



Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Xochimilco

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento de Sistemas Biológicos

Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

Proyecto de Servicio Social

“Aplicación de un sistema de nanopartículas lipídicas sólidas para mejorar la penetración de la cafeína en la piel en una crema cosmética”

Línea de investigación

Diseño y evaluación de formulaciones y servicios farmacéuticos mediante un sistema de aseguramiento de la calidad

Laboratorios N-112 Excipientes y N-102 Farmacocinética y Farmacodinamia

Fecha de inicio: 08/Septiembre/2023

Fecha de término: 08/Marzo/2024

Alumna: Yessica Abigail Galicia Franco

Matrícula: 2192033839

Asesoras

M. en C. Leticia Ortega Almanza | No. Económico: 35538

Dra. Georgina Alarcón Ángeles | No. Económico: 34432

Índice

Introducción	3
Objetivos	4
Marco teórico	5
Capítulo 1 Caracterización fisicoquímica de las materias primas.....	12
Capítulo 2 Aplicación de un diseño experimental factorial 2 ² para la optimización de formulaciones	16
Capítulo 3 Caracterización fisicoquímica de las Nanopartículas Lipídicas Sólidas cargadas con cafeína (NLS-Caf)	32
Capítulo 4 Cuantificación electroquímica de cafeína libre y encapsulada en Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS-Caf) mediante Voltamperometría Diferencial de Pulso	43
Capítulo 5 Evaluación fisicoquímica de una formulación semisólida con Nanopartículas Lipídicas Sólidas cargadas con cafeína (NLS-Caf).....	57
Conclusión	74
Referencias	75
Anexos.....	82

Introducción

Las estrías son afecciones de la piel muy comunes y asintomáticas como consecuencia de lesiones del tejido conectivo dérmico que se observa con frecuencia en mujeres hasta con un 88% de incidencia (Ayala, 2000). Aparecen en muslos, glúteos, mamas y espalda. Existen distintos métodos para su tratamiento, en los que participan diversos agentes terapéuticos tópicos, tecnologías no quirúrgicas y mínimamente invasivas (Lokhande & Mysore, 2019). Por lo que, existe una creciente demanda de tratamiento de las estrías (Shen, *et al.*, 2022).

La cafeína es un alcaloide hidrofílico capaz de atravesar membranas biológicas (Ialongo, *et al.*, 2023), algunos estudios han demostrado que los productos a base de cafeína mejoran el aspecto de la piel, se le atribuyen numerosas propiedades moleculares beneficiosas implicadas en dermatología, por lo que es un compuesto prometedor para el tratamiento de afecciones de la piel (Abd, *et al.*, 2021).

Las nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) son sistemas portadores coloidales compuestos por un lípido de alto punto de fusión como un núcleo sólido recubierto por tensioactivos. Muestran muchas ventajas, como la viabilidad de la incorporación de fármacos lipofílicos e hidrofílicos, estabilidad física mejorada, bajo costo, facilidad de fabricación y escalamiento (Puglia, *et al.*, 2016).

La cafeína puede cuantificarse por técnicas analíticas comunes como espectrofotometría, Cromatografía Líquida de Alta Resolución o retrovaloración yodométrica, sin embargo, las técnicas electroquímicas son una alternativa viable. La voltamperometría mide la corriente producida por un proceso electroquímico alterando la ventana de potencial (Wale, 2023). La voltametría de pulso diferencial (DPV) combina aspectos de cronoamperometría y voltametría de barrido lineal, exhibiendo una alta selectividad y sensibilidad (Crespi, 2020).

En el presente proyecto, se describe el desarrollo y fabricación de Nanopartículas Lipídicas Sólidas por homogeneización en caliente, posteriormente mediante un diseño de experimentos se optimizan las formulaciones y se evalúan fisicoquímicamente las NLS de cafeína con determinaciones como pH, tamaño de partícula, humectabilidad y se realiza la cuantificación de cafeína encapsulada y libre por electroquímica, finalmente las NLS de cafeína se adicionan en una crema base y se realizan las determinaciones fisicoquímicas correspondientes.

Objetivos

General:

Elaborar nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) cargadas con cafeína para mejorar la absorción en la piel.

Específicos:

- Realizar estudios de pre-formulación de la cafeína y excipientes.
- Desarrollar diferentes métodos para preparar las nanopartículas lipídicas sólidas utilizando un diseño de experimentos 2².
- Caracterizar fisicoquímicamente las nanopartículas lipídicas obtenidas mediante el tamaño de partícula, la penetración del fármaco en la piel, el porcentaje de encapsulación y la morfología de la superficie de las NLS.
- Agregar las nanopartículas lipídicas sólidas de cafeína a una formulación de una crema cosmética.
- Realizar las pruebas farmacopeicas para evaluar las NLS incorporadas en la crema base.

Marco teórico

Estrías

Las estrías de distensión (SD), comúnmente conocidas como estrías, son cicatrices lineales visibles que se desarrollan en áreas de daño dérmico como resultado del estiramiento excesivo de la piel (Lokhande & Mysore, 2019). Estas lesiones atróficas lineales o en bandas se presentan en áreas de grandes pliegues cutáneos, en región periaxilar, región mamaria, región periumbilical, fosas ilíacas, región lumbar, cara interna o superior del muslo y región poplíteas. Se producen como consecuencia de una rotura y pérdida parcial de fibras de colágeno y elastina en la región afectada, dando lugar a una disminución de la cohesión cutánea y cediendo dicha área a las fuerzas de tensión de las masas musculares que soporta la piel (Ayala, 2000). Generalmente aparecen durante la pubertad, el embarazo y en caso de cambios rápidos de peso (pérdida o ganancia) (Verdelli, *et al.*, 2023).

Según su apariencia, las estrías podrían clasificarse en estrías rubrae (rojas, SR) y estrías albas (blancas, SA). La manifestación inicial de SD se caracteriza por marcas lineales rosadas o moradas ligeramente elevadas (SR). Después de meses o años, la SR se desvanece gradualmente hasta convertirse en cicatrices atróficas (SA) hipopigmentadas (Shen, *et al.*, 2022).

Esta afección cutánea es común, cuyas lesiones pueden ser asintomáticas o acompañarse de leve prurito y dolor (Shen, *et al.*, 2022), sin embargo, desde el punto de vista estético es un gran motivo de preocupación y angustia psicológica, fundamentalmente en mujeres, ya que es el sexo más afectado hasta con un 88% de incidencia (Ayala, 2000). Por lo tanto, existe una creciente demanda de tratamiento de las estrías (Shen, *et al.*, 2022).

Cafeína

La cafeína (1,3,7-trimetilxantina) es un alcaloide puro que se encuentra naturalmente en los granos de café, las hojas de té, las bayas de guaraná y los granos de cacao, entre otros (Ialongo, *et al.*, 2023). Tiene la fórmula molecular ($C_8H_{10}N_4O_2$), peso molecular de 194.19 g/mol, es un polvo blanco, inodoro o agujas blancas brillantes, su punto de ebullición es de 178°C y el de fusión de 236.2°C, es un compuesto similar a un fármaco, ya que cumple con la regla de cinco, presenta carácter hidrofílico y puede atravesar membranas biológicas (Ialongo, *et al.*, 2023), su pH es de 6.9 y es fácilmente soluble en cloroformo, ligeramente soluble en agua; poco soluble en alcohol y en éter dietílico (NCBI, 2023).

Tiene varias funciones farmacológicas y es ampliamente utilizada como fármaco en diferentes campos terapéuticos (Ialongo, *et al.*, 2023). En dermatología, las implicaciones de la cafeína son de gran alcance, sin embargo, la administración tópica de cafeína se ve comprometida por su hidrofiliidad, que dificulta su penetración a través del estrato córneo (Puglia, *et al.*, 2016). No obstante, se ha demostrado que es activa cuando se administra tópicamente con vehículos vesiculares, debido a su efecto lipolítico sobre el tejido graso para disminuir el tamaño de los adipocitos (Abd, *et al.*, 2021), por lo tanto, tiene un impacto prometedor como tratamiento no invasivo para la *celulitis*.

Nanopartículas Lipídicas Sólidas

Las nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) se diseñaron a principios de la década de 1990 como un sistema alternativo a otros sistemas portadores como liposomas o micropartículas y sus contrapartes poliméricas (Üner y Yener, 2007). Son comúnmente de forma esférica con un diámetro en el rango de 50 a 1000 nm, se componen de una matriz central hidrofóbica sólida recubierta de fosfolípidos (que contiene las colas hidrofóbicas de la sección de fosfolípidos), ver *figura 1*. Los componentes clave de las formulaciones de las NLS incluyen principalmente lípidos sólidos, emulsionantes y fármacos poco solubles, péptidos y proteínas o ácidos nucleicos (Duan, *et al.*, 2020).

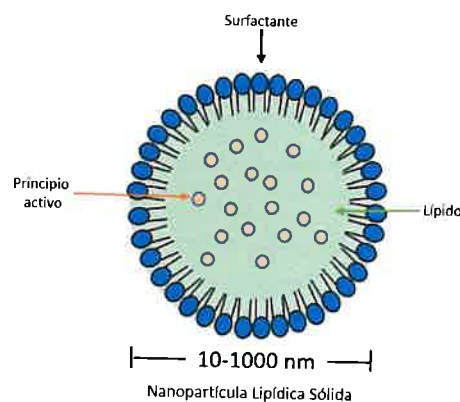


Figura 1. Estructura de las Nanopartículas Lipídicas Sólidas (Hernández, *et al.*, 2022).

Ofrecen distinguidas ventajas como lo es la posibilidad de incorporación de fármacos tanto hidrófobos como lipófilos, la naturaleza biocompatible y biodegradable de los materiales, el bajo potencial de toxicidad, la mejora de la solubilidad del fármaco, una alta capacidad de carga, estabilidad, posibilidad de liberación controlada y modificada de los fármacos, además de la facilidad de producción a gran escala y evita el uso de disolventes orgánicos en el proceso (Tran *et al.*, 2022, Ghasemiyeh, *et al.*, 2018 y Subroto, *et al.*, 2023), además

de una mayor penetración en la aplicación tópica por el tamaño de las NLS, mejora el contacto directo con el estrato córneo de la piel y permite la penetración de agentes encapsulados en la piel (Ialongo, *et al.*, 2023, Duan, *et al.*, 2020 y Malekipour, *et al.*, 2023). Algunas de las desventajas relevantes que presentan estos sistemas es la posible agregación, inestabilidad durante el almacenamiento, dinámica de transiciones polimórficas y baja tasa de incorporación para algunos fármacos o debido a la estructura cristalina del lípido sólido (Viegas, *et al.*, 2023 y Naseri, *et al.*, 2015).

Los lípidos utilizados en la formación de NLS están estabilizados con surfactante y, por lo tanto, son sólidos a temperatura ambiente y fisiológica (Khairnar, *et al.*, 2022). El ácido esteárico se sabe que es biodegradable, no tóxico y reconocido como seguro y se usa ampliamente en la industria farmacéutica y cosmética (Surendra, *et al.*, 2020). Los ácidos grasos naturales constituidos por cadenas de C14 a C24, como el monoestearato de glicerilo (C21), se prefieren por su mejor tolerancia en membranas biológicas, además de que al poseer cadenas largas de ácidos grasos mejoran la estabilidad a largo plazo y aumentan la cantidad de fármaco que pueden encapsular, de tal manera que no permitan la expulsión del fármaco por las transiciones polimórficas (Montero, 2019). Los polímeros iónicos y no iónicos, los tensioactivos y las sales orgánicas se utilizan como emulsionantes (Khairnar, *et al.*, 2022). Algunos de los tensioactivos utilizados habitualmente en la formulación de las NLS son Polaxomer 188 o 407, Tween 80 o 20, Span 20, alcohol polivinílico (PVA) y lecitina (Garzón, *et al.*, 2019). Se ha demostrado que al emplear Tween 80 en altas concentraciones, condujo a la formación de tamaños de partícula pequeños, además de que podría actuar como agente estabilizador durante la formación de nanopartículas y reducir la energía de la superficie, lo que conduce a la inhibición del crecimiento de cristales (Sukmawati, *et al.*, 2018). Por otra parte, se ha informado que los tensioactivos grandes y no iónicos son menos tóxicos que los tensioactivos iónicos y de cadena única (Musielak, *et al.*, 2022).

Se requiere la caracterización física y química después de la preparación de NLS, debido al tamaño de las partículas, la complejidad y la naturaleza dinámica del sistema de entrega (Duan, *et al.*, 2020). Diversos estudios indican que las NLS con tamaños de partículas que oscilan entre ≈ 170 y 500 nm forman una película sobre la piel y proporcionan un efecto oclusivo, lo que puede aumentar la tasa de penetración de los agentes activos a través del estrato córneo. Las partículas esféricas tienen el volumen de partículas más bajo, el área

de superficie específica y las vías de difusión más altas, lo que ofrece una liberación controlada de las sustancias activas encapsuladas (Musielak, *et al.*, 2022).

Formas farmacéuticas semisólidas

Como alternativa a la administración oral e intravenosa, los sistemas tópicos de administración de fármacos pueden transportar las moléculas activas del fármaco a través de la piel hasta el objetivo terapéutico y por vía transdérmica hasta el sistema circulatorio (Jin, *et al.*, 2022). Las formas farmacéuticas semisólidas son formas tópicas propuestas para aplicación externa sobre la piel con efecto local o sistémico. Consisten en una o más combinaciones de principios activos solubilizados o dispersos uniformemente en un medio adecuado para obtener una formulación estable (Gururaj, *et al.*, 2023). Típicamente, los productos tópicos más comunes incluyen cremas, ungüentos, geles, lociones y emulsiones.

Los productos tópicos semisólidos permiten la administración de principios activos en un enfoque menos invasivo que la vía intravenosa y evitan el efecto de primer paso encontrado por los productos orales, donde las moléculas del fármaco se degradan a sus metabolitos inactivos (Jin, *et al.*, 2022).

Para lograr un efecto terapéutico deseado, estas formulaciones tópicas deben mejorar la permeación de varias moléculas del fármaco a través de la piel y mantener la velocidad y el grado de penetración adecuadamente en las capas de la piel. La administración de medicamentos por vía tópica depende de varias propiedades, como las características fisicoquímicas del medicamento, la interacción entre los excipientes en la formulación y la piel, la interacción del medicamento con la piel, la interacción de los excipientes con el medicamento y una interacción general de estos tres aspectos, es decir, piel, medicamento y excipientes (Jin, *et al.*, 2022).

Además, la penetración de fármacos también depende del estado de la piel, ya sea enferma o normal, ya que, en una condición patológica varía la biodisponibilidad del fármaco en las capas cutáneas. El estrato córneo (SC), la capa más externa de la epidermis está compuesto por un 85% de corneocitos llenos de queratina y es una barrera cutánea hidrofóbica que impide la difusión pasiva de moléculas de gran tamaño (>500 Dalton). Actualmente, en la mayoría de los productos tópicos semisólidos disponibles comercialmente, sus sitios diana son la piel o el tejido subcutáneo, y solo se puede estimar una cantidad limitada del fármaco en la circulación sistémica (Jin, *et al.*, 2022).

Cremas

La crema es una preparación líquida o semisólida que contiene el o los fármacos y aditivos necesarios para obtener una emulsión, generalmente aceite en agua o agua en aceite, que se estabiliza termodinámicamente mediante la adición de un emulsionante adecuado (FEUM, 2013 y Gururaj, *et al.*, 2023), comúnmente con un contenido de agua superior al 20 % (FEUM, 2013). Las cremas de tipo agua en aceite tienen buena capacidad de extensión y son menos grasosas, mientras que las de tipo aceite en agua se aplican fácilmente sobre la piel y se eliminan fácilmente con agua (Gururaj, *et al.*, 2023).

Las cremas pueden contener NLS para una mejor penetración de fármacos tópicos, la oclusión cutánea es fundamental. Esta necesidad se puede lograr eficazmente mediante la consolidación de grandes cantidades de grasas y aceites, en particular parafina líquida y semisólida. Sin embargo, esta formulación presenta la limitación de sus propiedades cosméticas deficientes. La nanodispersión proporciona una buena oclusividad con un tamaño medio de partícula de 200 nm, incorporando las nanopartículas en la fase acuosa. Por lo tanto, la fase oleosa, donde se dispersaron las gotas de agua, sirvió como lubricante para las nanopartículas, evitando así una sensación áspera en la aplicación (Gururaj, *et al.*, 2023).

Diseño de experimentos

El diseño de experimentos (DOE) por sus siglas en inglés se define como una estrategia de modelado estadístico que se puede utilizar para planificar y analizar experimentos. Permite el análisis simultáneo de múltiples variables (factores). Esta estrategia es beneficiosa para determinar cómo los diferentes elementos de un sistema experimental se impactan entre sí. Este proceso se ha utilizado en el desarrollo de fármacos, la optimización de medios, los procesos de fabricación y la biorremediación, entre otros tipos de experimentos (Moon, *et al.*, 2024). Incluye una serie de herramientas de estadística aplicada que se utilizan para clasificar y cuantificar sistemáticamente las relaciones de causa y efecto entre las variables y los resultados del proceso o fenómeno estudiado, lo que puede resultar (si ese es el objetivo) en la búsqueda de los entornos y condiciones bajo los cuales el proceso se optimiza (Jankovic, *et al.*, 2021).

Los pasos de un DOE incluyen definir los objetivos y las variables de respuesta, los factores determinantes, los niveles, el tipo de diseño experimental y la ejecución del experimento.

Las variables en el DOE, como el número de factores, los niveles y la lógica para seleccionarlos, suelen depender del tipo de investigación (cribado, caracterización u optimización), el tipo de proceso y los recursos disponibles (Jankovic, *et al.*, 2021). Durante un experimento DOE, los factores biológicos y físicos de interés se discretizan en un conjunto de valores denominados niveles. Estos niveles se prueban en diferentes combinaciones y se crea un modelo que predice la respuesta del sistema basándose en los datos de entrada y los datos recopilados a través de muchas iteraciones de experimentación. El DOE se puede utilizar de diferentes maneras para explorar el efecto de los factores en un sistema. En primer lugar, puede ayudar a definir el rango de niveles en los que se debe probar cada factor, lo que da como resultado el "espacio de diseño" total del sistema que luego se utiliza para la optimización. También se puede utilizar para probar una gran cantidad de factores y determinar una cantidad menor que tenga el mayor impacto en el sistema. Finalmente, el DOE se puede utilizar para optimizar un sistema observando un subconjunto más pequeño de factores que se han considerado los más importantes (Moon, *et al.*, 2024).

