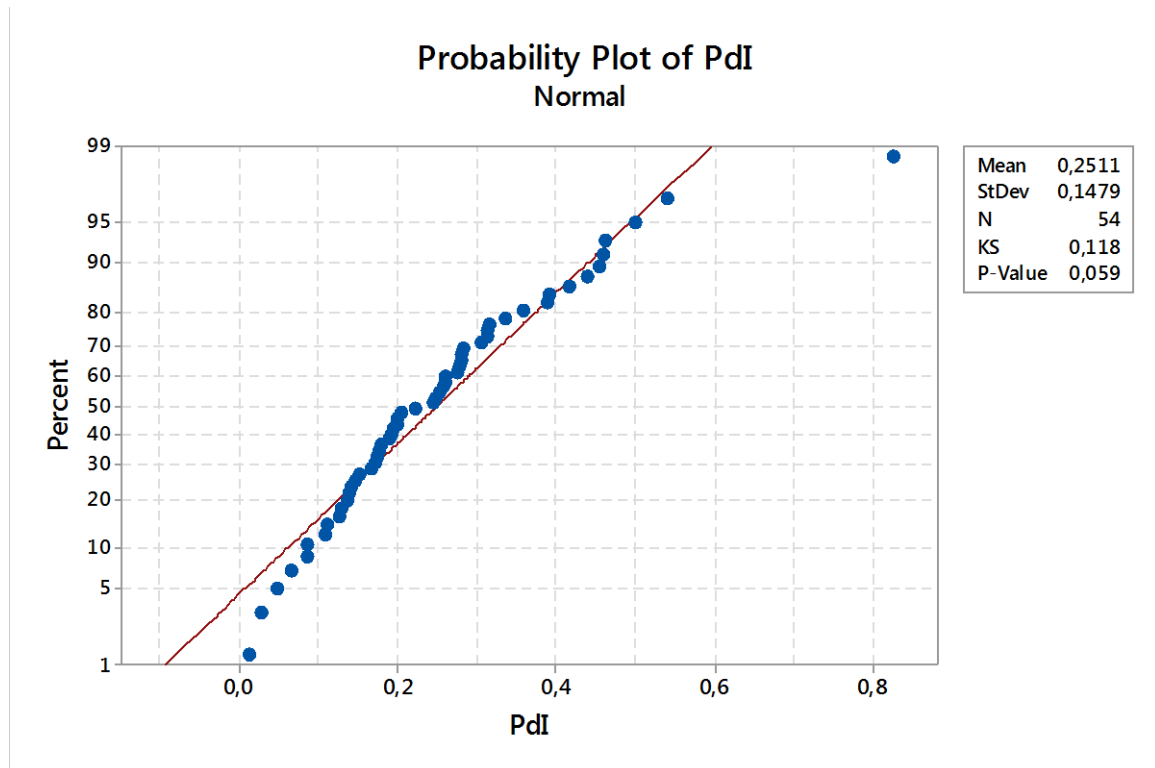


Figura 21. Prueba de normalidad del índice de polidispersidad (Minitab Inc, 2015)

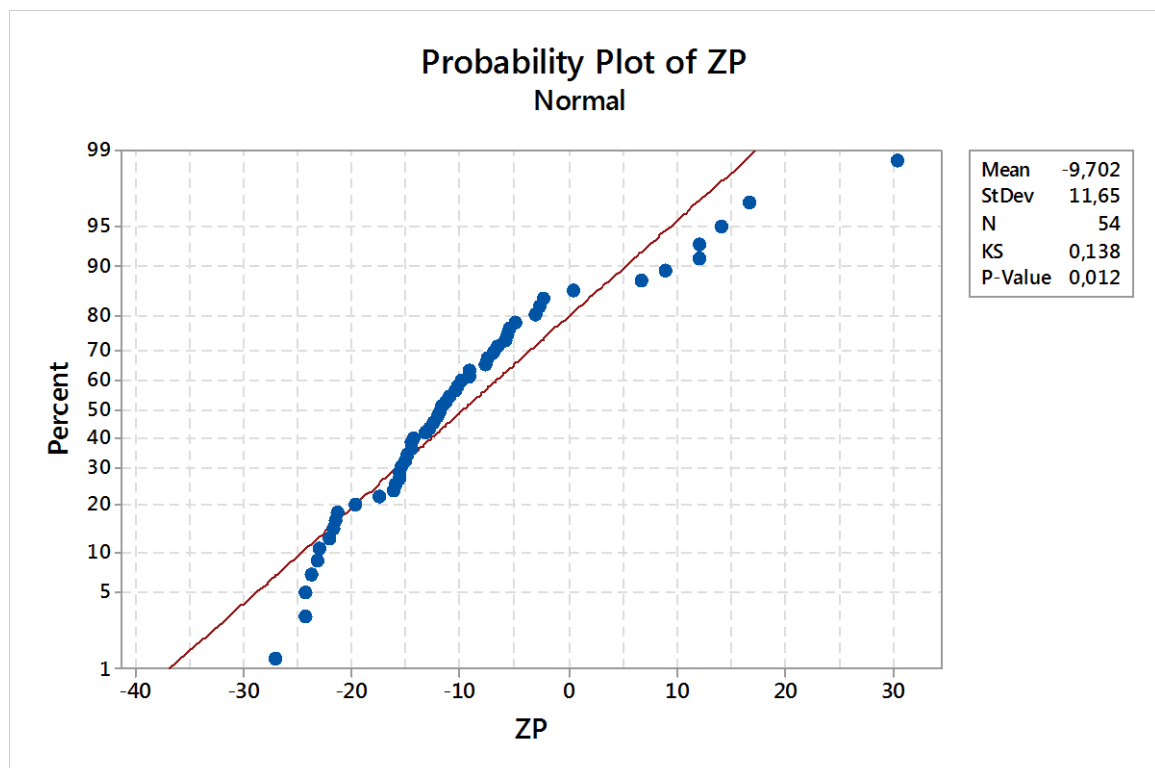


Figura 22. Prueba de normalidad del potencial zeta (Minitab Inc, 2015)

Por otra parte, para comprobar la homogeneidad o homocedasticidad de las varianzas, se utilizó la prueba de Bartlett. Esta prueba solo se utiliza cuando los datos provienen de distribuciones normales (lo cual se comprobó con el análisis anterior), debido a que la prueba no es sólida cuando los datos se apartan de la normalidad. Para esta prueba, la hipótesis nula es que las varianzas no difieren de la homogeneidad y la hipótesis alterna es que las varianzas difieren de la homogeneidad.