Electroquímica: Voltamperometría Diferencial de Pulso

Entre la variedad de técnicas analíticas las técnicas electroquímicas ofrecen ventajas prácticas que incluyen la simplicidad de operación, eficientes, rápidas, requieren mediciones sencillas, son de bajo costo, su instrumentación es simplificada, idoneidad para la detección en tiempo real, mayor sensibilidad a los efectos de la matriz en comparación con métodos de separación o espectrales y amplio rango de concentración lineal (Švorc, 2013, Lofti, *et al.*, 2021 y Tasić, *et al.*, 2022). Debido a su mayor sensibilidad y bajos límites de detección, los métodos electroanalíticos basados en procesos de extracción son útiles en el análisis de trazas (Švorc, 2013). Los sensores electroquímicos basados en materiales de carbono son rentables, tienen un amplio rango de potencial y poseen relativa inercia electroquímica y actividad electrocatalítica en diversas reacciones redox. Además, este tipo de sensores podrían modificarse para mejorar su rendimiento analítico (Tasić, *et al.*, 2022). Además, es posible determinar simultáneamente fármacos u otras moléculas electroactivas con un sensor electroquímico (Lofti, *et al.*, 2021). El detector electroquímico mediante el control del potencial es razonablemente selectivo, además empleando electrodos modificados mejora la sensibilidad del detector, por ejemplo, se ha reportado que al utilizar modificaciones sobre el electrodo puede convertirlo en más selectivo (Weber, 1988).

La electroquímica ofrece una amplia gama de métodos electroanalíticos, como la voltametría sobre electrodos de carbón y de carbono modificado, los métodos potenciométricos, amperométricos y los sensores piezoeléctricos de polímeros moleculares (Švorc, 2013). Un experimento electroquímico incluye un electrodo de trabajo hecho de un material conductor sólido (Pt, Au o C), un electrodo de referencia (Ag/AgCl) y un contraelectrodo (Pt), los cuales están sumergidos en una solución que contiene un electrolito soporte para garantizar la conductividad de la solución (Wale, 2023).

La voltamperometría es una técnica amperométrica porque mide la corriente producida por un proceso electroquímico alterando la ventana de potencial, para lo cual hay diferentes formas de hacerlo, en consecuencia, existe una variedad de procedimientos voltamétricos: voltametría cíclica (CV), voltametría de barrido lineal (LSV), voltametría de pulso diferencial (DPV) y la voltametría de onda cuadrada (SWV) son las más comunes y utilizadas. Las dos formas de métodos voltamétricos de pulsos son DPV y SWV. A diferencia de CV, se pueden utilizar para estudiar las propiedades redox de cantidades extremadamente pequeñas de compuestos electroactivos por razones tales como que el efecto de la corriente de carga se puede minimizar, lo que resulta en una mayor sensibilidad; y que solo se extrae la corriente faradaica, lo que permite que las reacciones de los electrodos puedan analizarse con mayor precisión (Wale, 2023).

La voltametría de pulso diferencial (DPV) combina aspectos de cronoamperometría y voltametría de barrido lineal, exhibe una alta selectividad y sensibilidad. Se superponen pequeños pulsos de voltaje de amplitud constante (20-50 mV) de 3 a 5 veces por segundo sobre una rampa de voltaje lineal. La corriente se muestrea inmediatamente antes (i_A) de un pulso y se resta de la corriente al final del pulso (i_B), luego la diferencia $i_B - i_A$ se expresa en términos de potencial. La oxidación de un compuesto produce un pico agudo en lugar del pico amplio o meseta de la voltamperometría de barrido lineal, lo que da como resultado una resolución más alta (Crespi, 2020).

Capítulo 1 Caracterización fisicoquímica de las materias primas

En este capítulo se presenta la caracterización fisicoquímica de las materias primas empleadas en el desarrollo de las formulaciones propuestas. El análisis de sus propiedades permite evaluar su identidad y calidad, así como verificar el cumplimiento de las especificaciones establecidas en las farmacopeas y demás criterios de calidad aplicables.

Asimismo, la caracterización de las materias primas permite identificar posibles interacciones entre los excipientes que pudieran afectar la estabilidad, compatibilidad o el desempeño de las formulaciones durante su desarrollo. Con base en los resultados obtenidos, se determina la idoneidad de las materias primas para su incorporación en las formulaciones planteadas.

1. Material y equipos

Material	Equipo	Reactivos
Vasos de precipitado de 50 mL	Balanza analítica Shimadzu AUX120 Viscosímetro Brookfield digital DV-II Potenciómetro Conductronic Aparato de Fisher-Johns Balanza analítica Explorer OHAUS E11140	Cafeína anhidra (BASF; Lote 99590) Ácido esteárico (Droguería Cosmopolita) Tween 80 (Droguería Cosmopolita; Lote 1673) Monoestearato de glicerilo (CEDROSA; Lote 18410) Metanol Agua desmineralizada

Tabla 1. Material y equipos

2. Formulaciones

En la siguiente tabla cuali-cuantitativa, se muestran las formulaciones empleadas:

Formulación 1	Formulación 2	Cantidad (%)	Función
Cafeína	Cafeína	5	Principio activo
Ácido esteárico	Monoestearato de glicerilo	10	Lípido
Tween 80	Tween 80	5	Surfactante
Etanol	Etanol	-	Solvente orgánico
Agua desmineralizada	Agua desmineralizada	cbp	Disolvente

Tabla 2. Formulaciones cuali-cuanti de NLS-Caf

De las formulaciones mostradas en la *tabla 2* se analizaron los excipientes de cada una, siguiendo la metodología descrita a continuación.

3. Metodología

3.1. Aspecto y solubilidad

- 3.1.1. Realizar la observación física de las materias primas para describir su aspecto.
- 3.1.2. Disolver 5 g en 20 mL del solvente indicado en cada monografía de las materias primas, para comprobar la solubilidad de las materias primas.

3.2. pH

- 3.2.1. Efectuar la determinación a $25 \pm 2^\circ\text{C}$.
- 3.2.2. Lavar el electrodo y recipiente varias veces con agua, dejar que escurra el agua y secar con papel absorbente.
- 3.2.3. Enjuagar el electrodo y el recipiente con la solución de prueba (muestra).
- 3.2.4. Llenar el recipiente con esta solución y efectuar la determinación de pH.
- 3.2.5. Realizar la determinación por triplicado.

3.3. Punto de fusión

- 3.3.1 Colocar 1 g de muestra sobre un cubreobjetos redondo y taparlo con otro.
- 3.3.2 Dejar los cubreobjetos sobre la platina del equipo, encender el equipo y desplazar la lupa sobre la platina.
- 3.3.3 Girar la perilla del reóstato hacia la derecha, considerando que entre más adelante se gire, la temperatura incrementará con mayor rapidez.
- 3.3.4 Observar la platina y el termómetro del equipo a la vez, en el momento en que el sólido se funde, anotar la temperatura de inicio y terminación del proceso.
- 3.3.5 Apagar el equipo, esperar a que se enfríe, desconectar, retirar la muestra y guardar.

3.4. Metales pesados

3.4.1. Preparación de referencia

- Tomar una alícuota de 2 mL de solución estándar de Plomo y diluir en 25 mL de agua en un tubo Nessler de 50 mL.
- Ajustar el pH entre 3.0 y 4.0 con ácido acético 1N o hidróxido de sodio 6 N
- Diluir con agua a 40 mL para leer en potenciómetro.

3.4.2. Preparación de muestra

- Mezclar 2.0 g de la muestra con 5.0 mL de solución de ácido clorhídrico 0.1N y 20 mL de agua.
- Calentar moderadamente en baño de agua hasta disolución total y enfriar a temperatura ambiente.
- Colocar 25 mL de la solución preparada en un tubo Nessler de 50 mL.
- Ajustar pH entre 3.0 y 4.0 con ácido acético 1 N o hidróxido de sodio 6 N, diluir con agua a 40 mL para lectura en potenciómetro.

3.4.3. Preparación de control

- Colocar 25 mL de la solución preparada de la muestra en un tubo Nessler de 50 mL y agregar 2 mL de solución estándar de Plomo.
- Ajustar pH entre 3.0 y 4.0 con ácido acético 1 N o hidróxido de sodio 6 N, diluir con agua a 40 mL para la lectura en el potenciómetro.

3.4.4. Procedimiento

- Agregar 2 mL de SA de acetato de amonio pH 3.5, adicionar 10 mL de una solución recién preparada de ácido sulfhídrico a cada solución preparada, diluir a 50 mL de agua, dejar reposar durante 5 minutos.
- Hacer la comparación observando los tubos de arriba hacia abajo sobre un fondo blanco.
- Nota: el color de la preparación de la muestra es igual o menos oscuro que el de la preparación de referencia y la intensidad del color de la preparación de control es igual o mayor que el color de la preparación de referencia.

4. Resultados

4.1. Aspecto, solubilidad, pH y punto de fusión

Especificaciones / Materia prima	Cafeína anhidra	Ácido esteárico	Monoestearato de glicerilo	Polisorbato 80 (Tween 80)
	Polvo blanco cristalino agujas brillantes generalmente aglomeradas; la forma hidratada es eflorescente al	Polvo duro, blanco o masas blancas o amarillo claro, lustrosas cristalinas.	Es una masa dura y cerosa, polvo o escamas untosas, de color blanco o casi	Líquido aceitoso de color amarillo a ámbar con un leve olor característico. Muy soluble en agua, produce

	aire. Fácilmente soluble en cloroformo, ligeramente en agua poco en alcohol y en éter dietílico. Temperatura de fusión: entre 235 y 237.5°C	Fácilmente soluble en cloroformo y en éter dietílico, soluble en alcohol, casi insoluble en agua.	blanco. Insoluble en agua, soluble en etanol al 96% a 60°C. Su punto de fusión es de 54°C a 66 °C	una solución inodora y prácticamente incolora; soluble en alcohol y en acetato de etilo, casi insoluble en aceite mineral.
Resultados				
Aspecto	Polvo blanco fino.	Escamas gruesas, blancas y brillantes.	Polvo amarillento grumoso.	Líquido espeso amarillento.
Solubilidad	Muy soluble en ácido clorhídrico y cloroformo, en agua parcialmente soluble y poco soluble en etanol.	Parcialmente soluble en etanol y cloroformo, insoluble en agua.	Soluble en etanol e insoluble en agua.	Muy soluble en etanol, agua y acetato de etilo.
Punto de fusión	236°C-237.5°C	50°C	60°C-65°C	-
pH	5.5-5.96	3.37-3.8	7.18-7.30	4.36
Resultado	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple

Tabla 3. Resultados de análisis fisicoquímicos

Como se muestra en la *tabla 3*, la cafeína anhidra y los excipientes que se emplearán en el desarrollo de las formulaciones, cumplen con las especificaciones farmacopeicas. Por lo tanto, son útiles para continuar con la fabricación.

4.2. MGA 0561. Metales pesados en Cafeína

El color de la muestra de cafeína se notó igual al de la referencia (solución de referencia de nitrato de plomo) y el color de la solución de control (solución de muestra en estándar de plomo) fue semejante al de referencia. Por lo tanto, para esta prueba colorimétrica la cafeína no sobrepasa el contenido de metales pesados permitidos (10 ppm) como lo señala la FEUM.

Capítulo 2 Aplicación de un diseño experimental factorial 2² para la optimización de formulaciones

En este capítulo se aborda el desarrollo y la optimización de las formulaciones propuestas mediante un diseño experimental factorial 2². Con base en la caracterización de las materias primas presentadas en el capítulo anterior, permite evaluar aspectos relevantes para el proceso de fabricación, así como las posibles interacciones entre los excipientes y los factores críticos asociados tanto a la formulación como al proceso.

A partir de esta información, se definen los factores de estudio, así como sus respectivos niveles y las variables de respuesta que permitirán evaluar el desempeño de las formulaciones obtenidas. El diseño factorial 2² permite estudiar de manera sistemática el efecto de los factores seleccionados, así como su posible interacción sobre las respuestas de interés, reduciendo la necesidad de realizar experimentaciones basadas únicamente en el ensayo y error.

El diseño experimental y el análisis estadístico de los resultados se realizan mediante el software Statgraphics Centurion, a partir del cual se determina la influencia de los factores estudiados sobre las variables de respuesta y se identifican las condiciones que permitan establecer una formulación óptima.

1. Material y equipos

Material	Equipo	Reactivos
Vasos de precipitado de 50 mL Vasos de precipitado de 25 mL Varilla de vidrio Matraces aforados de 50 mL	Balanza analítica Shimadzu AUX120 Caframo Ultra Turrax IKA T-25 D Analizador de tamaño de partícula Horiba LA-950V2	Cafeína anhidra (BASF; Lote 99590) Ácido esteárico (Droguería Cosmopolita) Tween 80 (Droguería Cosmopolita; Lote 1673) Monoestearato de glicerilo (CEDROSA; Lote 18410) Metanol Agua desmineralizada

Tabla 4. Material y equipos

2. Metodología

2.1. Preparación de las Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS)

2.1.1. Preparación de la fase acuosa.

Disolver 2.5 g de Cafeína en 30 mL de agua desmineralizada previamente calentada a 70 °C. Mantener agitación mecánica mediante parrilla de agitación hasta lograr la completa disolución.

2.1.2. Preparación de la fase orgánica.

Disolver 5 g de ácido esteárico en 10 mL de etanol a 70°C, manteniendo agitación mecánica hasta su completa disolución.

2.1.3. Formación de la dispersión.

Agregar la fase orgánica a la fase acuosa, manteniendo ambas fases a 70°C. Homogeneizar a 1000 rpm durante 20 minutos utilizando un homogeneizador tipo Caframo o Ultra-Turrax IKA.

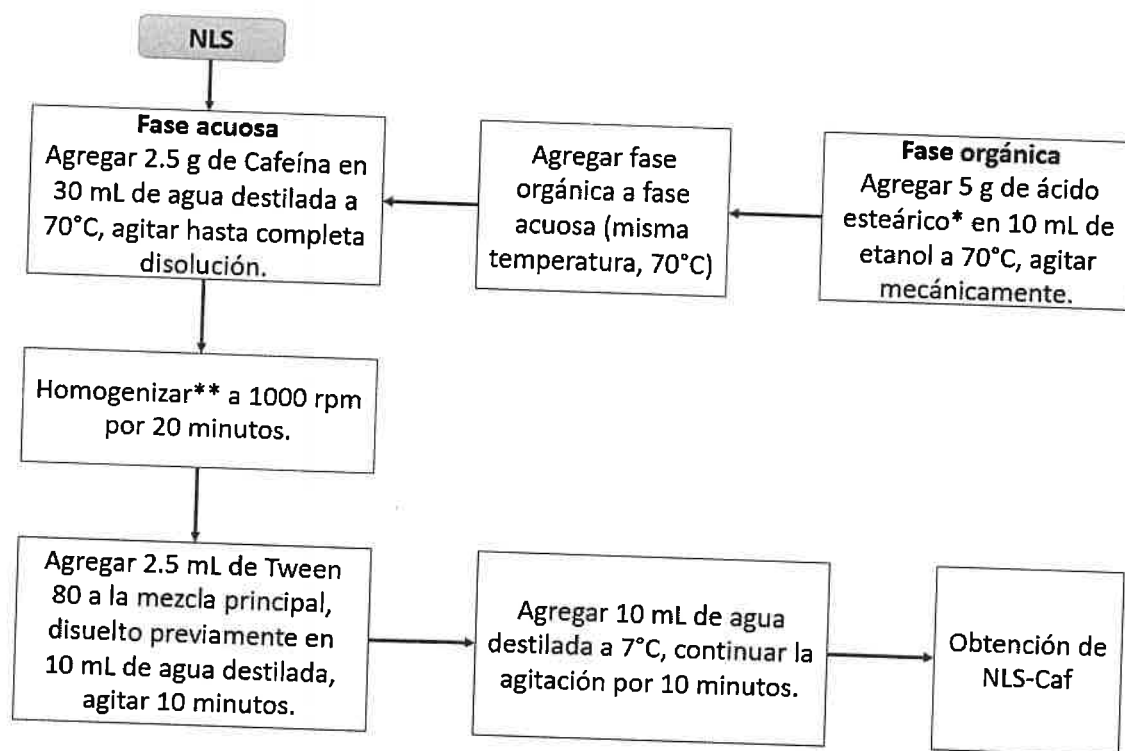
2.1.4. Adición del surfactante.

Incorporar 2.5 mL de Tween 80 previamente disueltos en 10 mL de agua desmineralizada. Continuar con la agitación durante 10 minutos adicionales.

2.1.5. Enfriamiento de la dispersión.

Añadir 10 mL de agua desmineralizada a 7°C y mantener la agitación durante 10 minutos más, con el fin de promover la solidificación de las partículas formadas.

En la *figura 2* se muestra de manera esquemática las etapas involucradas en la preparación del sistema.



*En la formulación 2, se emplea monoestearato de glicerilo.

**En el diseño de experimentos se usa Caframo, en optimización Ultra-Turrax IKA.

Figura 2. Elaboración de Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) por homogeneización en caliente.

2.2. Diseño de experimentos

El modelo estadístico para emplear es un diseño factorial 2^2 , en donde se analizan dos factores y dos niveles, además de una variable de respuesta. En la *tabla 5*, se muestran los factores y niveles empleados, para esta investigación los factores considerados fueron las concentraciones de los excipientes encargados de formar los sistemas de encapsulamiento, la concentración del lípido (Tween 80) representado por el factor A, mientras que al factor B, representa la concentración del surfactante (Ácido esteárico o Monoestearato de glicerilo); los niveles que se tomaron en cuenta para el factor A, fue la concentración al 12 % (6 g), como nivel alto 14 % (7 g) y para el factor B, de nivel bajo 6 % (3 mL) y nivel alto 8 % (4 mL). La variable de respuesta que se eligió fue el tamaño de partícula, debido a que el tamaño de las nanopartículas está en función de la concentración de estos factores principales, que permitirán la formación de las micelas y determinarán el tamaño de estas; la finalidad de la optimización mediante los tratamientos de los factores es obtener tamaños de partícula en el rango de nanopartículas.

	Nivel bajo (-)		Nivel alto (+)	
Factor A: Concentración del lípido	12%	6 g	14 %	7 g
Factor B: Concentración del surfactante	6 %	3 mL	8 %	4 mL
Variable de respuesta:	Tamaño de partícula (nm)			

Tabla 5. Factores y niveles del diseño de experimentos

A partir de los factores y los niveles seleccionados, se conforma la matriz de diseño, en donde se designan los tratamientos que el diseño tendrá. El nivel bajo se representa como (-), mientras que el nivel alto como (+), en la *tabla 6*, se colocaron las conjugaciones que representan a cada tratamiento. Cada tratamiento se realiza por triplicado, es decir el tratamiento principal y dos réplicas, representadas con la siguiente nomenclatura: (1), (1)₁ y (1)₂. La matriz se elabora de manera consecutiva, para la confiabilidad del diseño se realiza una aleatorización.

Formulaciones		
Tratamiento	A	B
(1)	-	-
a	+	-
b	-	+
ab	+	+

Tabla 6. Matriz de diseño de las formulaciones.

La matriz aleatorizada para este diseño se muestra en la *tabla 7* para las 2 formulaciones; de acuerdo con esta matriz, es el orden en que se fabricarán las Nanopartículas Lipídicas Sólidas de Cafeína (NLS-Caf), considerando las concentraciones de los factores A y B, en sus niveles altos y bajos que indica cada tratamiento.

Formulación 1					Formulación 2				
Tratamiento	A [Ácido esteárico]		B [Tween 80]		Tratamiento	A [Monoestearato de glicerilo]		B [Tween 80]	
(a) ₂	+	14%	-	6%	b	-	12%	+	8%
(ab) ₁	+	14%	+	8%	(a) ₁	+	14%	-	6%
b	-	12%	+	8%	(ab) ₂	+	14%	+	8%
(b) ₂	-	12%	+	8%	(1) ₂	-	12%	-	6%
ab	+	14%	+	8%	a	+	14%	-	6%
1	-	12%	+	8%	(ab) ₁	+	14%	+	8%

a	+	14%	-	6%	(1) ₁	-	12%	-	6%
(b) ₁	-	12%	-	6%	(b) ₂	-	12%	+	8%
(1) ₂	-	12%	-	6%	ab	+	14%	+	8%
(ab) ₂	+	14%	+	8%	1	-	12%	-	6%
(a) ₁	+	14%	-	6%	(a) ₂	+	14%	-	6%
(1) ₁	-	12%	-	6%	(b) ₁	-	12%	+	8%

Tabla 7. Matriz de diseño aleatorizada de las formulaciones 1 y 2

Una vez fabricadas las NLS-Caf siguiendo las matrices de diseño aleatorizadas mostradas en la tabla anterior, se evalúa la variable de respuesta, es decir, el tamaño de partícula, posteriormente los datos se tratan en Statgraphics, un software de modelos estadísticos.

2.2.1. Tamaño de partícula

2.2.1.1. Muestra:

- Preparar una solución al 2 % de las NLS-Caf recién preparadas. Tomar 1 mL de muestra y añadir a un matraz de 50 mL, llevar al aforo con agua destilada.

2.2.1.2. Procedimiento:

- Realizar la lectura del blanco (agua destilada)
- Agitar la muestra preparada, agregarla a la celda y colocar la barra de agitación.
- Realizar la medición en el Particle Size Distribution Analyzer LA-950 V2, Horiba.
- Nota: agregar el blanco o la muestra cuidando que no haya formación de burbujas, ni que la celda se encuentre sucia.

3. Resultados

Al desarrollar el diseño de experimentos, se recopilaban los datos del tamaño de partícula obtenidos, posteriormente se optimizó el modelo y con ello, se reportan los tamaños de partícula finales. El diseño se realizó para las dos formulaciones, los resultados se muestran a continuación.

3.1. Evaluación de formulaciones de NLS-Caf

La matriz de diseño se aplicó de forma aleatorizada para que los datos tuvieran mayor confiabilidad y no fueran predecibles. Los tamaños de partícula obtenidos para los tratamientos de la formulación 1 y 2, se muestran en la *tabla 8*. Se puede observar que en

ambas formulaciones no se obtuvieron nanopartículas, sino que se encuentran en el orden de micropartículas, sin embargo, el reto es optimizar con los resultados el modelo para poder elaborar nanopartículas; entre los datos obtenidos, las micropartículas de menor tamaño fueron las de la formulación 2, no obstante, en la formulación 1, el coeficiente de variación es menor, respecto a la 2.

Formulación 1			Formulación 2		
Tratamiento	Tamaño medio de partícula (μm)	pH	Tratamiento	Tamaño medio de partícula (μm)	pH
(a) ₂	5.39395	6.11	b	24.76907	4.95
(ab) ₁	5.37926	6.18	(a) ₁	26.08623	2.57
b	5.14291	6.04	(ab) ₂	25.48119	2.73
(b) ₂	5.29586	5.98	(1) ₂	27.47301	2.70
ab	4.86767	6.35	a	27.82067	5.45
1	6.29356	6.26	(ab) ₁	25.81555	4.20
a	8.18034	6.66	(1) ₁	25.67289	2.69
(b) ₁	5.88726	6.86	(b) ₂	24.82781	2.62
(1) ₂	6.57286	6.60	ab	15.91082	2.70
(ab) ₂	9.45214	6.66	1	26.80157	2.64
(a) ₁	5.93601	6.64	(a) ₂	25.23331	2.73
(1) ₁	6.57218	6.68	(b) ₁	26.52098	2.74

Tabla 8. Matriz de diseño aleatorizada de las formulaciones 1 y 2

Adicional a la variable de respuesta principal (tamaño de partícula), se consideró el pH que cada tratamiento tuvo, los valores que muestra la formulación 1, se acercan al pH final deseado (6.5-7), mientras que los de la formulación 2 se hallan en un rango ácido (2.7-5.45).

3.2. Matriz de diseño aleatorizada de formulación 1 (Optimización de la formulación)

A partir de los tamaños de partícula obtenidos, se introdujo la matriz que se describe en la tabla 9 al software Statgraphics.

Tratamiento	Concentración de ácido esteárico (A)		Concentración de Tween 80 (B)		Tamaño de partícula (μm)
(a) ₂	+	14%	-	6%	5.393
(ab) ₁	+	14%	+	8%	5.379
b	-	12%	+	8%	5.142

(b) ₂	-	12%	+	8%	10.295
ab	+	14%	+	8%	4.867
1	-	12%	+	8%	6.293
a	+	14%	-	6%	11.180
(b) ₁	-	12%	-	6%	5.887
(1) ₂	-	12%	-	6%	6.572
(ab) ₂	+	14%	+	8%	9.452
(a) ₁	+	14%	-	6%	5.936
(1) ₁	-	12%	-	6%	6.572

Tabla 9. Matriz de diseño aleatorizada de la formulación 1.

3.2.1. Optimización de la respuesta para la formulación 1

Para comenzar el análisis estadístico del tamaño de partícula, es indispensable comenzar por el ANOVA, que se muestra en la *figura 3*, se tienen las fuentes de variación, A: Concentración del lípido (ácido esteárico), B: Concentración del surfactante (tween 80) y la interacción de estos. Cuando el valor de P es menor a 0.05 indica que los factores son significativos; en este caso, las tres fuentes de variación lo son, ya que el valor de P es menor al valor de α 0.05, con un nivel de confianza del 95.0 %, sin embargo, el factor con más relevancia es la interacción AB, puesto que su valor-P es de 0.0003, seguido de B, la concentración de Tween 80 (0.0004) y al final A, la concentración del Ácido esteárico (0.0008), por lo tanto, las tres fuentes de variación son significativas para el tamaño de partícula, además, de que se acerca el 92.2805 % al modelo, superando al 90 % (mínimo aceptable).

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:[Ácido esteárico]	13.4161	1	13.4161	27.42	0.0008
B:[Tween 80]	16.321	1	16.321	33.36	0.0004
AB	18.5042	1	18.5042	37.82	0.0003
Error total	3.91378	8	0.489223		
Total (corr.)	50.6998	11			

Figura 3. ANOVA de la formulación 1.

En la *figura 4* se muestra el diagrama de Pareto, en el que puede observarse que la interacción AB, la concentración del Tween 80 y la concentración del ácido esteárico, superan la línea de significancia, es decir, estos factores tienen un efecto relevante para el tamaño de partícula, por lo tanto, las tres fuentes de variación tienen un impacto en la variable de respuesta, sin embargo, la interacción AB al estar por encima de las otras podría

dar mejores resultados. Además, este gráfico expone visualmente lo que se obtuvo en el ANOVA, con tres factores significantes.

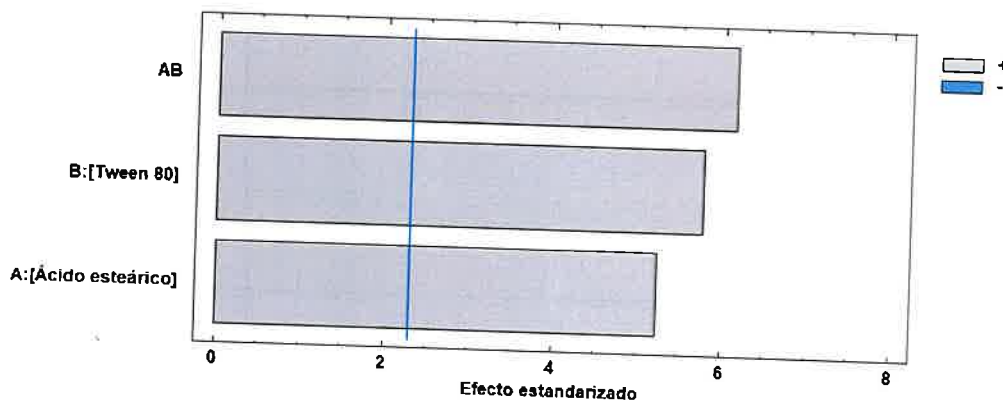


Figura 4. Diagrama de Pareto para el tamaño de partícula de la formulación 1 de NLS-Caf.

Los efectos principales se pueden observar en la *figura 5*, estos efectos indican la relación que existe entre las concentraciones de los excipientes con el tamaño de partícula que se busca, en este caso, se indica que mientras las concentraciones del ácido esteárico y del tween 80 estén en su nivel más bajo (12 y 6 %) respectivamente, se obtendrán partículas de menor tamaño. También es destacable indicar el tamaño que las diagonales presentan, para el caso del ácido esteárico se trata de una pendiente corta y semi inclinada, respecto a la del tween 80 que es alargada e inclinada, lo que significa que tiene mayor efecto la concentración del tween 80 que la del ácido esteárico, así como se mostró en el ANOVA y en el diagrama de Pareto (*Figura 3 y 4*).

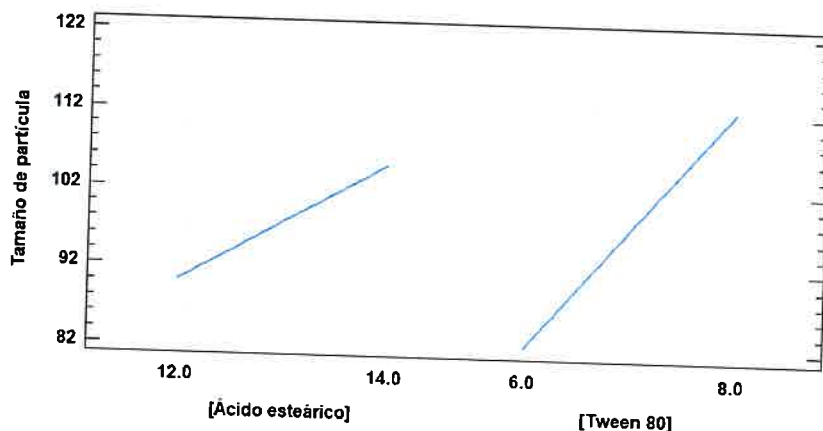


Figura 5. Efectos principales para el Tamaño de partícula para la formulación 1 de las NLS-Caf.

También en la *figura 5* se puede interpretar que si ambos factores se encuentran en su nivel más alto (14 y 8 %) los tamaños de partícula incrementarían, sin embargo, esa variación de los efectos no es la que se busca en este diseño.

El gráfico de interacciones de la *figura 6*, muestra la relación que puede haber entre los factores, representados por líneas rectas, como se observa las líneas no son paralelas, lo que significa que sí existe la interacción entre ambos factores y la interacción que daría tamaños de partícula menores, sería cuando el ácido esteárico y el tween 80 están en sus niveles más bajos (12 y 6 %, respectivamente), descartando el resto de combinaciones, las cuales estarían sugiriendo tamaños de partícula mayores.

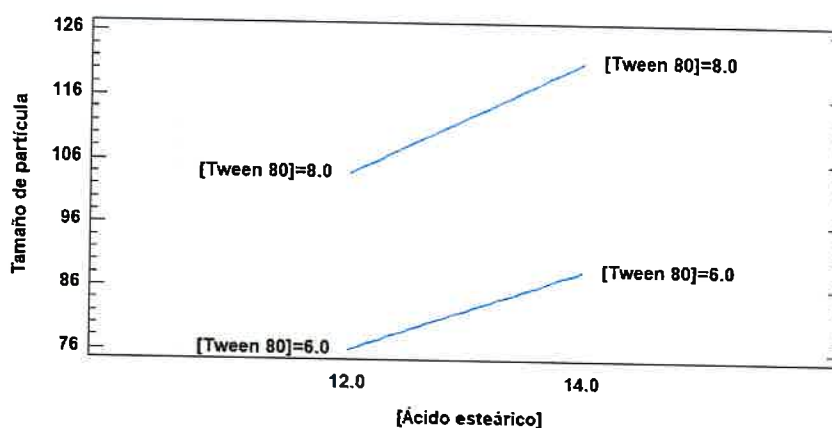


Figura 6. Interacciones de los factores para el tamaño de partícula de la formulación 1 las NLS-Caf.

Por lo tanto, después de haber analizado los gráficos y los resultados dados por Statgraphics Centurion, se muestra en la *tabla 10*, los valores que se sugiere optimicen la formulación 1. El programa arrojó que para alcanzar la optimización de la formulación el ácido esteárico debe estar al 12 %, es decir, en su nivel bajo. También, indica que el Tween 80 se debe encontrar al 6 %, de igual forma en su nivel bajo. Aunque el efecto estadísticamente significativo es la concentración del ácido esteárico en su nivel más alto, la optimización sugirió lo contrario, como se observó en la *figura 4* de efectos principales, se interpreta que, para obtener tamaños menores de partícula, las concentraciones están en su nivel más bajo (tratamiento (1)).

Factor/Nivel	Bajo	Alto	Óptimo
A [Ácido esteárico]	12.0	14.0	12.0 (-)
B [Tween 80]	6.0	8.0	6.0(-)

Tabla 10. Optimización de la formulación 1.

Para corroborar la optimización, se colocó la ecuación de regresión del diseño a continuación, que describe el modelo ajustado a las fuentes de variación (concentraciones

de lípido y surfactante), para mejorar el tamaño de partícula al obtener NLS de menor tamaño.

$$\begin{aligned} \text{Tamaño de partícula} = & 6.9145 - 1.21579 \times [\text{Ácido esteárico}] - 0.93738 \times [\text{Tween 80}] + \\ & 1.24178 \times [\text{Ácido esteárico}] \times [\text{Tween 80}] \end{aligned}$$

Al sustituir, se obtiene:

$$\begin{aligned} \text{Tamaño de partícula} = & 6.9145 - 1.21579 \times [-1] - 0.93738 \times [-1] + 1.24178 \times [-1] \times [-1] \\ \text{Tamaño de partícula} = & 10.30945 \mu\text{m} \end{aligned}$$

La optimización alcanzaría los 10.30945 μm de tamaño de partícula, sin embargo, este tamaño es para formar micropartículas, sin embargo, comparado con la formulación 2, se trata de partículas de menor tamaño, por lo que se continuará con el desarrollo de la formulación optimizada.

3.3. Matriz de diseño aleatorizada de formulación 2 (Optimización de la formulación)

A partir de los tamaños de partícula obtenidos como en la formulación 1, se realizó el mismo tratamiento para la formulación 2, se introdujo la matriz que se describe en la *tabla 11* al software Statgraphics.

Tratamiento	Concentración de monoestearato de glicerilo (A)		Concentración de Tween 80 (B)		Tamaño de partícula (μm)
B	-	12%	+	8%	24.76907
(a) ₁	+	14%	-	6%	26.08623
(ab) ₂	+	14%	+	8%	25.48119
(1) ₂	-	12%	-	6%	27.47301
A	+	14%	-	6%	27.82067
(ab) ₁	+	14%	+	8%	25.81555
(1) ₁	-	12%	-	6%	25.67289
(b) ₂	-	12%	+	8%	24.82781
Ab	+	14%	+	8%	15.91082
1	-	12%	-	6%	26.80157
(a) ₂	+	14%	-	6%	25.23331
(b) ₁	-	12%	+	8%	26.52098

Tabla 11. Matriz de diseño aleatorizada de la formulación 2.

3.3.1. Optimización de la respuesta para la formulación 2

El ANOVA de la formulación 2 se muestra en la *figura 7*, se tienen las fuentes de variación, A: Concentración del lípido (monoestearato de glicerilo), B: Concentración del surfactante (tween 80) y la interacción de estos. Cuando el valor de P es menor a 0.05 indica que, los factores son significativos; el valor de P para el caso del factor A (0.0045) es menor al valor de α 0.05, con un nivel de confianza del 95.0 %, por lo tanto, es relevante para el tamaño de partícula, además, de que se acerca el 95.9686 % al modelo, superando al 90 % (mínimo aceptable).

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:[Monoestearato de glicerilo]	22.7543	1	22.7543	15.21	0.0045
B:[Tween 80]	6.83115	1	6.83115	4.57	0.0651
AB	6.01877	1	6.01877	4.02	0.0798
Error total	11.9689	8	1.49611		
Total (corr.)	296.887	11			

Figura 7. ANOVA de la formulación 1.

En la *figura 8* se muestra el diagrama de Pareto, en el que se indica que la concentración del monoestearato de glicerilo en su nivel alto (14 %) es superior a la línea de significancia estadística, por lo que este factor es importante para el tamaño de las nanopartículas, puesto que al incrementar la concentración del ácido esteárico se estaría disminuyendo el tamaño de partícula; por su parte la concentración del Tween 80, además de la interacción AB, no superan la línea de significancia, es decir, estos factores no tendrían un efecto relevante en el tamaño de partícula. Además, este gráfico expone visualmente lo que se obtuvo en el ANOVA, con solo un factor significativo.

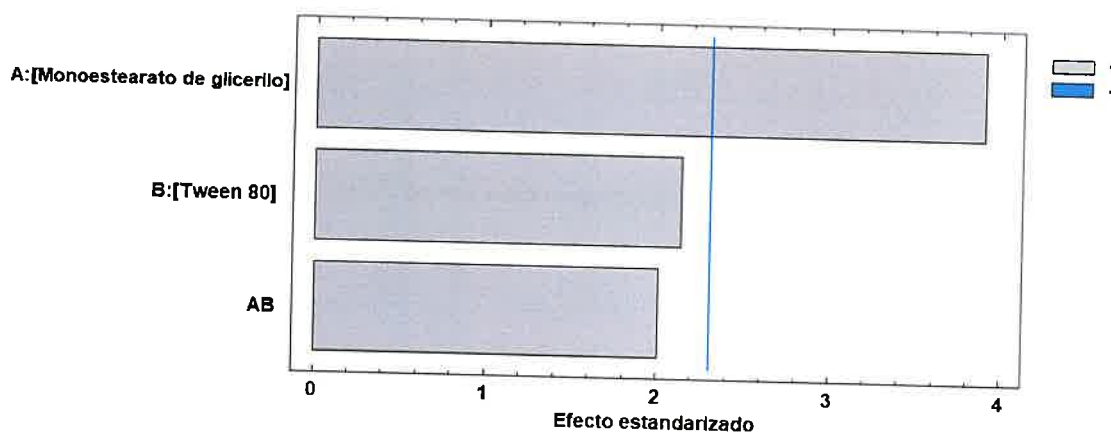


Figura 8. Diagrama de Pareto para el tamaño de partícula de la formulación 2 de NLS-Caf.

Por otra parte, en la *figura 9*, se pueden observar los efectos principales, es decir la relación que existe entre las concentraciones de los excipientes con el tamaño de partícula que se

busca, en este caso, se indica que mientras las concentraciones del monoestearato de glicerilo y del tween 80 estén en su nivel más bajo (12 y 6 %) respectivamente, se obtendrían tamaños de partícula menores.