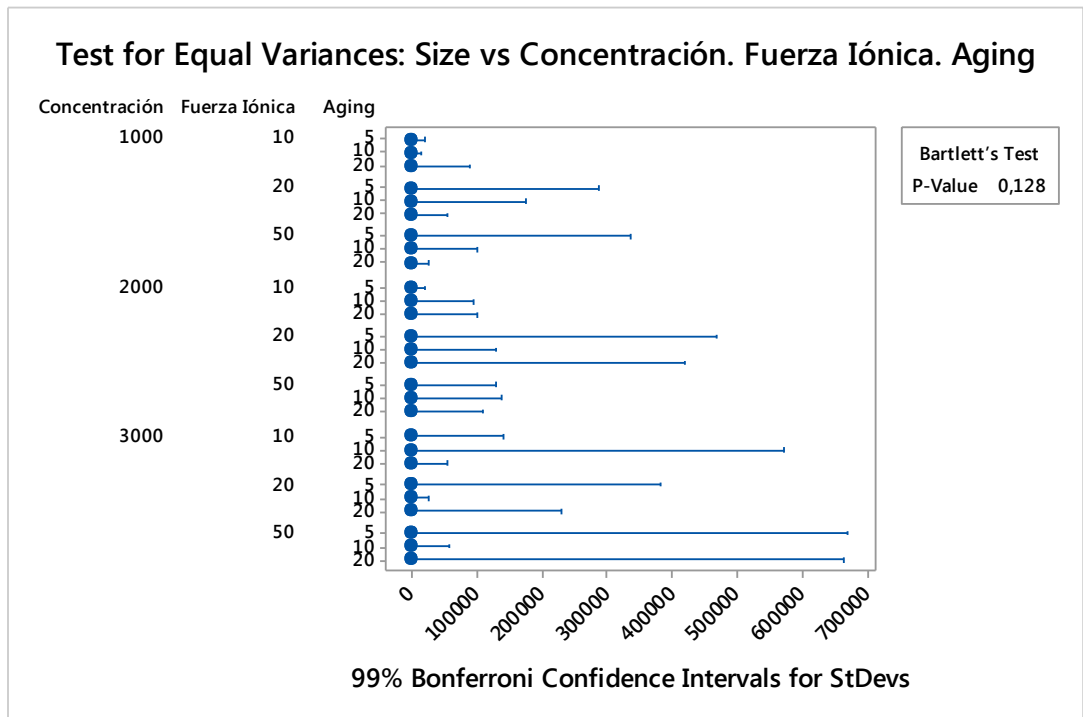


Figura 23. Prueba de homocedasticidad de varianzas para el tamaño de partícula (Minitab Inc, 2015)

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, con un 99% de confianza y un 0,01 de significancia, se puede decir que todos los valores de valor p son mayor al índice de significancia planteado, es decir, 0,01, por lo tanto, es posible retener la hipótesis nula y concluir que los varianzas no difieren de la homogeneidad.

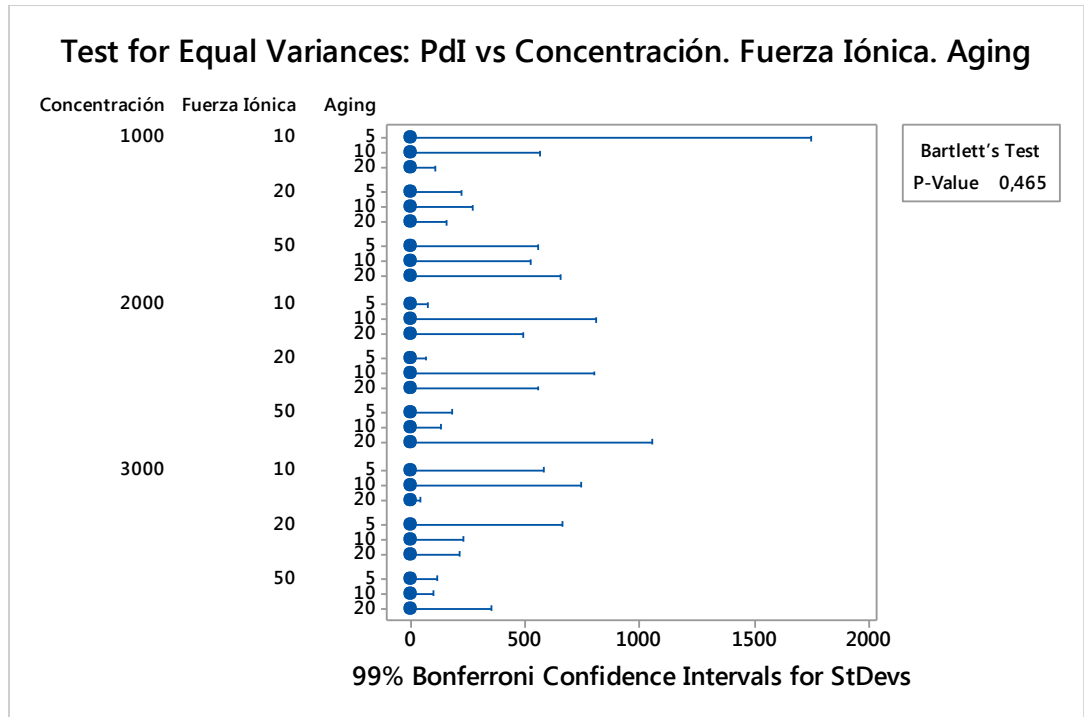


Figura 24. Prueba de homocedasticidad de varianzas para el índice de polidispersidad (Minitab Inc, 2015)

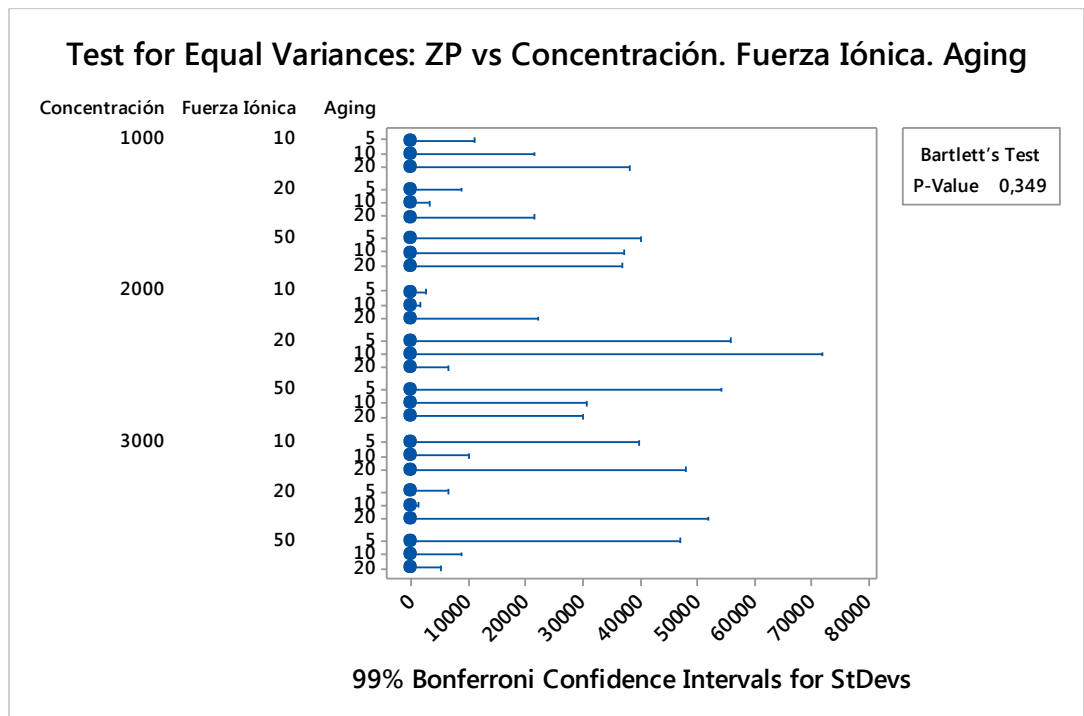


Figura 25. Prueba de homocedasticidad de varianzas para el potencial zeta (Minitab Inc, 2015)

ANEXO 2: DISEÑO EXPERIMENTAL

El modelo factorial 3³ utilizado para la preparación de los liposomas se muestra en la Tabla 2. Mediante los valores de tamaño de tamaño de partícula, índice de polidispersidad y potencial zeta obtenidos en cada uno de los puntos se realizó un modelo estadístico que será mostrado subsiguientemente.

Tabla 3. Diseño experimental factorial para determinación de variables óptimas.

Orden de corrida	Concentración de TAA (ppm)	Fuerza iónica (mM)	Tiempo de reposo (min)
1	1000	10	5
2	1000	10	10
3	1000	10	20
4	1000	20	5
5	1000	20	10
6	1000	20	20
7	1000	50	5
8	1000	50	10
9	1000	50	20
10	2000	10	5
11	2000	10	10
12	2000	10	20
13	2000	20	5
14	2000	20	10
15	2000	20	20
16	2000	50	5
17	2000	50	10
18	2000	50	20
19	3000	10	5
20	3000	10	10
21	3000	10	20
22	3000	20	5
23	3000	20	10
24	3000	20	20
25	3000	50	5
26	3000	50	10
27	3000	50	20
28	1000	10	5
29	1000	10	10
30	1000	10	20
31	1000	20	5
32	1000	20	10
33	1000	20	20

Continúa en la siguiente página...