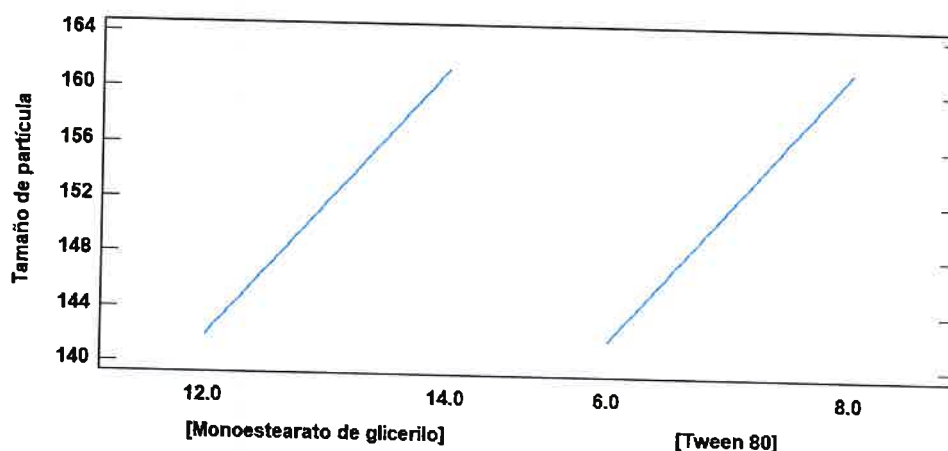


Figura 9. Efectos principales para el Tamaño de partícula para la formulación 2 de las NLS-Caf.

En la figura 10 muestra de forma independiente cada factor representado por una línea recta, como se puede observar, estas líneas se posicionan paralelas entre sí, lo cual significa que no existe un efecto estadísticamente significativo entre ambos factores, sin embargo, se nota una ligera distancia entre dichas líneas (factores), lo que podría deberse a que cuando ambos factores se encuentran en el nivel más bajo, la respuesta disminuiría, es decir el tamaño de partícula decrece. El resto de las interacciones no son viables, ya que indican el incremento del tamaño de partícula.

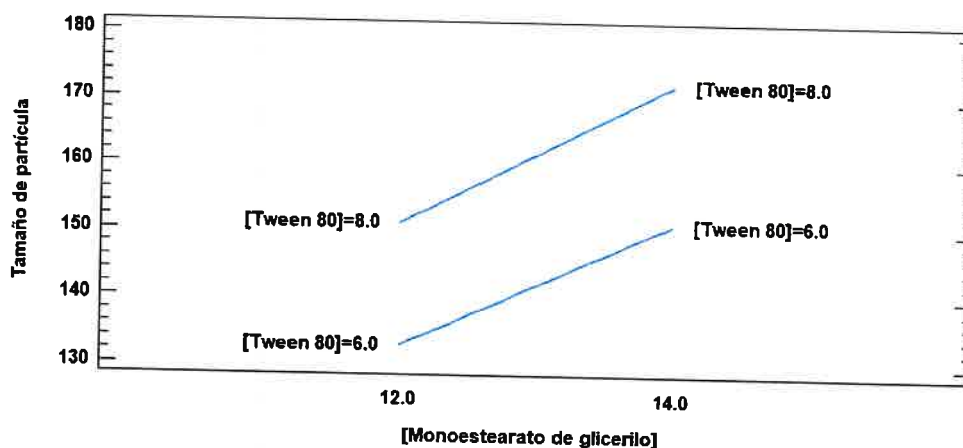


Figura 10. Interacciones para el tamaño de partícula de la formulación 2 las NLS-Caf.

En la gráfica de interacciones se puede observar que, para obtener tamaños de partícula menores, los dos factores (Concentración de tween 80 y de monoestearato de glicerilo) deben estar en su nivel más bajo, es decir, al 6 y 12% respectivamente. Ya que, si se

encuentran en su nivel más alto ambos factores, los tamaños de partícula permanecerán mayores al igual que si el monoestearato de glicerilo está en su nivel bajo y el tween 80 en su nivel alto, podría disminuir el tamaño, pero no al grado que se desea, por lo que lo más viable es que ambos factores se encuentren en su nivel más bajo para conseguir un menor tamaño de partícula.

Mediante los estadísticos ANOVA y los gráficos obtenidos de Statgraphics Centurion, se muestra en la *tabla 12* la manera en que al agregar las proporciones de concentraciones del lípido y del surfactante podrían ser adecuadas para obtener tamaños de partículas menores (en rango de nanopartículas), en este caso, la concentración del monoestearato de glicerilo y el tween 80 debería permanecer en el nivel bajo (12 y 6 %, respectivamente).

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
[Monoestearato de glicerilo]	12.0	14.0	12.0 (-)
[Tween 80]	6.0	8.0	6.0 (-)

Tabla 12. Optimización de formulación 2

Para corroborar la optimización, se colocó la ecuación de regresión del diseño a continuación, que describe el modelo ajustado a las fuentes de variación (concentraciones de lípido y surfactante), para mejorar el tamaño de partícula al obtener NLS de menor tamaño.

$$\text{Tamaño de partícula} = 20.7844 + 4.77953 \times [\text{Monoestearato de glicerilo}] + 0.6306655 \times [\text{Tween 80}] + 0.708212 \times [\text{Monoestearato de glicerilo}] \times [\text{Tween 80}]$$

Al sustituir, se obtiene:

$$\begin{aligned} \text{Tamaño de partícula} &= 20.7844 + 4.77953 \times [-1] + 0.6306655 \times [-1] + 0.708212 \times [-1] \times [-1] \\ \text{Tamaño de partícula} &= 16.0824 \mu\text{m} \end{aligned}$$

La optimización alcanzaría los 16.0824 μm de tamaño de partícula, sin embargo, este tamaño conformaría micropartículas, aun así, se desarrollará la formulación optimizada.

3.4. Pruebas adicionales a la evaluación de las NLS-Caf

3.4.1. Observación microscópica

En la *tabla 13* se muestran imágenes de la formación de micelas de las emulsiones, corroborando de esta manera que se formaron las micelas que conforman la emulsión agua aceite (W/O). Se puede observar que los tratamientos mostrados son aquellos en los que la formación de micelas es oportuna para identificar las fases de la emulsión.

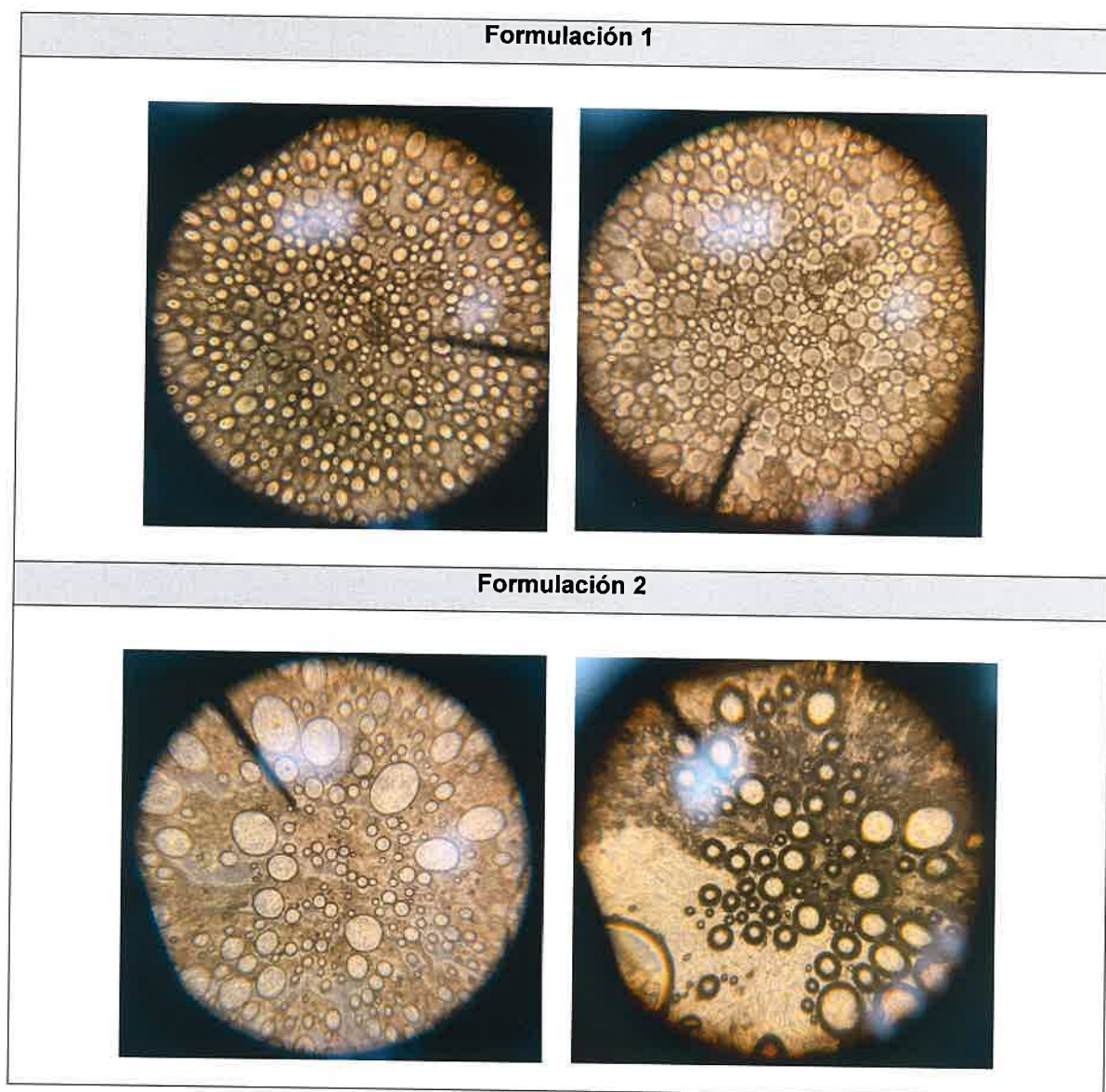


Tabla 13. Formación de la emulsión en las formulaciones.

3.4.2. pH

Como segunda prueba adicional a las NLS-Caf está la determinación de pH; los resultados se muestran en la *tabla 14*, como se puede observar, la formulación 1 muestra tratamientos

con tendencia ácida, mientras que los de la formulación 2 se encuentran dentro del rango del pH de la piel, lo que los hace viables para la incorporación en una crema cosmética.

#	Formulación 1		Formulación 2	
	Tratamiento	pH	Tratamiento	pH
1	(a) ₂	6.11	b	4.95
2	(ab) ₁	6.18	(a) ₁	2.57
3	b	6.04	(ab) ₂	2.73
4	(b) ₂	5.98	(1) ₂	2.70
5	ab	6.35	a	7.45
6	1	6.26	(ab) ₁	4.20
7	a	6.66	(1) ₁	2.69
8	(b) ₁	6.86	(b) ₂	2.62
9	(1) ₂	6.60	ab	2.70
10	(ab) ₂	6.66	1	2.64
11	(a) ₁	6.64	(a) ₂	2.73
12	(1) ₁	6.68	(b) ₁	2.74

Tabla 14. pH de los tratamientos de la formulación 1 y 2.

Las partículas obtenidas hasta esta etapa del proceso se encuentran dentro del rango micrométrico. Este resultado puede atribuirse al empleo de un agitador convencional, el cual no genera la energía mecánica suficiente para promover la formación de nanopartículas (Sagoe, *et al.*, 2023). Asimismo, la elevada concentración de lípido utilizada podría requerir la incorporación de un cosurfactante para optimizar la estabilidad del sistema y favorecer la formación de nanopartículas (Gardouh, *et al.*, 2020).

Las nanopartículas lipídicas suelen formarse con concentraciones de lípidos comprendidas entre el 0.1 % y el 30 % (p/p) (Lüdtke, *et al.*, 2025). Diversos estudios han demostrado que un contenido lipídico elevado (> 5-10 %) puede incrementar el tamaño de partícula y el índice de polidispersidad debido al aumento de la viscosidad del sistema. Este fenómeno reduce la eficiencia de la homogeneización y favorece la aglomeración de partículas (AL-Smadi, *et al.*, 2025). La concentración de surfactante constituye un parámetro crítico en el desarrollo de nanopartículas lipídicas, por lo que debe optimizarse para cada formulación, con el fin de garantizar su estabilidad y eficacia. Se ha reportado que el empleo de Tween 80 en concentraciones elevadas favorece la obtención de partículas de menor tamaño. Además, este surfactante puede actuar como agente estabilizante durante la

formación de nanopartículas al reducir la energía superficial del sistema e inhibir el crecimiento cristalino (Sukmawati, *et al.*, 2018).

Para ambas formulaciones, el software de optimización recomendó emplear los factores en sus niveles más bajos, correspondientes a un contenido lipídico del 12 % y una concentración de Tween 80 del 6 %. Sin embargo, estas concentraciones de surfactantes son superiores a las reportadas en estudios similares, donde los emulsionantes suelen emplearse en intervalos de 0,5 % a 5 % (p/p) (Lüdtke *et al.*, 2025). A pesar de ello, diversos autores han señalado que concentraciones elevadas de surfactante pueden favorecer la formación de partículas de menor tamaño. Este efecto se atribuye a la capacidad del surfactante para disminuir la tensión interfacial entre las fases del sistema, facilitando la fragmentación de las partículas y aumentando el área superficial disponible. De manera consistente, Akanda *et al.* (2023) observaron que una disminución en la concentración de surfactante provocó un incremento del tamaño de partícula durante el almacenamiento.

Con base en estos antecedentes, se decidió emplear concentraciones elevadas de Tween 80 en el diseño experimental. No obstante, el término “nivel bajo” utilizado para describir los factores corresponde únicamente a la codificación establecida en el diseño experimental y no necesariamente a una concentración baja en términos absolutos.

Por otra parte, el empleo de concentraciones elevadas de surfactante podría incrementar el riesgo de inestabilidad física del sistema y favorecer la separación de fases mediante fenómenos de maduración de Ostwald (Al-Smadi *et al.*, 2025).

Adicionalmente, se ha reportado que las nanopartículas lipídicas sólidas presentan una adecuada estabilidad y dispersión en medios acuosos con un pH cercano a 7,4 (Shahab *et al.*, 2023). En este contexto, las nanopartículas lipídicas sólidas obtenidas en la formulación 1 presentan valores de pH próximos a dicho intervalo, por lo que podrían exhibir una mayor estabilidad en comparación con las obtenidas en la formulación 2.

Capítulo 3 Caracterización fisicoquímica de las Nanopartículas Lipídicas Sólidas cargadas con cafeína (NLS-Caf)

Una vez obtenidas las formulaciones optimizadas mediante el diseño de experimentos descritos en el capítulo anterior, se realizó su caracterización fisicoquímica con el propósito de determinar cuál de ellas cumplía con los parámetros establecidos para el desarrollo de las Nanopartículas Lipídicas Sólidas cargadas con Cafeína (NLS-Caf).

En este capítulo, se determinó el tamaño de partícula, considerado un parámetro fundamental para evaluar la formación y las características de las NLS. Asimismo, se realizó la prueba corneométrica como evaluación física de la piel, mediante la medición de su nivel de hidratación, con el propósito de determinar el efecto de las NLS-Caf sobre la hidratación del estrato córneo y evaluar su comportamiento tras la aplicación de las formulaciones. Adicionalmente, se determinaron la viscosidad y el pH de las formulaciones, debido a su importancia en las características físicas y en la aplicación de estas.

Las formulaciones fueron preparadas siguiendo la metodología establecida durante el desarrollo experimental. Sin embargo, se evaluó el efecto de utilizar diferentes condiciones de agitación durante su preparación. Inicialmente, se empleó un agitador mecánico Caframo, caracterizado por presentar una menor potencia de agitación, y posteriormente se utilizó un Ultra-Turrax, equipo de alta cizalla. Debido a esta variación en las condiciones de preparación, las determinaciones fisicoquímicas se realizaron por separado para las formulaciones optimizadas obtenidas bajo cada condición de agitación, con el propósito de comparar sus características y determinar la influencia del proceso de preparación de las NLS- Caf.

1. Material y equipos

Material	Equipo	Reactivos
Vasos de precipitado de 50 mL	Balanza analítica Shimadzu AUX120	Cafeína anhidra (BASF; Lote 99590)
Vasos de precipitado de 25 mL	Parrilla de agitación IKA Caframo	Ácido esteárico (Droguería Cosmopolita)
Varilla de vidrio	Ultra Turrax IKA T-25 D	Tween 80 (Droguería Cosmopolita; Lote 1673)
Espátula	Analizador de tamaño de partícula Horiba LA-950V2	Monoestearato de glicerilo (CEDROSA; Lote 18410)
Mortero y pistilo	Brookfield digital, modelo DV-II	Metanol / Agua destilada
Agitadores		

Tabla 15. Material y equipos

2. Metodología

2.1. Preparar las formulaciones optimizadas siguiendo la metodología descrita en la figura 2, bajo las condiciones establecidas en el diseño de experimentos. Las concentraciones y los factores de proceso seleccionados se muestran en las tablas 16 y 17.

2.2. Utilizar dos equipos de homogeneización, Caframo y Ultra-Turrax, emplear velocidades de agitación de 4,000 y 10,000 rpm, respectivamente.

2.3. Mantener constante el tiempo de agitación.

2.4. Evaluar por separado las Nanopartículas Lipídicas Sólidas cargadas con Cafeína (NLS-Caf) que fueron elaboradas con cada homogeneizador.

Excipiente	Concentración	Cantidad	Variables de fabricación
Cafeína	5 %	2.5 g	4000 rpm/15 min en Caframo
Ácido esteárico	12 %	6 g	
Tween 80	6 %	3 mL	
Etanol	c.b.p. 50 mL	10 mL	10,000 rpm /15 min Ultra Turrax
Agua		35 mL	

Tabla 16. Formulación 1 optimizada

Excipiente	Concentración	Cantidad	Variables de fabricación
Cafeína	5%	2.5 g	4000 rpm/15 min en Caframo
Monoestearato de glicerilo	12%	6 g	
Tween 80	6%	3 mL	
Etanol	c.b.p. 50 mL	10 mL	10,000 rpm /15 min Ultra Turrax
Agua		35 mL	

Tabla 17. Formulación 2 optimizada

A partir de las formulaciones optimizadas se realizó su evaluación fisicoquímica que abarcó las siguientes determinaciones:

2.1. Tamaño de partícula

2.1.1. Muestra:

- Preparar una solución al 2 % de las NLS-Caf recién preparadas. Agregar 1 mL de muestra a un matraz de 50 mL y llevar a volumen con agua destilada.

2.1.2. Procedimiento:

- Realizar la lectura del blanco (agua destilada).

- Agitar vigorosamente la muestra preparada, agregarla a la celda y colocar la barra de agitación.
- Realizar la lectura en el Particle Size Distribution Analyzer LA-950 V2, Horiba.
- Nota: agregar el blanco o la muestra cuidando que no haya formación de burbujas, ni que la celda se encuentre sucia.

2.2. Humedad

2.2.1. Muestra:

- Pesar 0.5 g de muestra.

2.2.2. Procedimiento:

- Acondicionar el ambiente (18°C, 55 % HR).
- Colocar 0.5 g de muestra en el área seccionada de piel, extender en el espacio determinado y dejar absorber.
- Tomar la lectura inicial (tiempo 0), después tomar las lecturas en un rango de 5 minutos, con el sensor del corneómetro. La muestra se toma en 6 puntos diferentes de la sección a muestrear.

2.3. Viscosidad

2.3.1. Muestra:

- Colocar la dispersión en un frasco largo.

2.3.2. Procedimiento:

- Seleccionar las condiciones a las que se efectuara la lectura (aguja no. 14, 5 rpm).
- Introducir la aguja en la muestra de manera inclinada, cuidado que no se formen burbujas en el interior de la muestra.
- Colocar en el husillo, girando la aguja en sentido contrario de las manecillas del reloj.
- Efectuar la lectura.
- Realizar la determinación por triplicado.

2.4. pH

2.4.1. Muestra:

- Tomar 1.0 g y disolver en 50 mL de agua desmineralizada.

2.4.2. Procedimiento:

- Calibrar equipo con solución buffer pH 7.0, 4.0 y 10.0
- Efectuar la determinación a $25 \pm 2^\circ\text{C}$.
- Lavar el electrodo y recipiente varias veces con agua, dejar que escurra el agua y secar con papel absorbente.
- Enjuagar el electrodo y el recipiente con la solución de prueba (muestra).
- Llenar el recipiente con esta solución y efectuar la determinación de pH. Realizar por triplicado.

3. Resultados

El análisis fisicoquímico de las NLS-Caf fabricadas describió el comportamiento que tuvieron al ser fabricadas por distintos equipos de agitación, los siguientes resultados describen algunas de sus características, además de la relación entre la velocidad aplicada y el tamaño de partícula. En la primera sección se muestran las formulaciones fabricadas mediante el Caframo; en la subsiguiente, las elaboradas con el Ultra-Turrax.

3.1. Formulaciones optimizadas fabricadas con Caframo

3.1.1. Tamaño de partícula

En la *tabla 18*, se muestra el promedio del tamaño de partícula para la formulación 1 y 2 con sus respectivas réplicas. Como se puede apreciar, ambas formulaciones tienen tamaño de partícula en el orden de los micrómetros, aunque las partículas formadas en la formulación 2 son de menor tamaño ($5.11 \mu\text{m}$) ninguna alcanza el tamaño de nanopartículas. Aun así, el tamaño de las partículas en ambos casos es homogéneo, puesto que hubo una distribución de tamaño de partícula reducida.

Muestra	Tamaño de partícula medio (μm)			Lectura $\bar{x}$
	1	2	3	
Formulación óptima 1	10.84	17.57	17.44	15.28
Formulación óptima 2	5.30	5.09	4.96	5.11

Tabla 18. Tamaño de partícula de NLS-Caf (Fabricación con menor velocidad aplicada).

3.1.2. Prueba corneométrica

En la *tabla 19* se colocaron los valores de secado en piel obtenidos, se muestreó en cinco zonas diferentes y se blanqueó entre cada muestra colocada (piel sin muestra, fila 1). Los valores en promedio para cada formulación fueron los siguientes, para la formulación 1 se obtuvo un valor de 20.17, mientras que para la formulación 2, 22.96; con base en la especificación, un valor menor a 35 (Brazos, manos, piernas, codos), indica que la

superficie de piel se encuentra muy seca, es decir, que el producto colocado ha permeado el estrato córneo por lo que el área no se encuentra húmeda y se ha absorbido por completo, el dictamen cumple para ambos casos, sin embargo, para la formulación 1 el valor es menor, lo que indica que en comparación con la formulación 2, se absorbió de mejor manera la formulación 1.

Muestra	Formulación 1			Formulación 2		
	F1	F1(1)	F1(2)	F2	F2(1)	F2(2)
1	38.7	26.8	33.1	31.0	25.4	31.7
2	18.2	15.2	16.0	19.5	17.2	20.4
3	20.9	12.2	12.6	23.3	18.9	23.3
4	19.9	13.5	23.3	22.5	18.5	19.9
5	20.1	14.6	22.2	24.1	23.5	24.8
6	17.5	14.4	23.6	27.4	21.8	20.2
Promedio	22.6	16.1	21.8	24.6	20.9	23.4
Promedio	20.17			22.96		

Tabla 19. Lecturas promediadas del Corneómetro.

3.1.3. Viscosidad

La viscosidad que presentó cada formulación se muestra en la *tabla 20*, la determinación se realizó por triplicado, el valor absoluto para la formulación 1 fue 91.95 cPs y para la formulación 2 fue 47.25 cPs; como se observa, la formulación 2 es mucho menos viscosa que la formulación 1, lo cual podría indicar que la formulación 2 podría fluir mejor en la piel al ser dispersada, sin embargo la formulación 1 al ser más viscosa puede ser menos fluida y permanecer mayormente en el área de piel colocada.

Muestra	Formulación 1		Formulación 2	
	F1	F1(1)	F2	F2(1)
1	45.0 cPs	35.0 cPs	20.0 cPs	-
2	25.0 cPs	32.6 cPs	17.5 cPs	15.2 cPs
3	30.0 cPs	30.0 cPs	-	12.2 cPs
Promedio	33.33 cPs	32.35 cPs	18.75 cPs	15.0 cPs
Promedio	32.84 cPs		16.88 cPs	
Viscosidad absoluta	91.95 cPs		47.25 cPs	

Tabla 20. Lecturas promediadas de la viscosidad.

3.2. Formulaciones optimizadas fabricadas con Ultra-Turrax

3.2.1. Tamaño de partícula

Los tamaños de partícula de las formulaciones 1 y 2 se muestran en la *tabla 21*, los valores se reportan en micrómetros, lo que se obtuvo fue lo si la formulación 1 muestra tamaños menores respecto a la formulación 2, puesto que en la formulación 1 se obtuvieron nanopartículas de entre 120 a 196 nm, un rango oportuno para el diseño de dichos sistemas. Mientras que, en la segunda formulación, los tamaños oscilan entre 487 y 518 nm, aunque se encuentran dentro del rango de las nanopartículas, son de mayor tamaño. Ambas formulaciones mostraron mejoría en los tamaños de partícula, esto indica que aplicar alta velocidad durante la fabricación es una variable crítica para la obtención de estos sistemas lipídicos.

Muestra	Tamaño de partícula medio (μM)			Lectura final	Promedio ($\bar{x}$)
	1	2	3		
Formulación óptima 1	0.10559	0.10568	0.10592	0.13203	0.149
FO 1(2)	0.09193	0.09256	0.09246	0.19667	
FO 1(3)	0.09088	0.09096	0.08977	0.12084	
Formulación óptima 2	0.10819	0.10899	0.11070	0.49236	0.499
FO 2(2)	0.11236	0.11469	0.11173	0.51838	
FO 2(3)	0.09015	0.09850	0.09779	0.48736	

Tabla 21. Tamaño de partícula de NLS-Caf (Fabricación con alta velocidad).

En la *figura 11* se observa la distribución del tamaño de partícula mediante un histograma de barras sobre la formulación 1, una forma típica de presentar el tamaño de partículas y distribución en donde las barras ilustran la frecuencia de aparición frente al rango de tamaño, en esta representación se muestra la frecuencia numérica de datos de tamaño de partícula en escala lineal. La curva suave trazada a través del histograma es una curva de frecuencia de tamaño válida si se cuentan suficientes partículas. Se observa además la formación de una sola población de tamaño de partículas que se encuentra entre 0.06 y 0.12 μM , así como se detalla en la *tabla 21*.

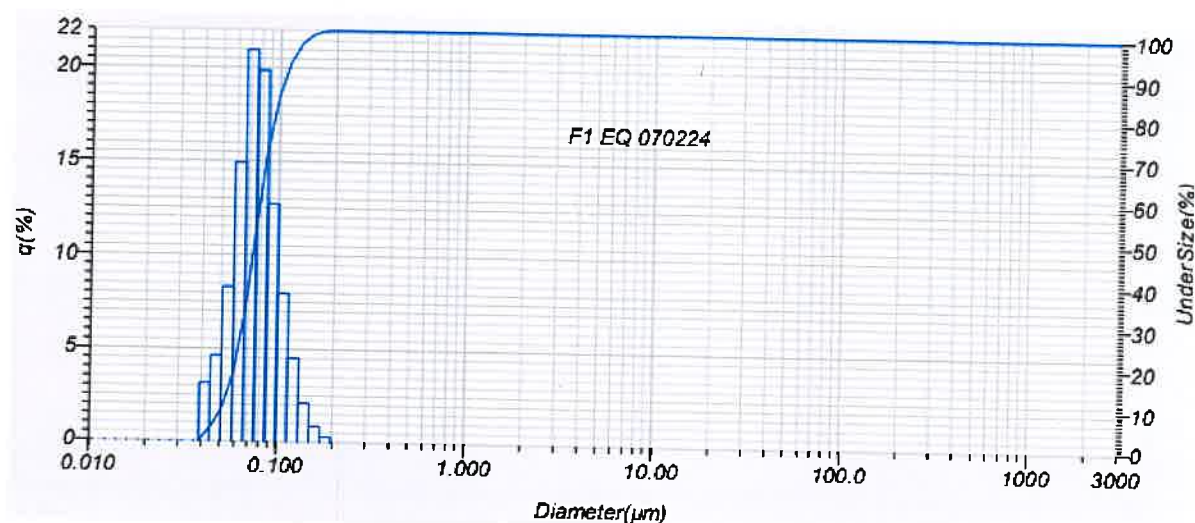


Figura 11. Distribución del tamaño de partícula de la formulación 1.

3.2.2. Humectabilidad

Los valores obtenidos de la prueba corneométrica se muestran en la *tabla 22*, dentro de la cual se observa que los valores entre ambas formulaciones son semejantes, por una lado la formulación 1 promedió un valor de 23.33, mientras que la formulación 2, de 20.53; ambos son menores a 35 y la especificación indica que un valor menor al anterior significa que el área de aplicación de la muestra se encuentra muy seca, lo que quiere decir que ambas lograron permear la piel, por ello el área se encuentra seca. Como se puede ver, ambas se encuentran dentro de esta especificación, sin embargo, la formulación 2 en contraste con la formulación 1 es menor, indicando que fue absorbida de mejor manera.

	Formulación 1				Formulación 2			
Muestra	F1	F1(1)	F1(2)	F1(3)	F2	F2(1)	F2(2)	F2(3)
1	21.0	28.7	22.3	40.2	43.2	37.6	34.8	26.9
2	24.7	23.1	26.9	9.2	24.2	17.0	14.4	7.5
3	23.1	18.2	25.7	14.0	26.6	21.7	9.6	14.3
4	25.5	23.5	25.2	20.6	20.7	19.7	12.6	20.0
5	26.9	22.7	23.6	25.5	25.6	14.5	14.0	23.7
6	23.0	21.8	23.6	20.6	21.5	17.1	12.8	13.3
Promedio	24.0	23.0	24.6	21.7	26.8	21.3	16.4	17.6
Promedio	23.33				20.53			

Tabla 22. Lecturas promediadas del Corneómetro.

La viscosidad reportada de la formulación 1 y 2 se muestra en la *tabla 23* en donde se colocan los promedios y la viscosidad absoluta, se puede observar que tienen viscosidades diferentes, por un lado, la de la formulación 1 es de 30.3 cPs mientras que la de la formulación 2 es de 220.9 cPs, lo que significa que la formulación 1 es menos viscosa. Como ya se había mencionado, el tener mayor viscosidad incrementa el tamaño de partícula (Gardouh, *et al.*, 2010), en este caso particular, dicha preposición es verdadera, ya que la formulación 2 tiene una viscosidad mayor (220.94 cPs) y el tamaño de partícula osciló entre 487 a 518 nm, por otro lado, la formulación 1 al ser menos viscosa (30.3 cPs) tuvo tamaños de partícula de entre 120 a 196 nm como se muestran en la *tabla 21*.

Muestra	Formulación 1 (cPs)			Formulación 2 (cPs)		
	F1	F1(1)	F1(2)	F2	F2(1)	F2(2)
1	12.5	12.5	12.5	70.0	77.6	105
2	10.0	10.0	10.0	60.0	72.6	100
3	10.0	10.0	10.0	57.4	70.0	97.6
Promedio	10.83	10.83	10.83	62.46	73.4	100.86
Promedio	10.83			78.90		
Viscosidad absoluta	30.32 cPs			220.94 cPs		

Tabla 23. Lecturas promediadas de la viscosidad.

3.2.4. pH

Los valores de pH de la formulación 1 y 2 se encuentran en la *tabla 24*, como se observa el pH de la formulación 2 es menor respecto al que presenta al de la formulación 1 (3.83 frente a 6.24), el cual tiene carácter ácido y debido a que va dirigido a la piel, no sería conveniente para su uso en piel, además porque algunos autores mencionan que con un rango de tamaño de 57 ± 15 nm permanecen estables en un medio acuoso a pH 7,4 (Shahab, *et al.*, 2023) de tal manera que si la formulación 1 sigue la tendencia anterior podría tener mayor estabilidad en comparación con la formulación 2.

Por otra parte, se determinó el porcentaje del coeficiente de variación entre las lecturas de pH, en ambos casos es menor a 1, lo que significa que hubo poca variabilidad entre sí y el error reduce, asegurando la confiabilidad de los datos y de su análisis.

Muestra	pH	
	Formulación 1	Formulación 2
1	6.23	3.83
2	6.22	3.86
3	6.24	3.85
4	6.28	3.81
Promedio	6.24	3.83
% CV	0.42	0.58

Tabla 24. Lecturas promediadas de pH.

Los tamaños de partícula que se obtuvieron en las formulaciones optimizadas mejoraron respecto a los obtenidos con los primeros ensayos durante el desarrollo del diseño de experimentos, sin embargo, las partículas que se fabricaron empleando el Caframo no consiguieron un tamaño adecuado de nanopartículas (15.28 y 5.11 μm) para la formulación 1 y 2 respectivamente, lo cual las convierte en un sistema inestable además en el que la incorporación de la cafeína así como su liberación se verían afectados, sin embargo, cuando en la fabricación se empleó el agitador de alta cizalla (Ultra-Turrax), se consiguieron los tamaños de partícula deseados (120 a 196 nm para la formulación 1 y entre 487 a 518 nm para la formulación 2), esperando con ello la buena incorporación de la cafeína, su correcta liberación, además de estabilizar los sistemas durante el periodo de almacenamiento. Ambas formulaciones obtuvieron tamaños de partícula adecuados, sin embargo, las NLS-Caf de formulación 1 son todavía de menor tamaño. *Azhar & Hamishehkar* consideran que el tamaño y la distribución de tamaño de las partículas son dos criterios importantes de las nanopartículas, ya que estos factores afectan la velocidad de liberación del fármaco, la biodistribución, la mucoadhesión, la captación celular de agua y el intercambio de tampones en el interior de las nanopartículas, así como la difusión de proteínas. El tamaño y la distribución de tamaño de las partículas son otros índices importantes para evaluar una forma farmacéutica coloidal durante su almacenamiento. La estabilidad del tamaño es un aspecto crucial para las nanopartículas, más que para otros sistemas de administración de fármacos, debido a su gran superficie específica.

La formación de nanopartículas lipídicas sólidas requiere de una etapa de emulsificación eficiente. La agitación convencional de bajo cizallamiento produce emulsiones gruesas con gotas de mayor tamaño, mientras que la homogeneización de alto cizallamiento mediante equipos como Ultra-Turrax genera emulsiones finas que favorecen la obtención de

nanopartículas lipídicas sólidas con menor tamaño de partícula y distribución mayormente homogénea. Por ello, el empleo de Ultra-turrax constituye una práctica ampliamente reportada en los protocolos de preparación de nanopartículas lipídicas sólidas (Subroto, *et al.*, 2023; Mukherjee, *et al.*, 2009 & Gordillo, *et al.*, 2018).

Por otra parte, en cuanto a la humectabilidad que presentan las NLS directamente en la piel, para el caso de las NLS-Caf fabricadas con Caframo con la formulación 1 se obtuvo un valor de 20.17 UA. mientras que para la formulación 2, 22.96 UA; al cambiar el agitador por el Ultra-Turrax, los valores fueron 23.33 UA para la formulación 1 y para la formulación 2, de 20.53 UA, como se puede observar no hubo una diferencia significativa para este parámetro, en todos los casos el grado de humectación es menor a 30 UA por lo que la piel se encuentra muy seca, lo que quiere decir que aunque se hayan formado las NLS de cafeína, aplicarlas de forma directa complica atravesar la barrera lipídica de la piel. Las propiedades eléctricas de la piel dependen del contenido de agua del estrato córneo de la epidermis. La hidratación epidérmica se evaluó mediante la medición de la capacitancia eléctrica, el principio del método se basa en la diferencia entre la constante dieléctrica del agua (ϵ_1) y la de otras sustancias, mediante la medición de la capacitancia de un medio dieléctrico. Cualquier cambio en la constante dieléctrica, como consecuencia de la variación en la hidratación de la superficie cutánea, produce una alteración en la capacitancia calculada del condensador (Constantin, *et al.*, 2014).

Respecto a la viscosidad de las NLS-Caf fabricadas con Caframo fue de 91.95 cPs para la formulación 1 y para la formulación 2 de 47.25 cPs, pero al ser elaboradas con Ultra-Turrax para la formulación 1 fue de 30.32 cPs y para la formulación 2 de 220.94 cPs, un cambio drástico que dependió directamente de la velocidad de agitación. Lo que quiere decir que para las NLS-Caf finales, el hecho de tener una menor viscosidad la formulación 1 el tamaño de partícula es menor debido a que como *Gardouh* y colaboradores, señalan que una mayor viscosidad del lípido fundido requiere más energía para la formación de la nanopartícula y puede resultar en un tamaño de partícula mayor, mientras que lípidos menos viscosos o con puntos de fusión bajos facilitan la homogeneización y la obtención de partículas más pequeñas, el tamaño medio de partícula depende de la concentración de lípidos en el solvente orgánico miscible en agua, un alto contenido de lípidos aumentará la viscosidad de la fase dispersa lo que dificulta la homogeneización por lo que no se pueden obtener partículas muy pequeñas al tener una gran cantidad de lípidos en la formulación.

Finalmente, respecto al pH, la formulación 1 obtuvo un pH neutro y ligeramente básico, lo cual hace que las NLS se encuentren estables en el sistema formado. Por lo tanto, comparando la manera en que fueron fabricadas las NLS-Caf mediante Caframo o con Ultra Turrax pudo comprobarse que se obtuvieron mejores NLS empleando el agitador de alta cizalla, además entre la formulación 1 y 2, las NLS de la formulación 1 resultaron tener un menor tamaño de partícula, así como una correcta distribución, son menos viscosas y tienen un pH que les permite ser un sistema estable.

Capítulo 4 Cuantificación electroquímica de cafeína libre y encapsulada en Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS-Caf) mediante Voltamperometría Diferencial de Pulso

En este capítulo se presenta la cuantificación de cafeína libre y encapsulada en Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS-Caf) mediante Voltamperometría Diferencial de Pulso (VDP). Para comprobar que el método fuera adecuado para la determinación de cafeína, se llevó a cabo la validación del método considerando los parámetros de linealidad del sistema, precisión del sistema, exactitud, repetibilidad del método, linealidad del método y especificidad.