Viene de la página...

Orden de corrida	Concentración de TAA (ppm)	Fuerza iónica (mM)	Tiempo de reposo (min)
34	1000	50	5
35	1000	50	10
36	1000	50	20
37	2000	10	5
38	2000	10	10
39	2000	10	20
40	2000	20	5
41	2000	20	10
42	2000	20	20
43	2000	50	5
44	2000	50	10
45	2000	50	20
46	3000	10	5
47	3000	10	10
48	3000	10	20
49	3000	20	5
50	3000	20	10
51	3000	20	20
52	3000	50	5
53	3000	50	10
54	3000	50	20

Los datos del análisis de varianzas y el modelo de regresión lineal obtenido en Minitab 17, para el tamaño promedio de los liposomas se presenta a continuación:

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	27	162985	6036,5	1,59	0,122
Blocks	1	17807	17807,0	4,68	0,040
Linear	6	65969	10994,8	2,89	0,027
Concentración	2	37313	18656,3	4,90	0,016
Fuerza Iónica	2	19033	9516,3	2,50	0,102
Aging	2	9624	4811,9	1,26	0,299
2-Way Interactions	12	68082	5673,5	1,49	0,191
Concentración*Fuerza Iónica	4	45830	11457,6	3,01	0,036
Concentración*Again	4	3564	891,0	0,23	0,917
Fuerza Iónica*Again	4	18688	4671,9	1,23	0,324
3-Way Interactions	8	11126	1390,8	0,37	0,929
Concentración*Fuerza Iónica*Again	8	11126	1390,8	0,37	0,929
Error	26	98979	3806,9		
Total	53	261964			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
61,7001	62,22%	22,98%	0,00%

Coefficients

Term	Coef	SE	Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant	246,54		8,40	29,36	0,000	
Blocks						
1	18,16		8,40	2,16	0,040	1,00
Concentración						
1000	-36,4		11,9	-3,06	0,005	1,33
2000	11,5		11,9	0,97	0,343	1,33
Fuerza Iónica						
10	-6,4		11,9	-0,54	0,593	1,33
20	-19,1		11,9	-1,61	0,120	1,33
Aging						
5	-5,9		11,9	-0,50	0,624	1,33
10	-12,6		11,9	-1,06	0,299	1,33
Concentración*Fuerza Iónica						
1000 10	-36,2		16,8	-2,16	0,040	1,78
1000 20	-10,4		16,8	-0,62	0,542	1,78
2000 10	25,3		16,8	1,51	0,144	1,78
2000 20	24,5		16,8	1,46	0,157	1,78
Concentración*Aging						
1000 5	12,8		16,8	0,76	0,454	1,78
1000 10	1,4		16,8	0,08	0,936	1,78
2000 5	-7,1		16,8	-0,42	0,674	1,78
2000 10	-3,7		16,8	-0,22	0,828	1,78
Fuerza Iónica*Aging						
10 5	15,1		16,8	0,90	0,377	1,78
10 10	13,3		16,8	0,79	0,435	1,78
20 5	-12,4		16,8	-0,74	0,467	1,78
20 10	13,3		16,8	0,79	0,437	1,78
Concentración*Fuerza Iónica*Aging						
1000 10 5	-8,5		23,7	-0,36	0,725	2,37
1000 10 10	-13,8		23,7	-0,58	0,566	2,37
1000 20 5	0,7		23,7	0,03	0,975	2,37
1000 20 10	11,3		23,7	0,48	0,638	2,37
2000 10 5	7,6		23,7	0,32	0,750	2,37
2000 10 10	9,3		23,7	0,39	0,698	2,37
2000 20 5	18,6		23,7	0,78	0,441	2,37
2000 20 10	-28,6		23,7	-1,20	0,239	2,37

El análisis de varianzas y el modelo de regresión lineal obtenido en Minitab 17 para el índice de polidispersidad de los liposomas se presenta a continuación:

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	27	0,69053	0,025575	1,42	0,187
Blocks	1	0,02470	0,024704	1,37	0,252
Linear	6	0,14403	0,024004	1,33	0,278
Concentración	2	0,01235	0,006175	0,34	0,713
Fuerza Iónica	2	0,10704	0,053519	2,97	0,069
Aging	2	0,02464	0,012320	0,68	0,513
2-Way Interactions	12	0,39478	0,032898	1,83	0,096
Concentración*Fuerza Iónica	4	0,27877	0,069693	3,87	0,013
Concentración*Aging	4	0,05045	0,012612	0,70	0,599
Fuerza Iónica*Aging	4	0,06556	0,016391	0,91	0,473
3-Way Interactions	8	0,12702	0,015878	0,88	0,545
Concentración*Fuerza Iónica*Aging	8	0,12702	0,015878	0,88	0,545
Error	26	0,46814	0,018006		
Total	53	1,15867			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0,134185	59,60%	17,64%	0,00%

Coefficients

Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant	0,2511	0,0183	13,75	0,000	
Blocks					
1	-0,0214	0,0183	-1,17	0,252	1,00
Concentración					
1000	-0,0210	0,0258	-0,81	0,423	1,33
2000	0,0072	0,0258	0,28	0,783	1,33
Fuerza Iónica					
10	-0,0001	0,0258	-0,00	0,997	1,33
20	0,0546	0,0258	2,11	0,044	1,33
Aging					
5	0,0206	0,0258	0,80	0,432	1,33
10	-0,0294	0,0258	-1,14	0,265	1,33
Concentración*Fuerza Iónica					
1000 10	0,1230	0,0365	3,37	0,002	1,78
1000 20	-0,1150	0,0365	-3,15	0,004	1,78
2000 10	-0,0949	0,0365	-2,60	0,015	1,78
2000 20	0,0630	0,0365	1,72	0,096	1,78
Concentración*Aging					
1000 5	0,0445	0,0365	1,22	0,234	1,78
1000 10	-0,0376	0,0365	-1,03	0,312	1,78
2000 5	0,0031	0,0365	0,08	0,933	1,78
2000 10	0,0243	0,0365	0,67	0,511	1,78
Fuerza Iónica*Aging					
10 5	0,0092	0,0365	0,25	0,803	1,78
10 10	0,0111	0,0365	0,30	0,764	1,78
20 5	0,0352	0,0365	0,96	0,344	1,78
20 10	0,0108	0,0365	0,29	0,771	1,78
Concentración*Fuerza Iónica*Aging					
1000 10 5	0,1122	0,0516	2,17	0,039	2,37
1000 10 10	-0,0760	0,0516	-1,47	0,153	2,37
1000 20 5	-0,0280	0,0516	-0,54	0,593	2,37
1000 20 10	0,0406	0,0516	0,79	0,439	2,37
2000 10 5	-0,0553	0,0516	-1,07	0,294	2,37
2000 10 10	0,0122	0,0516	0,24	0,815	2,37
2000 20 5	0,0167	0,0516	0,32	0,748	2,37
2000 20 10	0,0265	0,0516	0,51	0,612	2,37

El análisis de varianzas y el modelo de regresión lineal obtenido en Minitab 17 para el potencial zeta de los liposomas evaluados se muestra a continuación:

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	27	5669,59	209,98	3,57	0,001
Blocks	1	67,91	67,91	1,15	0,293
Linear	6	2978,69	496,45	8,44	0,000
Concentración	2	510,37	255,19	4,34	0,024
Fuerza Iónica	2	1949,29	974,65	16,57	0,000
Aging	2	519,02	259,51	4,41	0,022
2-Way Interactions	12	2443,25	203,60	3,46	0,004
Concentración*Fuerza Iónica	4	1967,45	491,86	8,36	0,000
Concentración*Aging	4	253,20	63,30	1,08	0,389
Fuerza Iónica*Aging	4	222,60	55,65	0,95	0,453
3-Way Interactions	8	179,74	22,47	0,38	0,921
Concentración*Fuerza Iónica*Aging	8	179,74	22,47	0,38	0,921
Error	26	1529,57	58,83		
Total	53	7199,16			

Model Summary

S	R-sq	R-sq (adj)	R-sq (pred)
7,67004	78,75%	56,69%	8,35%

Coefficients

Term	Coef	SE	Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant	-9,70	1,04		-9,30	0,000	
Blocks						
1	1,12	1,04		1,07	0,293	1,00
Concentración						
1000	-1,32	1,48		-0,89	0,380	1,33
2000	4,25	1,48		2,88	0,008	1,33
Fuerza Iónica						
10	-2,77	1,48		-1,88	0,071	1,33
20	8,34	1,48		5,65	0,000	1,33
Aging						
5	4,38	1,48		2,97	0,006	1,33
10	-2,21	1,48		-1,50	0,146	1,33
Concentración*Fuerza Iónica						
1000 10	4,51	2,09		2,16	0,040	1,78
1000 20	-10,07	2,09		-4,83	0,000	1,78
2000 10	-6,94	2,09		-3,32	0,003	1,78
2000 20	10,25	2,09		4,91	0,000	1,78
Concentración*Aging						
1000 5	-2,94	2,09		-1,41	0,170	1,78
1000 10	-0,07	2,09		-0,03	0,972	1,78
2000 5	-0,77	2,09		-0,37	0,714	1,78
2000 10	0,83	2,09		0,40	0,696	1,78
Fuerza Iónica*Aging						
10 5	-0,12	2,09		-0,06	0,953	1,78
10 10	2,06	2,09		0,99	0,332	1,78
20 5	2,76	2,09		1,32	0,198	1,78
20 10	-3,27	2,09		-1,57	0,129	1,78
Concentración*Fuerza Iónica*Aging						
1000 10 5	0,70	2,95		0,24	0,816	2,37
1000 10 10	0,14	2,95		0,05	0,962	2,37
1000 20 5	-3,30	2,95		-1,12	0,274	2,37
1000 20 10	2,96	2,95		1,00	0,325	2,37
2000 10 5	0,28	2,95		0,09	0,926	2,37
2000 10 10	-0,26	2,95		-0,09	0,929	2,37
2000 20 5	1,84	2,95		0,62	0,538	2,37
2000 20 10	-3,58	2,95		-1,21	0,237	2,37

El análisis de varianzas y el modelo de regresión lineal obtenido en Minitab 17 para la conductividad eléctrica de los liposomas evaluados se muestra a continuación:

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	27	102,536	3,7976	199,68	0,000
Blocks	1	0,118	0,1178	6,19	0,020
Linear	6	101,897	16,9829	892,95	0,000
Concentración	2	0,069	0,0347	1,82	0,182
Fuerza Iónica	2	101,730	50,8650	2674,46	0,000
Aging	2	0,098	0,0489	2,57	0,096
2-Way Interactions	12	0,246	0,0205	1,08	0,415
Concentración*Fuerza Iónica	4	0,088	0,0219	1,15	0,354
Concentración*Aging	4	0,097	0,0243	1,28	0,305
Fuerza Iónica*Aging	4	0,061	0,0154	0,81	0,532
3-Way Interactions	8	0,274	0,0343	1,80	0,122
Concentración*Fuerza Iónica*Aging	8	0,274	0,0343	1,80	0,122
Error	26	0,494	0,0190		
Total	53	103,030			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0,137909	99,52%	99,02%	97,93%

Coefficients						
Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF	
Constant	2,3593	0,0188	125,72	0,000		
Blocks						
1	0,0467	0,0188	2,49	0,020	1,00	
Concentración						
1000	-0,0441	0,0265	-1,66	0,109	1,33	
2000	0,0004	0,0265	0,01	0,989	1,33	
Fuerza Iónica						
10	-1,3925	0,0265	-52,47	0,000	1,33	
20	-0,4749	0,0265	-17,89	0,000	1,33	
Aging						
5	0,0417	0,0265	1,57	0,128	1,33	
10	-0,0585	0,0265	-2,20	0,037	1,33	
Concentración*Fuerza Iónica						
1000 10	0,0230	0,0375	0,61	0,546	1,78	
1000 20	-0,0470	0,0375	-1,25	0,221	1,78	
2000 10	0,0185	0,0375	0,49	0,626	1,78	
2000 20	-0,0331	0,0375	-0,88	0,385	1,78	
Concentración*Aging						
1000 5	-0,0234	0,0375	-0,62	0,538	1,78	
1000 10	-0,0079	0,0375	-0,21	0,834	1,78	
2000 5	-0,0552	0,0375	-1,47	0,153	1,78	
2000 10	0,0468	0,0375	1,25	0,224	1,78	
Fuerza Iónica*Aging						
10 5	0,0612	0,0375	1,63	0,115	1,78	
10 10	-0,0508	0,0375	-1,35	0,187	1,78	
20 5	-0,0445	0,0375	-1,19	0,247	1,78	
20 10	0,0340	0,0375	0,91	0,373	1,78	
Concentración*Fuerza Iónica*Aging						
1000 10 5	-0,0696	0,0531	-1,31	0,201	2,37	
1000 10 10	0,0930	0,0531	1,75	0,091	2,37	
1000 20 5	0,0579	0,0531	1,09	0,286	2,37	
1000 20 10	-0,0110	0,0531	-0,21	0,838	2,37	
2000 10 5	-0,0299	0,0531	-0,56	0,579	2,37	
2000 10 10	0,0558	0,0531	1,05	0,303	2,37	
2000 20 5	0,0863	0,0531	1,63	0,116	2,37	
2000 20 10	-0,0940	0,0531	-1,77	0,088	2,37	

Teniendo en cuenta lo anterior, es posible decir que todos los factores evaluados afectan de diferente manera las variables de respuestas, y que en algunos casos se presentan interacción entre ellos. En general, los modelos ajustados presentan un buen coeficiente de correlación, lo que permite tomar decisiones con confianza.

ANEXO 3. CARACTERIZACIÓN DE LIPOSOMAS

En la Tabla 3 se presentan los valores de tamaño de partícula, índice de polidispersidad, potencial zeta y conductividad eléctrica encontrados al realizar la caracterización de los sistemas liposomales.

Tabla 4. Caracterización de liposomas

Orden de corrida	Concentración de TAA (ppm)	Fuerza iónica (mM)	Tiempo de reposo (min)	Tamaño de partícula (nm)	Pdl	Potencial zeta promedio (mV)	Conductividad eléctrica (mV)
1	1000	10	5	177,6	0,253	-9,07	0,974
2	1000	10	10	153,5	0,314	-5,83	0,919
3	1000	10	20	180,5	0,281	-4,95	0,983
4	1000	20	5	128,9	0,278	-13,30	1,860
5	1000	20	10	165,3	0,109	-14,80	1,720
6	1000	20	20	181,1	0,139	-7,52	1,730
7	1000	50	5	349,2	0,195	-16,20	4,370
8	1000	50	10	230,5	0,200	-9,09	4,170
9	1000	50	20	309,9	0,177	-2,21	4,340
10	2000	10	5	290,1	0,153	-11,00	1,040
11	2000	10	10	298,8	0,314	-14,50	0,973
12	2000	10	20	277,2	0,248	-23,00	0,982
13	2000	20	5	333,5	0,463	12,20	2,020
14	2000	20	10	253,0	0,276	-6,90	1,760
15	2000	20	20	370,6	0,176	12,10	1,790
16	2000	50	5	170,3	0,283	-6,56	4,320
17	2000	50	10	187,4	0,148	-5,63	4,220
18	2000	50	20	281,3	0,111	-11,90	4,500
19	3000	10	5	303,3	0,066	0,56	1,430
20	3000	10	10	377,3	0,173	-12,10	0,991
21	3000	10	20	255,0	0,260	-27,10	1,010
22	3000	20	5	257,6	0,282	8,94	2,000
23	3000	20	10	262,7	0,261	-9,86	2,110
24	3000	20	20	223,6	0,389	-2,61	2,010
25	3000	50	5	414,4	0,180	-7,75	4,360
26	3000	50	10	250,8	0,168	-21,50	4,300
27	3000	50	20	463,4	0,305	-22,10	4,080
28	1000	10	5	184,5	0,826	-5,48	0,937
29	1000	10	10	158,1	0,128	-12,90	0,924
30	1000	10	20	151,0	0,316	-17,50	0,937
31	1000	20	5	223,0	0,206	-10,40	1,790
32	1000	20	10	222,8	0,199	-15,90	1,780
33	1000	20	20	163,2	0,087	-14,60	1,880

Continúa en la siguiente página...