En cuanto al desarrollo analítico, se prepararon soluciones estándar de cafeína a concentraciones conocidas, las cuales permitieron establecer la relación entre la concentración del analito y la respuesta electroquímica obtenida, así como para construir la curva de calibración empleada para la cuantificación y tratamiento de las muestras, aspecto fundamental para garantizar la adecuada determinación de las porciones de cafeína libre y encapsulada.

La caracterización electroquímica permitió obtener los voltamperogramas correspondientes a las diferentes especies analizadas. En particular, la solución estándar de cafeína presentó un pico de oxidación a un potencial de aproximadamente 1.37 V, el cual se utilizó como señal característica para su identificación y cuantificación en las muestras de NLS-Caf.

Con el método desarrollado se determinaron las porciones de cafeína presentes en las nanopartículas. Los resultados mostraron un intervalo de confianza de 70.37 – 83.86 % para la cafeína encapsulada y de 12.69 – 22.18 % para la cafeína libre. Estos intervalos están asociados con la probabilidad de que el valor real se encuentre en estos límites. En conjunto, los resultados obtenidos permiten conocer la cantidad de la cafeína que se encuentra encapsulada y la que permanece libre, demostrando que la Voltamperometría Diferencial de Pulso puede ser utilizada para la cuantificación de cafeína en este tipo de sistemas.

1. Material y equipos

Material	Equipo	Reactivos
Matraces aforados de 10, 50 y 100 mL	Balanza analítica Explorer OHAUS E11140	Cafeína Sigma- Aldrich
Micropipeta 200, 1000 y 20-100 μ L	Potenciómetro HANNA Edge blu HI 2202	Ácido clorhídrico MEYER
Pipetas volumétricas de 1mL	Potenciostato/Galvanostato Autolab PGSTAT302N	Cloruro de sodio MEYER
Pipetas graduadas de 1mL	Auxiliar de pipetas	Acetato de sodio J.T. Baker
Celda electroquímica		Ácido acético glacial MEYER
Embudo Büchner		Ácido esteárico Droguería Cosmopolita
Matraz Kitasato 500 mL		Tween 80 Droguería Cosmopolita
Probetas de 100 mL		

Tabla 25. Material y equipos

2. Metodología

2.1. Preparación del estándar de cafeína

Se preparó una solución estándar de cafeína anhidra (Caf std) de concentración 1.95 mg/mL para obtener las diferentes concentraciones de estudio (0.0975 mg/mL y 0.195 mg/mL), dicha solución fue disuelta en 10 mL de HCl 0.1M; a partir del stock se prepararon distintas diluciones con NaCl 0.1 M y SA de acetatos pH 4.55. Finalmente se analizó por voltamperometría de pulso diferencial (DPV) en un potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT302N, con una celda electroquímica de tres electrodos, 1) Electrodo de referencia Ag/AgCl, 2) Contraelectrodo de Pt y 3) Electrodo de trabajo de NPsAu/Grafito. Los parámetros empleados en las mediciones electroquímicas fueron, 2 s como tiempo de equilibrio en el pretratamiento, para la medición el tiempo de modulación fue de 0.075 s con intervalos de tiempo de 0.32 s, mientras que, la ventana de potencial iniciaba en 0 V y terminaba en 1.5 V, con una amplitud de modulación de 0.06 V.

La Solución Amortiguadora (SA) de acetatos pH 4.5, se preparó con acetato de sodio 0.1M y ácido acético glacial 0.1M, el pH ajustado fue de 4.55.

2.2. Tratamiento de la muestra

Las Nanopartículas Lipídicas Sólidas de Cafeína (NLS-Caf) fueron preparadas mediante homogeneización en caliente, sometidas a agitación de alta cizalla. La composición de

estas fue Tween 80 como surfactante (6%), ácido esteárico como lípido (12%), cafeína como principio activo (5%) y agua/EtOH como disolventes (c.p.b.). Los lotes que se prepararon fueron de 50 mL. A las muestras de las NLS-Caf se les tomó el peso inicial total, posteriormente se filtraron al vacío con lo que se obtuvo un sobrenadante (muestra de cafeína encapsulada) y un filtrado (muestra de cafeína libre) y finalmente se analizaron de forma independiente estas fases.

También se preparó una muestra placebo (NLS-Blanco), se elaboró de la misma forma que las NLS-Caf, aunque sin agregar cafeína y se analizó siguiendo la metodología antes descrita.

Para el análisis de las muestras de NLS-Caf con cafeína encapsulada se pesó la cantidad equivalente al peso del estándar de cafeína para alcanzar las mismas concentraciones (0.0975 mg/mL), posteriormente se disolvió en agua desmineralizada y se preparó una dilución 5:10 cuyo medio fue NaCl 0.1M y SA de acetatos pH 4.55, finalmente se analizó la muestra en el potencióstato/galvanostato Autolab PGSTAT302N bajo las mismas condiciones con las que se analizó el estándar de cafeína.

Por otra parte, en cuanto al análisis de las muestras de NLS-Caf con cafeína libre se tomó 1 mL para preparar una solución stock en 10 mL de agua desmineralizada, consecutivamente se diluyó 1:10, la solución final estuvo constituida de NaCl 0.1M y SA de acetatos pH 4.55, luego la muestra fue analizada en el potencióstato/galvanostato Autolab PGSTAT302N con las condiciones antes descritas, para estas muestras se empleó el stock de cafeína de concentración 0.195 mg/mL.

3. Resultados

3.1. Caracterización del estándar de cafeína

La caracterización electroquímica de la cafeína se hizo por VDP, el voltamperograma de cafeína (*Figura 12*) muestra un pico de oxidación al potencial de 1.37 V. Este pico característico será empleado para las siguientes determinaciones cuantitativas.

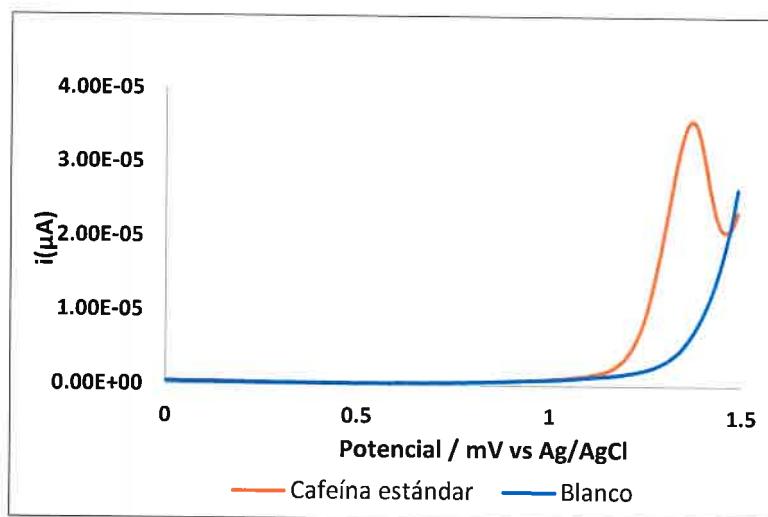


Figura 12. Voltamperograma de cafeína estándar 0.195mg/mL en SA-Acetatos pH 4.55 con electrolito soporte NaCl 0.1M

El proceso de oxidación de la cafeína se muestra en la *Figura 13*, involucra cuatro electrones ($4e^-$) y cuatro protones ($4H^+$), el primer paso es una oxidación $2e^-$, $2H^+$ del enlace C-8 a N-9 para dar el ácido úrico sustituido, seguida de una oxidación inmediata $2e^-$, $2H^+$ al análogo 4,5-diol del ácido úrico, que es rápidamente fragmentado.

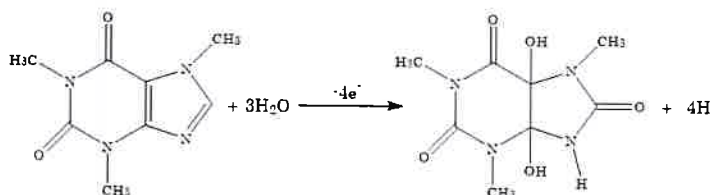


Figura 13. Mecanismo de oxidación general de cafeína (Tasić, et al., 2022).

3.2. Curva calibración del estándar de cafeína

Para cuantificar la cafeína se prepararon 3 curvas de calibración en el intervalo de concentraciones de 0.117 a 0.273 mg/mL (*Tabla 25*), las mediciones electroquímicas fueron usadas para construir el grafico de corriente (i) vs concentración (*Figura 14*), a través de la regresión lineal se encontró que el sistema es lineal ya que el valor de r^2 fue mayor a 0.98.

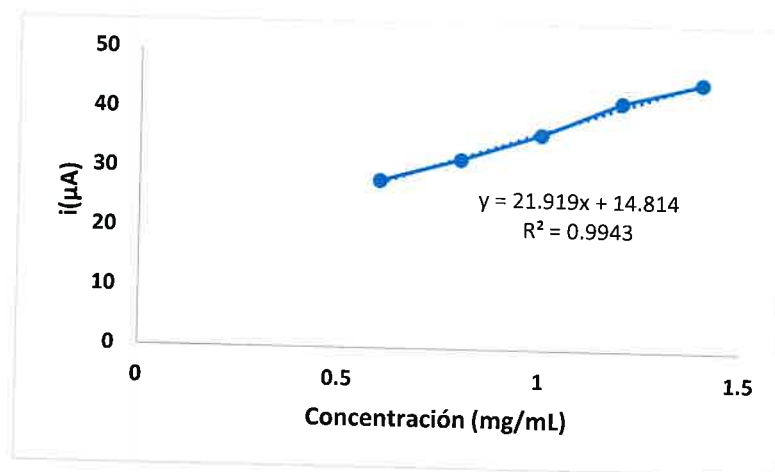


Figura 14. Curva de calibración de cafeína

La *tabla 25* muestra los datos asociados con las curvas de calibración, así como los valores del coeficiente de determinación (r^2), la sensibilidad (m) y la ordenada al origen (b). Al haber obtenido un r^2 de 0.9943, se establece que las variables están directamente relacionadas y, por tanto, el sistema es lineal. A partir de la regresión lineal, se determina la sensibilidad del método como 21.919 μ A en mg/mL

No. Solución	Estándar concentración (mg/mL)	Corriente (i) (μ A)			
		Repeticiones			$\bar{x}$
		1	2	3	
1	0.117	28.28	28.45	28.19	28.3
2	0.156	31.81	32.04	32.04	31.9
3	0.195	36.22	36.40	36.22	36.3
4	0.234	41.66	41.97	41.97	41.8
5	0.273	45.14	45.32	45.30	45.2
r^2		0.9947	0.994	0.994	0.9943
m		21.783	21.841	22.076	21.919
b		14.84	14.994	14.668	14.814

Tabla 25. Datos de la regresión lineal del sistema

3.3. Repetibilidad

La precisión del sistema fue evaluada mediante 6 soluciones de cafeína a una misma concentración (1mM) y se determinó el coeficiente de variación total (% CV). Los datos de repetibilidad muestran las lecturas de corriente para las 6 réplicas, ver la *Tabla 26*.

Repetición	Concentración de estándar	Corriente (<i>i</i>) (μA)		
		Día 1	Día 2	$\bar{x}$
1	0.195 mg/mL	36.73	36.51	
2		35.76	35.91	
3		37.47	35.92	
4		35.83	35.66	
5		37.64	35.80	
6		37.07	35.60	
Promedio (<i>i</i>)		36.75	35.90	36.33
Desvest		0.81	0.32	0.74
%CV		2.19	0.90	2.02

Tabla 26. Datos de la precisión del sistema

A partir del tratamiento de los datos se encontró que en la evaluación intra e inter-día del sistema es preciso, ya que como puede observarse en la *Tabla 26*, los %CV son inferiores al 3 %, por lo tanto, son valores aceptables.

3.4. Caracterización de la muestra (Nanopartículas Lipídicas Sólidas de Cafeína)

El voltamperograma que resultó del análisis de la muestra se observa en la *Figura 15*, se aprecia un pico de oxidación que, si bien no está completamente definido, es suficiente para considerar que se trata del pico de oxidación de la cafeína, aunque la corriente a la que se encuentra no es la misma, cabe destacar que la corriente está en función de la concentración de cada muestra. En el voltamperograma se aprecia que el pico de oxidación de la cafeína que se encuentra en la muestra de NLS-Caf es en 1.31 V y alcanza una corriente máxima de 16.2 μA mientras que para el estándar de cafeína es en aproximadamente 1.33 V, con una corriente máxima de 19.8 μA , la diferencia en el potencial podría atribuirse a que la cafeína se encuentra en un sistema de encapsulamiento que podría modificar ligeramente la señal a diferencia de cuando se analiza sola.

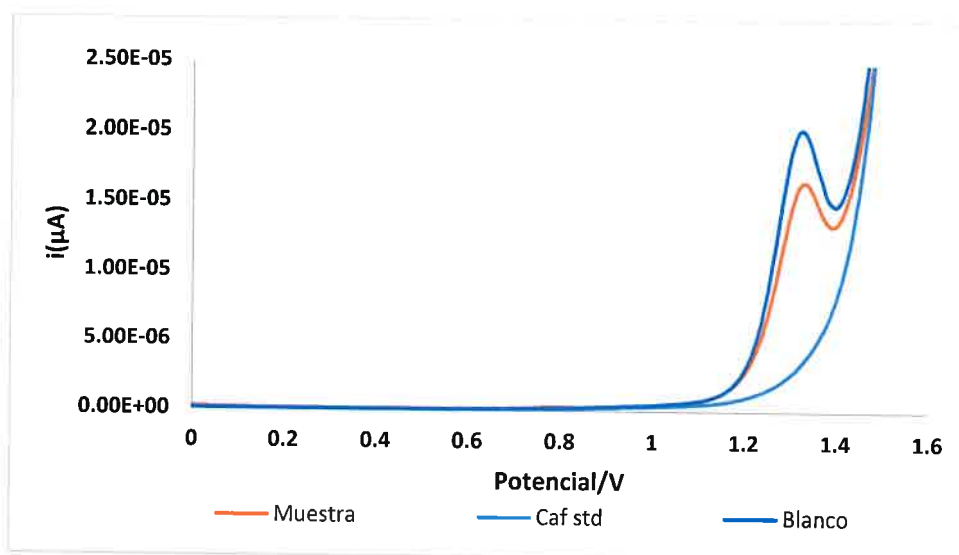
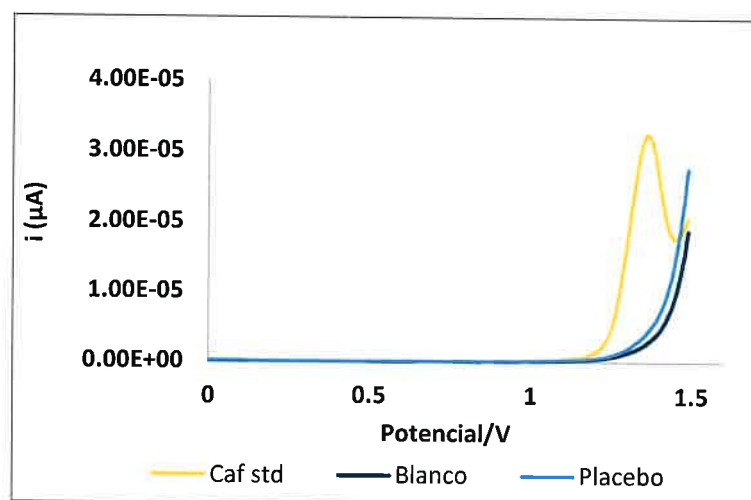
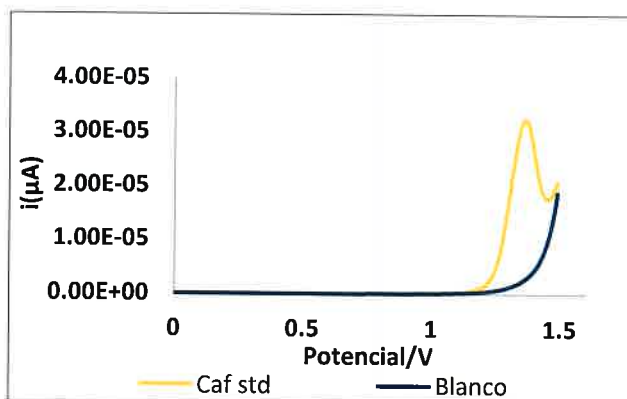


Figura 15. Voltamperograma de muestra de NLS-Caf comparado con el estándar de cafeína 0.0975 mg/mL y el blanco.

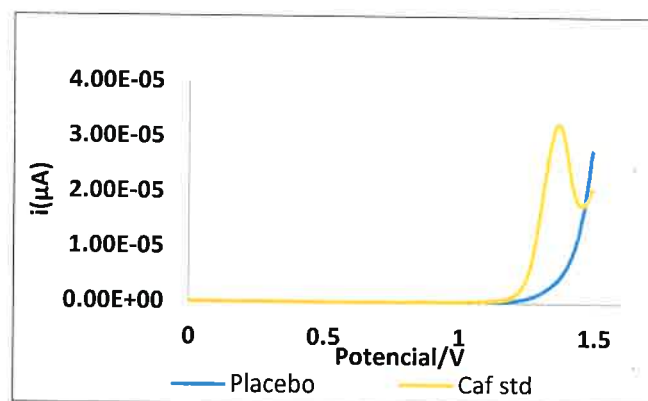
En la Figura 16, se presenta tanto la caracterización del placebo como el comportamiento que tienen los compuestos de la formulación cuando están separados de la cafeína, tanto el Tween 80 (T80) como del ácido esteárico (AE) no tienen algún pico de oxidación característico. Otra forma de analizar y comparar los resultados es mediante una formulación placebo, al analizarlo se observa que no se genera ninguna señal en el voltamperograma que pueda causar interferencia en la lectura, (Figura 16, a), por lo contrario, actúa como una especie de blanco.



(a)



(b)



(c)

Figura 16. Voltamperogramas de estándar de cafeína 0.195mg/mL en comparación con los voltamperogramas de los compuestos de la formulación y el blanco (Caf std: cafeína estándar).

En la *Figura 16 b y c*, se pueden comparar los voltamperogramas de cuando se corre el blanco (*b*) y cuando se emplea el placebo (*c*), la señal del pico de oxidación de cafeína es la misma, por lo que la mezcla que conforma el placebo (los excipientes) no presenta interferencia con la señal del activo, demostrando la especificidad del método para cafeína.

3.5. Curva de calibración del estándar de cafeína en placebo

Con el placebo (NLS-Blanco), se preparó una curva de calibración a partir de una solución stock de cafeína (0.195 $\mu\text{g/mL}$) a cinco concentraciones diferentes, como se puede observar en la *Figura 17*, se muestran los voltamperogramas correspondientes a cada concentración, los cuales van en incremento ya que, a mayor concentración, mayor corriente.