Viene de la página...

Orden de corrida	Concentración de TAA (ppm)	Fuerza Iónica (mM)	Tiempo de reposo (min)	Tamaño de partícula (nm)	PdI	Potencial zeta promedio (mV)	Conductividad eléctrica (mV)
34	1000	50	5	239,1	0,013	-3,03	4,070
35	1000	50	10	263,5	0,028	-21,30	3,980
36	1000	50	20	301,5	0,392	-14,30	4,310
37	2000	10	5	283,1	0,129	-11,80	0,967
38	2000	10	10	267,7	0,049	-15,00	0,985
39	2000	10	20	244,4	0,087	-15,70	0,967
40	2000	20	5	179,7	0,440	30,50	1,740
41	2000	20	10	210,6	0,54	16,70	1,800
42	2000	20	20	233,1	0,360	14,20	2,000
43	2000	50	5	213,2	0,224	-24,40	3,990
44	2000	50	10	232,9	0,192	-15,70	4,350
45	2000	50	20	317,3	0,456	-21,80	4,070
46	3000	10	5	257,3	0,258	-12,50	1,070
47	3000	10	10	189,6	0,418	-15,40	0,353
48	3000	10	20	272,9	0,245	-11,30	0,960
49	3000	20	5	132,3	0,500	6,77	1,880
50	3000	20	10	254,3	0,337	-10,30	1,990
51	3000	20	20	298,7	0,460	-19,70	2,060
52	3000	50	5	194,5	0,142	-23,20	4,400
53	3000	50	10	232,3	0,136	-24,40	4,090
54	3000	50	20	245,6	0,189	-23,80	4,160

En la Figura 19 y 20 se presenta la gráfica de distribución de potencial zeta y conductividad eléctrica respectivamente.

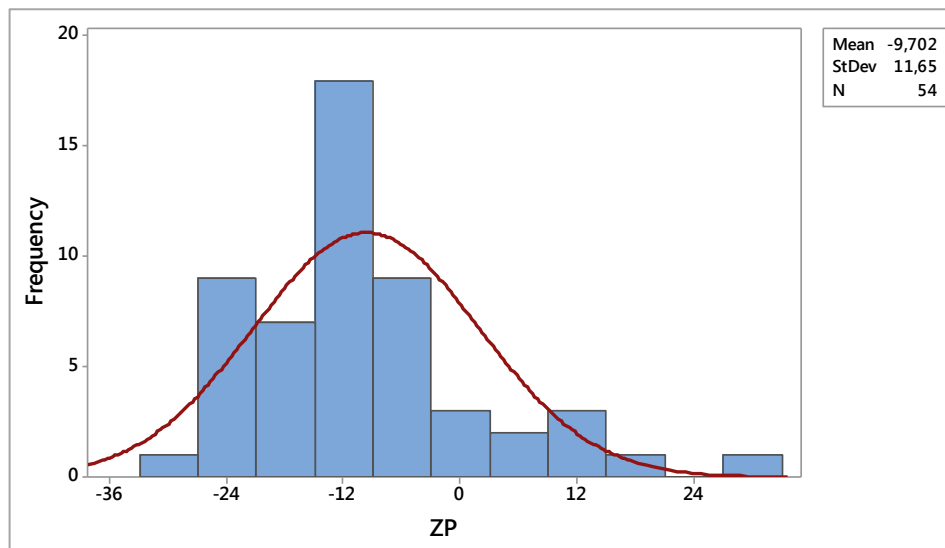


Figura 26. Distribución del potencial zeta (Minitab Inc, 2015)

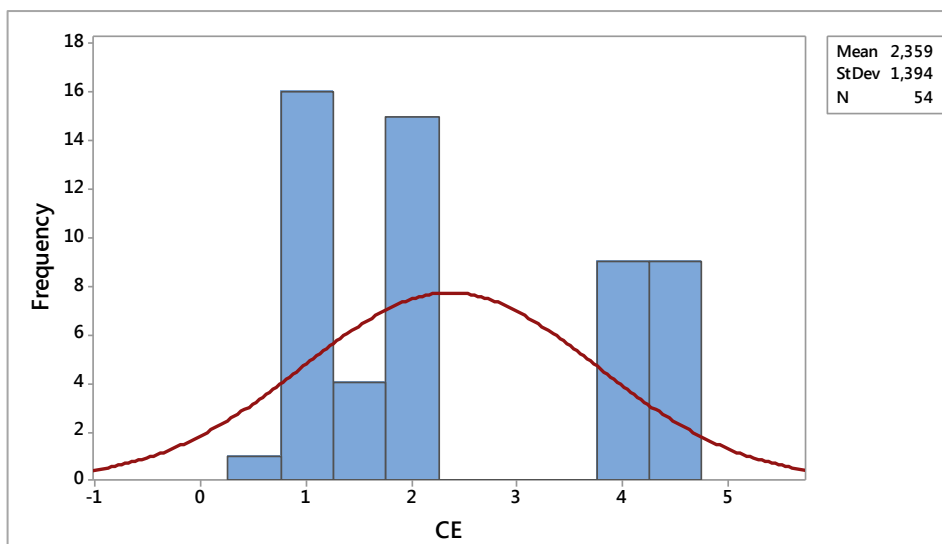


Figura 27. Distribución de la conductividad eléctrica (Minitab Inc, 2015)

De acuerdo con la Figura 19, se puede decir que el potencial zeta presenta una asimetría positiva, es decir, es más probable encontrar valores de potencial zeta menores de -9,702 y una curtosis positiva, es decir, los datos de potencial zeta no se alejan significativamente del valor promedio de esta (ver Tabla 4).

Por otra parte, la conductividad eléctrica encontrada para los sistemas liposomales evaluados fue de 2,359 mV (ver Figura 20), con una asimetría positiva, es decir, con mayor densidad de datos menores a 2,359 mV. Sin embargo, a diferencia de los casos anteriores, la conductividad eléctrica presenta una curtosis negativa, la cual se puede deber, a que tal como se observa en la Figura 20, existen algunos datos que se alejan del valor promedio de esta variable.

ANEXO 4. CURVA DE CALIBRACIÓN Y METODOLOGÍA UTILIZADA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO TRANS ACONÍTICO

Teniendo en cuenta las diferentes diluciones realizadas durante el proceso de obtención de los sistemas liposomales y considerando un porcentaje de encapsulación de TAA del 0% (ver Tabla 4), se prepararon diferentes estándares con el fin obtener una curva de calibración que incluyera los diferentes sistemas evaluados.

Tabla 5. Concentración de TAA antes y después de la preparación de liposomas

Concentración inicial de TAA (ppm)	Concentración de TAA para un porcentaje de encapsulación del 0% (ppm)
1000	50
2000	100
3000	150

La curva de calibración se realizó teniendo en cuenta el “*Procedimiento operativo estándar (POE) para la utilización del método analítico cromatográfico para la cuantificación de ácido trans aconítico presente en la melaza proveniente de la caña de azúcar*” planteado por Sandra Orozco Pabón en su trabajo de grado titulado “Validación del método cromatográfico HPLC-PDA para la cuantificación de Ácido trans-Aconítico presente en la melaza proveniente de la caña de azúcar”.

Dicho lo anterior, la descripción del procedimiento se presenta a continuación:

1. PROCEDIMIENTO PARA CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO TRANS ACONÍTICO

1.1. Preparación de fase móvil: Solución A: Solución B (95:5)

Solución A: Se tomaron 500 mL de Agua tipo I en un beaker y se ajustó el pH a 2,5 con ácido clorhídrico 10 M. Seguidamente, se filtró con una membrana de 0,45 µm mediante el equipo de filtración y se desgasificó con ultrasonido.

Solución B: Se tomaron 500 mL de acetonitrilo grado HPLC, se filtró con membrana de 0,45 µm mediante el equipo de filtración y se desgasificó con ultrasonido.

Posteriormente, se llevaron las soluciones A y B al equipo de HPLC-PDA y cada una de ellas se colocó en una línea del equipo. Finalmente, se programó el método instrumental para realizar la mezcla isocrática.

Nota: No se realizó la mezcla de forma manual debido a que el método es sensible a las variaciones en las proporciones de la fase móvil y se podía generar cambios en el tiempo de retención.

Las condiciones cromatográficas utilizadas para realizar las mediciones se muestran a continuación:

Condiciones cromatográficas:

- Equipo HPLC con detector PDA (Lachrom Elite Merck).
- Columna: Chromolith HighResolution RP-18 endcapped 5 x 4.6 mm
- Flujo: 0,8 mL/min
- Temperatura: 25 °C
- Fase móvil: Agua pH 2,5 (con HCl): Acetonitrilo (90:10)
- Longitud de onda: 240 nm
- Volumen de inyección: 10 µL
- Tiempo de retención aproximado: 2,5 minutos

Nota 1: Se utilizó siempre pre-columna con el objetivo de prolongar la vida de la columna cromatográfica, debido a la complejidad de la muestra.

Nota 2: Se equilibró la pre-columna con fase móvil 30 minutos.

Posteriormente, se prepararon los estándares de TAA para realizar la curva de calibración.

1.2. Preparación de curva de calibración de estándares de ácido trans aconítico:

En un balón de 25 mL se pesaron 10 mg de estándar de TAA y se adicionó 10 mL de agua tipo I, se tapó el balón y se agitó manualmente por 5 minutos. Seguidamente, se completó a volumen con agua tipo I, se tapó y se agitó manualmente. (**Solución stock**).

Posteriormente, se rotularon 5 balones volumétricos de 10 mL como 5, 30, 75 y 100 ppm, se adicionaron alícuotas de 0.13, 0.75, 1.88 y 2.5 mL de la solución stock a cada balón respectivamente, se completó a volumen con agua tipo I, se tapó y se agitó manualmente por 5 minutos. Cada una de las soluciones preparadas se filtró mediante una jeringa con filtro de 0,22 µm y se llevó a un vial de inyección. (**Soluciones estándar de curva de calibración**).

1.3. Preparación de la muestra de ácido trans aconítico:

Teniendo en cuenta las variables concentración y fuerza iónica, se prepararon soluciones de TAA mediante la metodología utilizada para la preparación de liposomas. Sin embargo, solo se utilizó etanol en la fase orgánica. Por otra parte, no se tuvo en cuenta la variable tiempo, debido a que en este proceso no se obtendrían liposomas, ya que el objetivo de este procedimiento era observar la influencia de la metodología utilizada para la preparación de liposomas sobre el componente activo (TAA), y de esta manera conocer la concentración teórica de TAA esperada en cada uno de los sistemas evaluados cuando se considera una eficiencia de encapsulación del 0%.

Cada una de las muestras descritas anteriormente se llevó a 1 mL con buffer, se filtró mediante una jeringa con filtro de 0,22 μm y se llevó a un vial de inyección. **(Solución muestra de TAA).**

1.4. Preparación de las muestras de ácido trans aconítico no encapsulado:

Se tomó cada una de las alícuotas obtenidas durante el proceso de ultrafiltración/centrifugación en el procedimiento de preparación de liposomas y se llevó a 1 mL con el buffer utilizado durante la preparación de los sistemas liposomales. Cada una de las muestras obtenidas se filtró de la misma manera que se realizó con las soluciones estándar y se llevó a un vial de inyección. **(Soluciones muestra de TAA no encapsulado).**

Al realizar la inyección de las soluciones estándar y las soluciones muestra de TAA, se procesaron los datos en el equipo HPLC-PDA y se calculó el porcentaje de TAA.

Inicialmente se evaluaron los datos obtenidos de cada una de las muestras estándar (ver Tabla 9) y a partir de estos se graficó la curva de calibración, la cual se presenta en la Figura 30.

Tabla 6. Datos de áreas obtenidos para los diferentes estándares de TAA

Concentración de TAA (ppm)	Área
5	292790
30	2005172
75	5719092
100	7454027

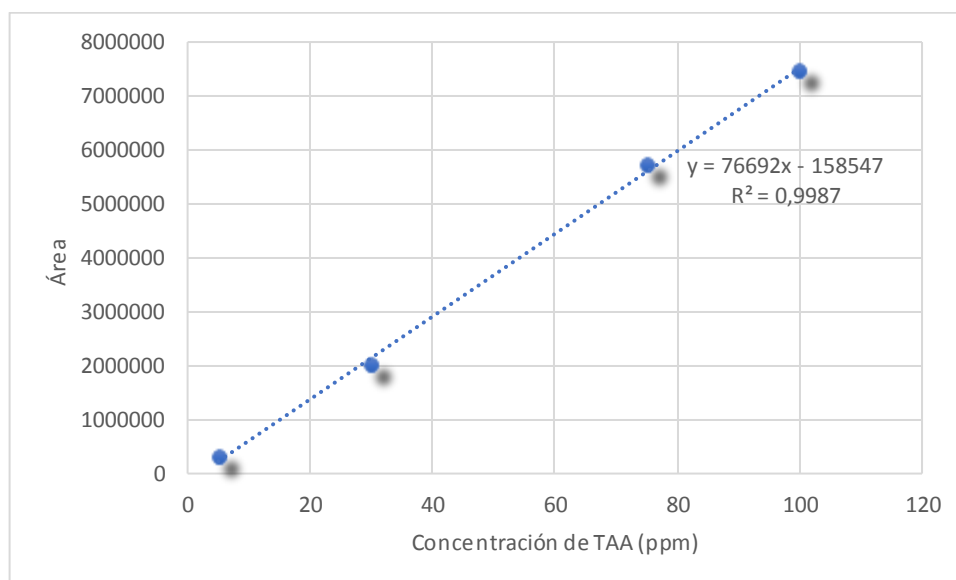


Figura 28. Curva de calibración

ANEXO 5. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO TRANS ACONÍTICO NO ENCAPSULADO

Con base en la ecuación de la recta de la curva de calibración (ver Figura ...) se calculó la concentración de TAA mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración TAA (ppm)} = \frac{\text{Área muestra} - \text{Intercepto curva de std}}{\text{Pendiente curva std}} \quad \text{(Ecuación 3)}$$

En la Tabla 6 se presentan las concentraciones de TAA obtenidas para cada una de las muestras evaluadas.