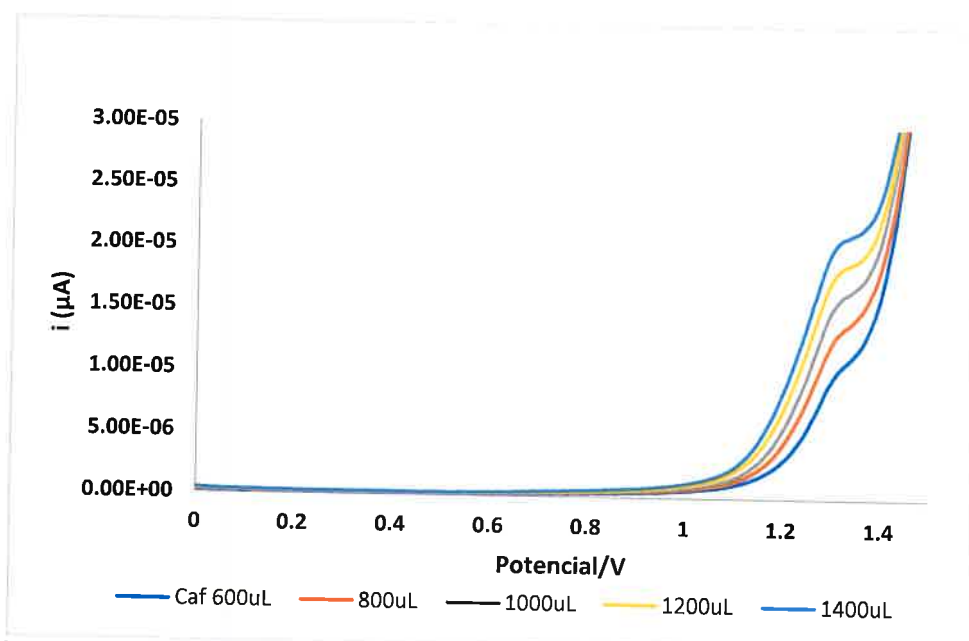


Figura 17. Voltamperogramas de la curva de calibración del estándar de cafeína (0.195 $\mu\text{g/mL}$) en placebo (NLS-Blanco).

Se prepararon tres curvas de calibración adicionales en el intervalo de concentraciones de 11.7 a 27.3 $\mu\text{g/mL}$ de una solución estándar de cafeína de 0.195 $\mu\text{g/mL}$, el medio en que fueron preparadas y analizadas fue una solución de placebo (NLS-Blanco) (ver *Tabla 27*), con las cuales se determinó la linealidad del método y se construyó el gráfico de corriente (i) contra concentración ($\mu\text{g/mL}$) que se muestra en la *Figura 18* con las mediciones electroquímicas obtenidas; con la regresión lineal se determinó que el método muestra linealidad puesto que r^2 fue mayor a 0.98, como se muestra en la *Tabla 27* ($0.9982 > 0.98$).

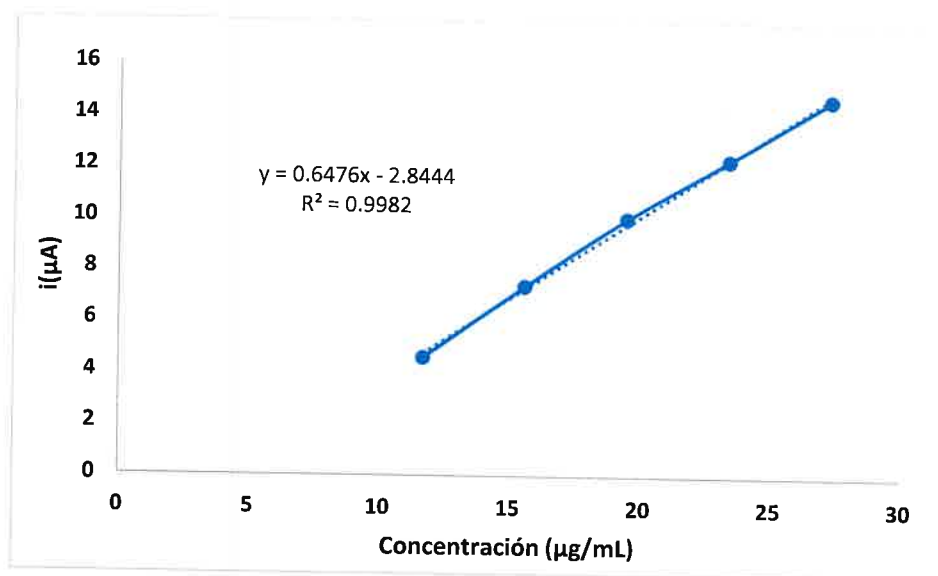


Figura 18. Curva de calibración del estándar de cafeína 0.195 mg/mL en formulación placebo (NLS: ácido esteárico + Tween 80)

# Solución	Placebo (composición)	Concentración de estándar de cafeína (µg/mL)	Corriente (i) (µA)
1	Tween 80 Ácido esteárico Agua Etanol	11.7	12.65
2		15.6	17.82
3		19.5	21.66
4		23.4	24.65
5		27.3	26.63
r²	0.9982		
m	0.6476		
b	2.8444		

Tabla 27. Datos de la regresión lineal del método

3.6. Determinación de cafeína en muestras de NLS-Caf: cafeína encapsulada

Para la determinación de cafeína en las muestras, se emplearon dos concentraciones finales del estándar, 0.0975 mg/mL y de 0.195 mg/mL, la primera se usó en las muestras de cafeína encapsulada y la segunda para muestras de cafeína libre.

En la *tabla 28* se presentan los resultados del análisis de contenido de 7 formulaciones preparadas de forma independiente como se mencionó en la metodología. Para este caso, se empleó una solución estándar de cafeína con la primera concentración mostrada.

Muestra	Peso total (mg)	Cantidad pesada (mg)	Corriente (i) (µA)	Masa adicionada (mg)	Masa recuperada (mg)	% Recobro
1	7609.8	59.2	16.1	2500	1903.60	76.14
		59.1	18.6		2202.91	88.11
		59.1	19.3		2285.81	91.43
			18		2130.77	85.23
2	7799.7	60.5	15	2500	1778.74	71.14
		60.6	15.9		1882.35	75.29
		60.6	14.3		1692.93	67.71
			15.1		1780.85	71.23
3	8524.3	66.2	16.9	2500	2121.73	84.86
		66.2	18.7		2347.72	93.90

		66.2	19.3		2423.05	96.92
			18.3		2297.50	91.90
4	7732.5	60.1	13.2	2500	1655.86	66.23
		60.0	13.4		1683.75	67.35
		60.0	13.7		1720.48	68.81
			13.4		1682.91	67.31
5	7711.4	59.8	16	2500	2011.66	80.46
		59.8	15.7		1973.95	78.95
		59.9	15		1874.97	74.99
			15.5		1947.82	77.91
6	7886.9	60.4	15.6	2500	1690.28	67.61
		60.4	17.7		1917.82	76.71
		60.5	17.9		1936.29	77.45
			17.1		1851.89	74.07
7	7405.2	57.5	12.9	2500	1595.86	63.83
		57.5	15.1		1868.03	74.72
		57.5	15.8		1954.63	78.18
			14.6		1806.17	72.24

Tabla 28. Cuantificación de cafeína encapsulada en las muestras de NLS-Caf

En la *tabla 28* se localizan las 7 muestras que se emplearon para determinar el porcentaje de cafeína encapsulada, así como el peso total de la muestra, la cantidad de muestra que se tomó y en respuesta, la corriente en μA que cada muestra arrojó, también la cantidad de cafeína agregada inicialmente y la cantidad que se recuperó según el análisis de cada una de las muestras. A partir de los cálculos correspondientes se obtuvo un rango de porcentaje de recobro del 67.31 al 91.90%, este rango se puede atribuir a que es la proporción de cafeína que se encuentra encapsulada en los sistemas portadores (NLS-Caf), mientras que el resto se encontraría de forma libre.

3.7. Determinación de cafeína en muestras de NLS-Caf: cafeína libre

En la *tabla 29* se encuentran los resultados del análisis de las muestras de NLS-caf en las que la cafeína se encontraba de manera libre, para este caso se empleó una solución estándar de cafeína de concentración 0.195 mg/mL.

Muestra	Volumen total (mL)	Masa adicionada (mg)	Masa recuperada (mg)	Corriente (i) (μ A)	% Recobro
1	19	2500	346.65	37.8	13.86
			349.40	38.1	13.97
			350.32	38.2	14.01
			348.49	38	13.94
2	20.5	2500	422.40	42.69	16.89
			419.44	42.39	16.77
			420.43	42.49	16.81
			420.52	42.5	16.82
3	18	2500	295.38	34	11.81
			295.38	34	11.81
			296.26	34.1	11.85
			295.38	34	11.82
4	18.4	2500	342.38	37.2	13.69
			369.40	38.3	14.77
			363.62	37.7	14.54
			358.80	37.2	14.35
5	17.5	2500	437.57	47.7	17.50
			466.00	50.8	18.64
			363.26	39.6	14.53
			422.89	46.1	16.91
6	19	2500	437.03	43.88	17.48
			436.13	43.79	17.44
			468.70	47.06	18.74
			447.28	44.91	17.89
7	29	2500	826.32	47.49	33.05
			737.76	42.4	29.51
			708.18	40.7	28.31
			760.38	43.7	30.41

Tabla 29. Cuantificación de cafeína libre en las muestras de NLS-Caf

En la tabla anterior, se encuentran las 7 muestras en las que se determinó la cafeína libre, el volumen total de la muestra, así como la cantidad total de cafeína que fue agregada y lo que se recuperó al final. La cuantificación de cafeína para estas muestras arrojó un rango de porcentaje de recobro entre el 11.82 y el 30.41%, lo que significa que esa porción de cafeína se encuentra de manera libre en las muestras.

Una vez que se analizaron de manera independiente las muestras que contenían cafeína encapsulada y cafeína libre, se calculó el porcentaje total de cafeína, como se resume en la *tabla 30*.

Muestra	Réplica	% Recobro		
		Encapsulado	Libre	Total
1	1	76.14	13.86	90.00
	2	88.11	13.97	102.08
	3	91.43	14.01	105.44
	$\bar{x}$	85.23	13.94	99.17
2	1	71.14	16.89	88.03
	2	75.29	16.77	92.06
	3	67.71	16.81	84.52
	$\bar{x}$	71.23	16.82	88.05
3	1	84.86	11.81	96.67
	2	93.90	11.81	105.71
	3	96.92	11.85	108.77
	$\bar{x}$	91.90	11.82	103.72
4	1	66.23	13.69	79.92
	2	67.35	14.77	82.12
	3	68.81	14.54	83.35
	$\bar{x}$	67.31	14.35	81.66
5	1	80.46	17.50	97.96
	2	78.95	18.64	97.59
	3	74.99	14.53	89.52
	$\bar{x}$	77.91	16.91	94.82
6	1	67.61	17.48	85.09
	2	76.71	17.44	94.15

	3	77.45	18.74	96.19
	$\bar{x}$	74.07	17.89	91.96
7	1	63.83	33.05	96.88
	2	74.72	29.51	104.23
	3	78.18	28.31	106.49
	$\bar{x}$	72.24	30.41	102.65

Tabla 30. Porcentaje total del recobro de cafeína en las muestras analizadas

Los porcentajes de recobro de las muestras, se encuentran en un rango entre 81.66 y 103.72% como puede apreciarse en la tabla anterior, sin embargo al calcular el intervalo de confianza con una significancia del 95%, este resultó estar entre el 88.31 y el 100.82%, por lo que en este rango estaría el total de cafeína y lo que resta si bien podría ser cantidad perdida que quedó en residuos del proceso de elaboración de las NLS-Caf que incluyen desde el pesaje de las materias primas, la manipulación de los compuestos una vez pesados, el empleo de materiales y demás equipos que tuvieron contacto directo en el proceso, así como también durante el tratamiento de la muestra. Este rango considera una cantidad razonable que pudo perderse, de tal manera que no existe una pérdida importante, sin embargo, se tendría que tener mayor cuidado en la preparación y en el análisis para que el método sea repetible y reproducible.

Capítulo 5 Evaluación fisicoquímica de una formulación semisólida con Nanopartículas Lipídicas Sólidas cargadas con cafeína (NLS-Caf)

Una vez obtenidas las Nanopartículas Lipídicas Sólidas cargadas con Cafeína (NLS-Caf), estas fueron incorporadas en una crema de aplicación dérmica. Con el propósito de evaluar las características y calidad de la formulación obtenida, en este capítulo se describen las determinaciones fisicoquímicas, como el aspecto, tamaño de partícula, viscosidad, extensibilidad, pH, homogeneidad, contenido de humedad y estabilidad frente a cambios de temperatura.

Los resultados obtenidos en estas evaluaciones permitieron determinar si la formulación presentaba las características necesarias para continuar con su aplicación. Una vez que la crema cumplió con los parámetros establecidos, se procedió a evaluar su desempeño mediante su aplicación en un voluntario experimental, siguiendo un régimen de tratamiento previamente establecido y registrando los cambios observados durante el periodo de aplicación.

Al finalizar el tratamiento, se observó una mejora en el aspecto de la piel y una disminución en el tamaño de las estrías. Estos resultados permitieron valorar de manera preliminar el comportamiento de la formulación semisólida elaborada con NLS-Caf y su posible aplicación en el tratamiento en este tipo de afecciones de la piel.

1. Material y equipos

Material	Equipo	Reactivos
Vasos de precipitado de 50 y 25 mL	Balanza analítica Shimadzu AUX120	Soluciones Buffer (pH 7.0, 4.0 y 10.0)
Matraces aforados de 50 mL	Analizador de tamaño de partícula Horiba LA-950V2	Agua desmineralizada
Placas de cristal 20 x 20 cm	Viscosímetro Brookfield digital DV-II	Ácido esteárico
Marco de pesas	Potenciómetro Conductronic pH 120	Alcohol cetílico
Tubos Falcon 50 mL	Centrífuga Solbat	Aceite de caléndula
Termómetro	Corneómetro CM-825	Aceite de mandarina
Tubos de ensayo	Mufla 30-X-PP1	Extracto de manzanilla
	Estufa INFIS	Vaselina líquida
	Refrigerador	Aceite mineral
		Glicerina

Tabla 31. Material y equipos

2. Metodología

2.1. Evaluar la crema base (ver *tabla 32*) en la que adicionaron las NLS-Caf.

2.2. Identificar su absorción.

Compuesto	Porcentaje	Cantidad
Ácido esteárico	8%	1.5 g
Alcohol cetílico	10%	2.5 g
Aceite de caléndula	5%	1.25 g
Aceite de mandarina	5%	1.25 g
Extracto de manzanilla	5%	1.25 g
Vaselina líquida	5%	1.25 g
Aceite mineral	5%	1.25 g
Glicerina	5%	1.25 g
Agua desmineralizada c.b.p	c.b.p.	50 mL

Tabla 32. Formulación de la crema base

Se considera producto terminado, a la crema base fusionada con las NLS-Caf y los parámetros considerados para su caracterización fisicoquímica se muestran a continuación.

2.3. Aspecto

- Realizar la observación física de las cremas de NLS-Caf para describir su aspecto físico (color, olor y textura).

2.4. Tamaño de partícula

2.4.1. Muestra:

- Preparar una solución al 2 % de las NLS-Caf recién preparadas. Agregar 1 mL de muestra a un matraz de 50 mL y llevar a volumen con agua destilada.

2.4.2. Procedimiento:

- Realizar la lectura del blanco (agua destilada).
- Agitar vigorosamente la muestra preparada, agregarla a la celda y colocar la barra de agitación.
- Realizar la lectura en el Particle Size Distribution Analyzer LA-950 V2, Horiba.
- Nota: agregar el blanco o la muestra cuidando que no haya formación de burbujas, ni que la celda se encuentre sucia.

2.5. Viscosidad

2.5.1. Muestra:

- Colocar la dispersión en un frasco largo.

2.5.2. Procedimiento:

- Seleccionar las condiciones a las que se efectuara la lectura (aguja no. 14, a 5 rpm)
- Introducir la aguja en la muestra de manera inclinada, cuidado que no se formen burbujas en el interior de la muestra.
- Colocar en el husillo, girar la aguja en sentido contrario de las manecillas del reloj.
- Efectuar la lectura.
- Realizar la determinación por triplicado.

2.6. Extensibilidad

2.6.1. Muestra:

- Pesar 1.0 g de muestra.

2.6.2. Procedimiento:

- Colocar la placa inferior sobre la hoja milimétrica (con dos diagonales trazadas).
- Agregar la muestra en el centro donde las líneas se interceptan.
- Colocar la placa superior, transcurrido 1 minuto, medir el diámetro formado. Colocar la pesa de 20 g sobre la placa, esperar 1 minuto y registrar.
- Repetir el proceso con las pesas de 50, 100 y 200 g.
- Realizar la determinación por triplicado.

2.7. pH

2.7.1. Muestra:

- Tomar 4.0 g (2 %) y disolver en 20 mL de agua desmineralizada.

2.7.2. Procedimiento:

- Calibrar el equipo, con soluciones buffer pH 7.0, 4.0 y 10.0.
- Efectuar la determinación a $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

- Lavar el electrodo y recipiente varias veces con agua, dejar que escurra el agua y secar con papel absorbente.
- Enjuagar el electrodo y el recipiente con la solución de prueba (muestra).
- Llenar el recipiente con esta solución y efectuar la determinación de pH.
- Realizar por triplicado.

2.8. Homogeneidad

2.8.1. Muestra:

- Pesar 10 g de muestra y agregar a tubos Falcon.

2.8.2. Procedimiento:

- Colocar los tubos Falcon con la muestra en la centrífuga.
- Configurar la centrífuga para su operación de 3,000 rpm durante 30 minutos.

2.9. Humedad

2.9.1. Muestra:

- Pesar 0.5 g de muestra.

2.9.2. Procedimiento:

- Acondicionar el ambiente (18°C, a 55% HR).
- Colocar 0.5 g de muestra en el área seccionada de piel (antebrazo), extender en el espacio determinado, dejar absorber.
- Registrar la lectura inicial (tiempo 0), después tomar las muestras en un intervalo de 5 minutos. La lectura se toma en 6 puntos diferentes de la sección a muestrear.

2.10. Estabilidad frente a los cambios bruscos de temperatura

2.10.1. Muestra:

- Pesar 10 g de muestra de cada formulación.
- Adicionar la muestra en tubos de ensayo, compactar la crema y cubrir los tubos con aluminio.

2.10.2. Procedimiento:

- Colocar los tubos en el refrigerador durante 24 h (5 a 8 °C)
- Colocar los tubos en la estufa durante 24 h (28 a 37°C)
- Alternar los ciclos y registrar las observaciones.

2.11. Aplicación tópica de la crema en sujeto experimental

2.11.1. Procedimiento:

- Definir la zona del cuerpo con presencia visible de estrías.
- Limpiar la zona, secarla y aplicar una capa fina de la crema
- Aplicar diariamente en la misma zona durante 2 meses.
- Tomar una fotografía como evidencia semanal.

3. Resultados

Las NLS-Caf se agregaron a la formulación base sin que hubiera alguna incompatibilidad entre los excipientes, para corroborar la homogeneidad y funcionalidad de la mezcla se recurrió a distintas determinaciones, lo que se obtuvo fue lo siguiente.