Tabla 7. Datos de Área y Concentración de TAA para cada una de las diferentes muestras control evaluadas

Muestra	Concentración Teórica	Fuerza iónica (mM)	Área	Concentración total (ppm)	Concentración total promedio (ppm) ¹
S1	1000	10	4247041	56,411	39,368
S2	1000	10	1337030	17,043	
S3	1000	20	2553677	33,503	37,594
S4	1000	20	3158470	41,685	
S5	1000	30	2295460	30,009	45,536
S6	1000	30	4590838	61,062	
S7	2000	10	5461234	72,838	68,515
S8	2000	10	4822173	64,192	
S9	2000	20	3817263	50,597	86,680
S10	2000	20	9151549	122,762	
S11	2000	30	3806845	50,456	88,680
S12	2000	30	9382165	125,882	
S13	3000	10	6532904	87,336	145,970
S14	3000	10	15201164	204,604	
S15	3000	20	11210024	150,610	140,687
S16	3000	20	9743057	130,764	
S17	3000	30	5631712	75,144	103,618
S18	3000	30	9841255	132,093	

¹La concentración total promedio hace referencia a la concentración de TAA que se espera obtener cuando se tiene un porcentaje de encapsulación de 0%.

La concentración de TAA no encapsulada durante el proceso de fabricación se calculó de la misma forma que las muestras control. Los valores encontrados se reportan en la Tabla 11.

Tabla 8. Datos de Áreas y Concentración de TAA no encapsulado

Muestra	Concentración Teórica	Fuerza iónica (mM)	Tiempo de reposos (min)	Área	Concentración de TAA no encapsulado (ppm)	Concentración promedio (ppm)
1	1000	10	5	287272	2,842	9,118
2	1000	10	5	1215210	15,395	
3	1000	10	10	726635	8,786	10,302
4	1000	10	10	950868	11,819	
5	1000	10	20	374630	4,023	6,971
6	1000	20	20	810382	9,918	
7	1000	20	5	1814266	23,500	17,830
8	1000	20	5	976164	12,161	
9	1000	20	10	781445	9,527	7,276
10	1000	20	10	448701	5,025	
11	1000	20	20	981971	12,240	18,418
12	1000	20	20	1895332	24,596	
13	1000	30	5	1294668	16,470	15,572
14	1000	30	5	1161870	14,674	
15	1000	30	10	1786431	23,123	16,995
16	1000	30	10	880439	10,866	
17	1000	30	20	824682	10,112	13,084
18	1000	30	20	1264002	16,055	
19	2000	10	5	1033989	12,944	13,995
20	2000	10	5	1189426	15,046	
21	2000	10	10	2514734	32,976	29,948
22	2000	10	10	2067151	26,921	
23	2000	10	20	819312	10,039	11,361
24	2000	20	20	1014676	12,682	
25	2000	20	5	3102030	40,921	27,388
26	2000	20	5	1101288	13,854	
27	2000	20	10	4342370	57,701	68,580
28	2000	20	10	5950605	79,458	
29	2000	20	20	1837539	23,814	18,919
30	2000	20	20	1113756	14,023	
31	2000	30	5	2632042	34,563	41,024
32	2000	30	5	3587212	47,485	
33	2000	30	10	3108131	41,004	33,144
34	2000	30	10	1946228	25,285	
35	2000	30	20	5528404	73,746	55,112
36	2000	30	20	2773541	36,477	
37	3000	10	5	4708291	62,651	53,011
38	3000	10	5	3283150	43,371	
39	3000	10	10	3320250	43,873	28,011
40	3000	10	10	975205	12,148	
41	3000	10	20	8343487	111,830	87,090
42	3000	20	20	4686018	62,350	
43	3000	20	5	2135475	27,845	29,734
44	3000	20	5	2414761	31,623	
45	3000	20	10	2968833	39,119	53,568
46	3000	20	10	5104947	68,018	

Continúa en la siguiente página...

Viene de la página...

Muestra	Concentración Teórica	Fuerza Iónica (mM)	Tiempo de reposos (min)	Área	Concentración de TAA no encapsulado (ppm)	Concentración Promedio (ppm)
47	3000	20	20	5038423	67,118	65,594
48	3000	20	20	4813139	64,070	
49	3000	30	5	4626364	61,543	89,840
50	3000	30	5	8809675	118,137	
51	3000	30	10	1595238	20,536	39,794
52	3000	30	10	4442184	59,051	
53	3000	30	20	3686681	48,831	52,329
54	3000	30	20	4203940	55,828	

ANEXO 6. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO TRANS ACONÍTICO ENCAPSULADO


En la Tabla 12 se presentan los porcentajes de eficiencia de encapsulación de TAA.

Tabla 9. Datos de eficiencia de encapsulación de ácido trans aconítico

Muestra	Concentración promedio de TAA no encapsulado (ppm)	% Eficiencia de encapsulación	Concentración total promedio de TAA (ppm) ¹	Concentración promedio de TAA encapsulado (ppm)
1	9,118	76,833	39,360	30,242
2	10,302	73,826	39,360	29,058
3	6,971	82,289	39,360	32,389
4	17,830	52,566	37,590	19,760
5	7,276	80,643	37,590	30,314
6	18,418	51,003	37,590	19,172
7	15,572	65,806	45,540	29,968
8	16,995	62,682	45,540	28,545
9	13,084	71,270	45,540	32,456
10	13,995	79,575	68,520	54,525
11	29,948	56,293	68,520	38,572
12	11,361	83,420	68,520	57,159
13	27,388	68,404	86,680	59,292
14	68,580	20,882	86,680	18,100
15	18,919	78,174	86,680	67,761
16	41,024	53,472	88,170	47,146
17	33,144	62,409	88,170	55,026
18	55,112	37,494	88,170	33,058
19	53,011	63,683	145,970	92,959
20	28,011	80,811	145,970	117,959
21	87,090	40,337	145,970	58,880
22	29,734	78,865	140,690	110,956
23	53,568	61,925	140,690	87,122
24	65,594	53,377	140,690	75,096
25	89,840	13,299	103,620	13,780
26	39,794	61,596	103,620	63,826
27	52,329	49,499	103,620	51,291

¹La concentración total promedio de TAA hace referencia al promedio de los valores de las muestras control.

ANEXO 7. PROTOCOLO DE PREPARACIÓN DE SISTEMAS LIPOSOMALES PARA APLICACIÓN COMO MATRIZ DE VEHICULIZACIÓN DE ÁCIDO TRANS ACONÍTICO

	PROTOCOLO DE PREPARACIÓN DE SISTEMAS LIPOSOMALES PARA APLICACIÓN COMO MATRIZ DE VEHICULIZACIÓN DE ÁCIDO TRANS ACONÍTICO	NÚMERO:018 – 05
		PÁGINAS: 72 de 5
		FECHA DE EMISIÓN: 16/MAY/2018

REALIZADO POR:	REVISADO POR:	APROBADO POR:
Nombre: Julieth Dayana Sánchez Benavidez	Nombre: Cristhian Javier Yarce Castellanos	Nombre: Cristhian Javier Yarce Castellanos
Firma:	Firma:	Firma:
Cargo: Estudiante de Química Farmacéutica	Cargo: Director de proyecto de grado	Cargo: Director de proyecto de grado
Fecha:	Fecha:	Fecha:

1. OBJETIVO

- 1.1. Obtener un protocolo de preparación de liposomas para vehicular ácido trans aconítico con una eficiencia de encapsulación superior al 40%, a partir del método de inyección de etanol.

2. ALCANCE

Este documento está dirigido a los estudiantes y profesores del grupo de investigación de fisicoquímica farmacéutica.

3. ANTECEDENTES

El ácido trans aconítico es uno de los ácidos orgánicos desechados en el proceso de extracción y purificación del jugo de caña de azúcar, dado que se convierte en una interfaz de este proceso. Dentro de los ácidos orgánicos desechados en este proceso se encuentran, el ácido málico, el ácido cítrico, el ácido glicólico y el ácido aconítico (cis-aconítico y trans-aconítico), los cuales han sido utilizados en formulaciones cosméticas y dermatológicas por su uso como peeling químico. Por ende, es de pensarse que el ácido trans aconítico tenga gran potencial como componente en formulaciones cosméticas (Posada, 2013).

A su vez, el grupo de investigación de fisicoquímica farmacéutica de la universidad Icesi se encuentra trabajando en el diseño y formación de liposomas. Dentro de las aplicaciones de los liposomas se encuentra su uso como matriz cosmética, dado que, al ser formados mediante componentes biocompatibles y no tóxicos, lo hacen fácilmente absorbibles por las células de la dermis.

Por tanto, el uso de ácido trans aconítico como componente bioactivo en sistemas liposomales, permite innovar en las investigaciones del área cosmética en Colombia. Al mismo tiempo, se estaría disminuyendo los desechos de la caña de azúcar y contribuyendo al desarrollo de la bioprospección de productos naturales en el Valle del Cauca.

4. RESPONSABILIDAD Y AURORIDAD

- 4.1. El estudiante encargado de la preparación de sistemas liposomales que encapsulen ácido trans aconítico debe seguir paso a paso el procedimiento, teniendo en cuenta las necesidades del estudio que este realizando.
- 4.2. El director del proyecto de grado encargado del laboratorio de fisicoquímica farmacéutica debe revisar que el protocolo de preparación de sistemas liposomales se esté realizando.

5. DEFINICIONES

- 5.1. *Liposomas*: Vesícula esférica con una membrana compuesta de una doble capa de fosfolípidos, que consta de una parte hidrosoluble y otra liposoluble.
- 5.2. *DLS*: Dispersión de luz dinámica. Técnica utilizada para determinación de tamaño de partícula.
- 5.3. *Pdl*: Índice de polidispersidad.
- 5.4. *HPLC*: Cromatografía líquida de alta eficiencia.
- 5.5. *PDA*: Detector de arreglo de fotodiodos.

6. PARÁMETROS QUE EVALUAR DURANTE LA PREPARACIÓN

- 6.1. *Tamaño de partícula*: Indica el tamaño de los liposomas.
- 6.2. *Índice de polidispersidad*: Indica el grado de variación o amplitud de una campana gaussiana que representa los tamaños de partícula.
- 6.3. *Potencial zeta*: Describe la intensidad del campo eléctrico estático de la capa doble.
- 6.4. *Porcentaje de eficiencia de encapsulación*: Porcentaje de ácido trans aconítico que logra ser encapsulado en los sistemas liposomales.

7. MATERIALES Y EQUIPOS

7.1. ELEMENTOS DE HIGIENE Y SEGURIDAD PERSONAL

Durante el proceso de aplicación de este protocolo es indispensable utilizar los siguientes elementos de protección personal:

- Bata antifluido de laboratorio.
- Pantalón largo.
- Calzado cerrado con suela antideslizante,

- Guantes de nitrilo.
- Gafas de seguridad.

7.2. MATERIALES

- 7.2.1. Espátula de acero.
- 7.2.2. Pesa sales.
- 7.2.3. Balones volumétricos de 10, 20 y 50 mL.
- 7.2.4. Micropipetas de 10, 200 y 1000 μ L.
- 7.2.5. Tubo eppendorf de 2 mL.
- 7.2.6. Tubo eppendorf con filtro rojo de 30 Kda.
- 7.2.7. Jeringa plásticas de 15 mL.
- 7.2.8. Filtros de 0,22 μ m.
- 7.2.9. Celda capilar.
- 7.2.10. Celda plástica.
- 7.2.11. Viales de inyección de vidrio para HPLC.
- 7.2.12. Columna Chromolith HighResolution RP-18 endcapped 5 x 4.6 mm

7.3. REACTIVOS

- 7.3.1. Agua tipo I
- 7.3.2. Ácido trans aconítico
- 7.3.3. Buffer pH 5.5
- 7.3.4. Epikuron 145
- 7.3.5. Epikuron 200
- 7.3.6. Colesterol

7.4. EQUIPOS

- 7.4.1. Balanza analítica
- 7.4.2. Medidor de pH
- 7.4.3. Vortex
- 7.4.4. Centrifuga
- 7.4.5. Zetasizer nano ZSP
- 7.4.6. HPLC con detector PDA (Lachrom Elite Merck)

8. DESCRIPCIÓN DEL PROCESO

Por medio del presente procedimiento se evaluarán los siguientes parámetros; tamaño de partícula, índice de polidispersidad, potencial zeta y porcentaje de eficiencia de encapsulación para llevar a cabo la preparación de sistemas liposomales que vehiculicen ácido trans aconítico con una eficiencia de encapsulación superior al 40%, a partir del método de inyección de etanol.

9. PROCEDIMIENTO DE PREPARACIÓN DE LIPOSOMAS

Preparar una solución de ácido trans aconítico (2000 ppm). Seguidamente, preparar 100 μL de fase orgánica, compuesta por 42,4 μL de colesterol, 42,4 μL de Epikuron 200 y 15,2 μL de Epikuron 145. Inyectar esta fase lentamente en 100 μL de fase acuosa (10 mM), la cual contiene TAA. Agitar la muestra durante 1 minuto con un sistema vortex y dejar reposar durante 5 minutos. Posteriormente, inyectar la mezcla en 800 μL de fase acuosa, y llevar a centrifugación en tubos eppendorf de ultrafiltración a 10000 rpm durante 6 minutos. Aforar a 1 mL de volumen el material retenido (liposomas purificados), filtrar y determinar el tamaño de partícula y potencial zeta. Aforar a 1 mL con fase acuosa el material que paso a través del filtro y determinar el porcentaje de eficiencia de encapsulación.

9.1. CARACTERIZACIÓN DE LIPOSOMAS

Para determinar el valor de tamaño de partícula, índice de polidispersidad, potencial zeta y conductividad eléctrica, utilizar el equipo Zetasizer Nano ZSP (Malvern Instruments). Realizar todas estas mediciones a una temperatura de 25 °C y un ángulo específico (173°) Del equipo se obtendrán los datos de diámetro promedio de partícula, el índice de polidispersidad, el potencial zeta y la conductividad eléctrica.

9.2. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO TRANS ACONÍTICO ENCAPSULADO

Condiciones cromatográficas:

- Equipo HPLC con detector PDA (Lachrom Elite Merck)
- Columna: Chromolith HighResolution RP-18 endcapped 5 x 4.6 mm
- Flujo: 0,8 mL/min
- Temperatura: 25 °C
- Fase móvil: Agua pH 2,5 (con HCl): Acetonitrilo (90:10)
- Longitud de onda: 240 nm
- Volumen de inyección: 10 μL
- Tiempo de retención aproximado: 2,5 minutos

Preparación de curva de calibración de ácido trans aconítico:

Pesar 10 mg de estándar de TAA en un balón de 25 mL y adicionar 10 mL de agua tipo I, tapar el balón y agitar manualmente por 5 minutos. Seguidamente, completar con agua tipo I, tapar y agitar manualmente. (**Solución stock**).

Posteriormente, rotular 5 balones volumétricos de 10 mL como 5, 30, 75 y 100 ppm, adicionar alícuotas de 0.13, 0.75, 1.88 y 2.5 mL de la solución stock a cada balón respectivamente, completar a volumen con agua tipo I, tapar y agitar manualmente por 5 minutos. Cada una de las soluciones preparadas se filtran mediante una jeringa con filtro de 0,22 μm y se llevó a un vial de inyección. (**Soluciones estándar de curva de calibración**).

Preparación de las muestras de ácido trans aconítico no encapsulado:

Tomar cada una de las alícuotas obtenidas durante el proceso de ultrafiltración/centrifugación en el procedimiento de preparación de liposomas y se llevó a 1 mL con el buffer utilizado durante la preparación de los sistemas liposomales. Cada una de las muestras obtenidas se filtró de la misma manera que se realizó con las soluciones estándar y se llevó a un vial de inyección. **(Soluciones muestra de TAA no encapsulado).**

Al realizar la inyección de las soluciones estándar y las soluciones muestra de TAA, se procesan los datos en el equipo HPLC-PDA y se calcula el porcentaje de TAA.