3.1.1. Aspecto de formulaciones óptimas adicionadas en crema base

El aspecto físico de las formulaciones óptimas de las NLS-Caf al ser agregadas en la crema base se describe en la *tabla 33*, como puede notarse, ambas son agradables en cuanto aroma, el color tiene una ligera diferencia, ambas son suaves pero la de la formulación 1 es más ligera que la de la 2.

Formulación 1	Aspecto agradable en cuanto al color, el tono es amarillo claro, es brillante, la textura es ligera y suave, no es granulosa ni pegajosa; el olor es agradable, ligeramente a notas de mandarina, con ausencia de partículas extrañas.
Formulación 2	El tono que presenta tiende a un amarillo ligeramente oscuro, ligeramente opaca; se percibe un poco espesa pero suave y el aroma es agradable con notas de mandarina, no es granulosa ni pegajosa, con ausencia de partículas extrañas.

Tabla 33. Aspecto de las cremas a base de las formulaciones 1 y 2 de NLS-Caf

Esoje y sus colaboradores sugirieron que esta prueba se realizara aleatoriamente, a diferentes temperaturas y tiempos de almacenamiento para observar cualquier cambio. Sin embargo, en este caso particular no se observaron cambios físicos al variar dichas condiciones.

3.1.2. Determinación de tamaño de partícula

El tamaño de partícula está directamente relacionado con la disolución de las partículas del fármaco. Idealmente, es deseable formular con una tasa de disolución de fármacos particulados mayor que el flujo de transporte a través del estrato córneo. Esto asegura una concentración constante cercana a la saturación en la formulación. Por lo tanto, el tamaño de partícula impacta la absorción percutánea, ya que las partículas pequeñas (nanopartículas) necesitan encajar en el espacio entre los corneocitos y migrar a lo largo de la brecha (Jin, *et al.*, 2022).

El tamaño de partícula se muestra en la *tabla 34*, donde se colocaron las lecturas de las muestras en el rango de micrómetros, tal y como el equipo arroja las lecturas, también se colocaron las lecturas promediadas, como se puede ver, ambas formulaciones tienen tamaños de partícula pequeños, por lo que se conserva el tamaño que se determinó a las NLS-Caf óptimas de manera individual, sin embargo, se nota un incremento debido a las nuevas características de la muestra, ya que al incorporarse otros excipientes pueden interferir en la forma en que se aglomeran las NLS-Caf, a pesar de ello, la formulación 2 tiene menores tamaños que en la formulación 1. Los tamaños van desde 2.462 a 8.786 μm .

El cambio en la distribución del tamaño de partícula en productos tópicos puede deberse a la agregación de partículas, la separación de fases de las emulsiones y el polimorfismo puede alterar potencialmente la biodisponibilidad. Además, la velocidad de disolución, un factor determinante en semisólidos con principios activos en suspensión se altera significativamente para partículas de diferentes tamaños (Jin, *et al.*, 2022).

Muestra	Tamaño de partícula medio (μm)			Lectura promedio
	1	2	3	
Formulación óptima 1	5.88974	5.98984	5.86059	5.913
	8.15588	8.19542	7.99747	8.116
	8.03316	6.77769	7.57601	7.462
Formulación óptima 2	5.47627	4.64068	4.65898	4.925
	2.44202	2.49315	2.45148	2.462
	8.49869	9.28104	8.57733	8.786

Tabla 34. Tamaños de partícula de las NLS-Caf incorporadas a las cremas base.

La eficacia de la penetración en la piel depende del tamaño de las partículas porque afecta las vías de penetración (es decir, las vías transcelulares, intercelular y transapendágica) de

partículas más pequeñas. Para las vías transapendágicas, las partículas pequeñas del fármaco pasan el estrato córneo a través de los folículos pilosos y, para las vías transcelulares, el fármaco disuelto penetra directamente a través de los corneocitos, mientras que la penetración intercelular implica el movimiento de las moléculas del fármaco a lo largo de los lípidos ubicados en los espacios intercelulares de los corneocitos (Jin, *et al.*, 2022). En otra investigación, *Sirirak* informó la vía transapendágica como la ruta predominante para la penetración en la piel de la microemulsión cargada con celecoxib, con tamaños de partícula que varían de 48 a 214 nm. La penetración puede ser facilitada por partículas con coeficientes de partición más altos (log P) debido a su mayor solubilidad en el estrato córneo, que es una barrera cutánea lipofílica (Jin, *et al.*, 2022).

El tamaño de partícula y el tamaño de glóbulo son importantes para los productos farmacéuticos tópicos, especialmente para aquellas formulaciones con principios activos suspendidos en formas farmacéuticas semisólidas. El área superficial en contacto con la piel aumenta con la disminución del tamaño del glóbulo en las emulsiones, lo que resulta en una mayor adsorción del fármaco. *Patel et al.*, encontraron una mayor permeación del fármaco en microemulsiones con tamaños de glóbulo más pequeños, lo que conduce a una mayor concentración del fármaco en el tejido subcutáneo y una administración más eficiente del fármaco (Jin, *et al.*, 2022)

3.1.3. Viscosidad

La viscosidad es uno de los parámetros más críticos y se considera un factor de calidad de la aplicación para el desarrollo de diversos productos tópicos. La incapacidad de alcanzar el índice de viscosidad adecuado y deseado durante el desarrollo de la formulación puede provocar fallos en el fármaco en condiciones de uso (Jin, *et al.*, 2022).

Las lecturas de la viscosidad de las formulaciones 1 y 2 se encuentra en la *tabla 35*, la formulación 1 tuvo menor viscosidad (35, 467 cPs) respecto a la formulación 2 (73, 089 cPs), por lo tanto, es menos espesa y podría extenderse mejor al momento de aplicarse; por otra parte, el %CV de la formulación 1 también es menor respecto al de la formulación 2, lo que significa que hubo menor variación en las lecturas obtenidas.

	Formulación 1			Formulación 2		
Muestra/Replica	1	2	3	1	2	3
1	35	36	38	70	77.6	75
2	36	34.2	36	70	76.2	75
3	34	35	35	74	70	70
Promedio	35.0	35.1	36.3	71.3	74.6	73.3
Lectura final (cPs)	35,000	35,067	36,333	71,333	74,600	73,333
Promedio (cPs)	35,467			73,089		
%CV	2.118			2.253		

Tabla 35. Promedio de la viscosidad de las cremas base adicionadas con las NLS-Caf

En una investigación desarrollada por *Chandrasekar* y sus colaboradores., la viscosidad de la crema se situó entre 50,910 y 40,900 cPs, lo que indica que se extiende fácilmente con un ligero esfuerzo cortante, por lo que en el caso de esta investigación tanto la formulación 1 y 2 están entre 35, 467 cPs y 73,089 cPs respectivamente, tendrían un comportamiento semejante. La viscosidad se utiliza para evaluar la estabilidad de la formulación en cuanto a consistencia y, en consecuencia, para predecir el comportamiento de la sustancia con el tiempo. Un aumento de la viscosidad durante el almacenamiento indica emulsiones cinéticamente inestables, en las que las gotas que se mueven libremente colisionan y parecen fusionarse (*Mawazi, et al., 2022*)

En un estudio realizado por *Binder* e investigadores, sus resultados demostraron una disminución significativa en la tasa de liberación, la tasa de penetración y la profundidad, con un aumento en la viscosidad, lo que sugiere un efecto retardante en la penetración del fármaco.

Mawazi y sus colaboradores, indican que la viscosidad de los productos tópicos semisólidos aumentó con la evaporación de los disolventes volátiles, lo que resultó en una microestructura más compacta en la interfaz piel-formulación. Por lo tanto, la velocidad de liberación de los principios activos de la formulación se redujo significativamente, lo que indica una menor permeabilidad del producto y una eficacia terapéutica general.

3.1.4. Extensibilidad

El estudio del área de extensibilidad proporciona una medida del umbral de deformación del sistema y guarda una estrecha relación con la apariencia de formulaciones semisólidas (Pérez-Bueno, *et al.*, 2011).

Los diámetros que se formaron con la prueba de extensibilidad para la formulación 1 se adjuntaron en la *tabla 36*, como se puede observar al ir incrementando peso sobre las placas el diámetro incremento proporcionalmente, entre cada muestra fue semejante este incremento, las circunferencias formadas aumentaron de 7.2 a 8.4 cm de diámetro.

Muestra	Placa	Pesas (g)			
		20	50	100	200
	Diámetro (cm)				
1	6.3	6.5	6.7	6.9	7.1
2	6.9	6.9	7.2	7.9	8.2
3	8.3	8.7	9.2	9.5	9.9
Promedio	7.2	7.4	7.7	8.1	8.4

Tabla 36. Promedios de los diámetros formados en la extensibilidad de la formulación 1.

Para la formulación 2, los valores se encuentran en la *tabla 37*, el incremento del diámetro es proporcional al incremento del peso, los diámetros formados van de 6.6 hasta 8.2 cm.

La extensibilidad de la formulación 1 y 2 es semejante, la diferencia (0.2 cm) es pequeña, aun así, la formulación 1, puede esparcirse poco más que la 2, corroborando que al ser menos viscosa como se discutió en la sección anterior, le permite una fácil aplicación al aplicarse en la piel, de tal manera que abarcará mayor área superficial de contacto empleando poca cantidad, a diferencia de una formulación más viscosa, ya que se requeriría mayor cantidad.

Muestra	Placa	Pesas (g)			
		20	50	100	200
	Diámetro (cm)				
1	5.2	5.5	5.7	5.9	6.1
2	5.9	6.3	6.7	6.9	7.2
3	8.9	10.1	10.4	10.9	11.4
Promedio	6.6	7.3	7.6	7.9	8.2

Tabla 37. Promedios de los diámetros formados en la extensibilidad de la formulación 2.

Dado que la esparcibilidad de las formulaciones semisólidas es una consecuencia del comportamiento viscoelástico, la reología es un método adecuado y válido para la caracterización. Esta pseudoplasticidad es deseable ya que mejora la aplicación a través de un efecto deslizante y crea una sensación agradable (Schoenfelder, *et al.*, 2025).

3.1.5. pH

El pH de las formulaciones 1 y 2 se localiza en la *tabla 38*, por una parte, la formulación 1 promedia un pH de 4.3, mientras que la formulación 2 un pH de 5.4; ambos son pH de carácter ácido, lo cual es conveniente, ya que diversos estudios indican que los productos tópicos deben acidificarse y poseer valores de pH en el rango de 4 a 6 (Lukić, *et al.*, 2021). Mawazi y sus colaboradores comentan en su estudio que el pH de una preparación tópica debe estar entre 4,5 y 6,5, que corresponde al pH de la piel. El pH no debe ser demasiado ácido, ya que puede irritar la piel, ni demasiado alcalino.

	Formulación 1	Formulación 2
Muestra	pH	
1	4.21	5.39
2	4.44	5.32
3	4.25	5.49
4	4.34	5.47
Promedio	4.3	5.4

Tabla 38. Promedios del pH de las formulaciones 1 y 2.

3.1.6. Homogeneidad

Se lleva a cabo para evaluar la estabilidad química y física de la formulación bajo la influencia de la fuerza centrífuga (Mawazi, *et al.*, 2022). Se examinó la formulación para la separación de fases después del proceso de centrifugación, que es un indicador de la inestabilidad de la formulación.

Al desarrollar la prueba para ver la homogeneidad de las cremas, mediante centrifugación, no se observó que las fases que componen a la crema se hubieran separado, de tal modo que se observaron homogéneas, tal y como se encontraban al inicio de la prueba. Por lo que estos resultados indican estabilidad de las emulsiones. En la *tabla 39* se colocaron las figuras en las que no se aprecia ningún cambio en las muestras analizadas.

Mientras tanto, *Fernandes* y sus colaboradores evaluaron la separación de fases, lo cual se denota por la presencia de apelmazamiento, coalescencia y floculación, características ausentes en las formulaciones de esta investigación.

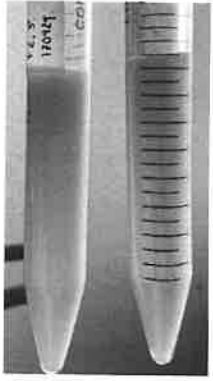
Formulación	Muestra	Observación	
F1	1	Es homogénea, no hay separación de fases.	
	2	Es homogénea, no hay separación de fases.	
F2	1	Es homogénea, no hay separación de fases.	
	2	Es homogénea, no hay separación de fases.	

Tabla 39. Prueba de homogeneidad de las formulaciones 1 y 2.

3.1.7. Humedad

Se midió la capacitancia eléctrica de las dos formulaciones con la ayuda del Corneómetro CM-825. Las lecturas del grado de hidratación de la piel de la formulación 1 y 2, están dadas en unidades arbitrarias (UA) y se encuentran en la *tabla 40*; los valores del grado de hidratación de la piel en la zona media de la cara anterior del antebrazo son las siguientes: menos de 30 UA: muy seca; entre 30 y 45 UA: seca; y 45 UA: suficientemente hidratada (Constantin, *et al.*, 2014).

Muestra/Tiempo (min)	Formulación 1				Formulación 2			
	UA							
	1	2	3	4	1	2	3	4
0	38.8	36.5	43.8	34.6	39.9	39	43	39
60	48	54.8	46.7	46.9	44.6	57.4	49.8	42.6
70	49	59.5	45.4	46.8	48.4	45.6	44.5	41.7
80	56	49.5	45.2	46.6	43.6	45.9	43.9	47.7
90	46	48.3	45.3	45.2	40.4	56.7	48.3	46.8
100	46	43.5	45.1	44.9	44.6	57.4	49.8	42.6
120	41	43.1	44.1	42.9	40.6	42	44	45.1
Promedio	46.4	47.9	45.1	44.0	42.6	49.0	46.0	44.0
Promedio final	45.8				45.4			

Tabla 40. Promedios de la prueba de humedad para la crema de la formulación 1 y 2.

(UA: Unidades Arbitrarias)

El tiempo 0 indica la lectura del blanco, las posteriores lecturas son del área donde se aplicó la muestra. Como se indica en la tabla para la formulación 1, transcurrida 1 hora de la aplicación de la muestra, el área se encontró suficientemente hidratada (48-54.8 UA), continuó en esta condición durante los 30 minutos posteriores, a la 1 h 40 min, el área se encontró seca (44.8 UA en promedio). En el caso de la formulación 2, el comportamiento es semejante, a la 1h 20 min, la piel estuvo suficientemente hidratada (47-48 UA en promedio), después de ese tiempo, los valores rondan entre 40.4 y 57,4, es decir, entre una superficie suficientemente hidratada y seca. En promedio, la formulación 1 mostró que dejó más hidratada la zona de aplicación de la muestra en comparación de la 2 (45.8 UA y 45.4 UA, respectivamente), sin embargo, esta diferencia no es significativa, así que ambas cremas se comportaron semejante, ambas hidrataron el estrato córneo, posteriormente, en los últimos minutos de muestreo el área ya se encontraba seca, puesto que la presencia de agua comenzó a disminuir y las propiedades eléctricas de la piel dependen del contenido de agua del estrato córneo de la epidermis (Constantin, *et al.*, 2014), por lo que podría deberse a que ya se habían absorbido las cremas pasada la 1 h 30 min desde la aplicación. Cuando se aplican tópicamente las NLS, forman una película oclusiva que mejora la permeación cutánea y facilita la retención del fármaco en las capas cutáneas objetivo, aumentando así la eficacia terapéutica (AL-Smadi, *et al.*, 2025).

3.1.8. Ciclado térmico

Las cremas fueron expuestas a cambios de temperatura, en la *tabla 41* se registraron las condiciones del ciclo a las que se expusieron las muestras de crema, el ciclo inició con bajas temperaturas (7.1°C) y se fue alternando con altas (28.6°C-37.2°C) y bajas temperaturas (5.1°C-8.4°C), como puede observarse, a lo largo del ciclo no se observó algún cambio físico evidente que mostrara inestabilidad por los cambios bruscos de temperatura, por lo que ambas cremas fueron estables a dichos cambios y por lo tanto son estables frente a temperaturas de entre 5.1°C a 37.2°C, aunque se recomienda su almacenamiento en lugares frescos para prolongar su vida útil.

Día	Lugar	Horas	Temperatura	Observación
Lunes	Refrigerador	24h	7.1 °C	Inicio de prueba
Martes	Estufa	24h	37.2 °C	No se observa separación de fases.
Miércoles	Refrigerador	24h	8.4 °C	No se observaron cambios físicos, ambas formulaciones se encuentran semisólidas.
Jueves	Estufa	24h	28.6°C	No se muestra algún cambio, hasta este punto son estales.
Viernes	Refrigerador	24h	5.1°C	Las muestras se muestran igual.
Sáb-Dom	Refrigerador	24h +12h		
Lunes	Estufa	36h	29.4°C	No se observan aparentes cambios físicos.
Martes	Estufa		27.3°C	
Miércoles	Refrigerador	24h	5.6 °C	No se observan cambios físicos en el aspecto de las cremas.
Jueves	Estufa	24h	31.5	No se observan cambios en el aspecto de las muestras aún transcurridas más horas de las previstas.

Tabla 41. Ciclado térmico determinado en la formulación 1 y 2.

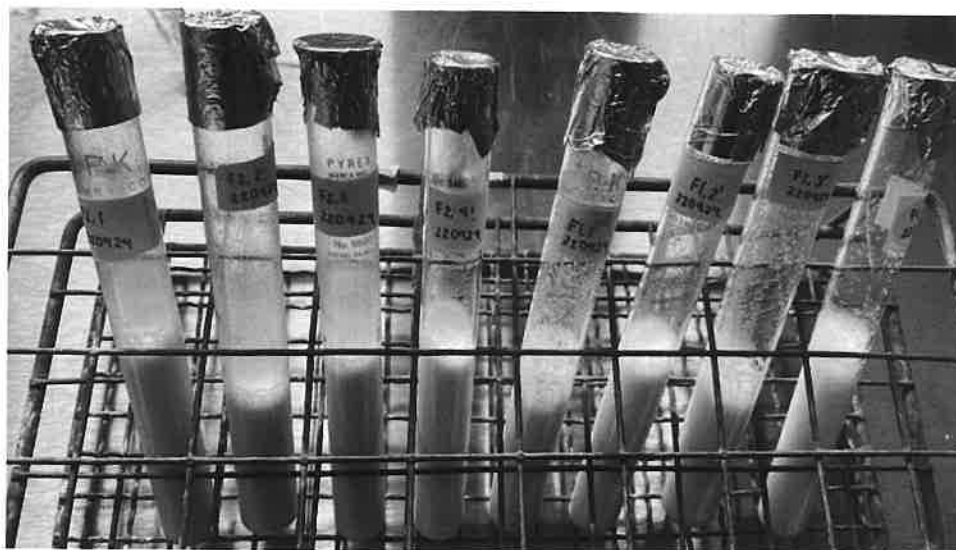


Figura 19. Muestras finales del ciclado térmico de las cremas con la formulación 1 (derecha) y con la formulación 2 (izquierda).

3.1.9. Seguimiento de aplicación tópica de NLS-Caf incorporadas en la crema base

Una vez que las cremas fueron evaluadas fisicoquímicamente, se eligió la formulación 1 por tener mejores características que la formulación 2 para ser aplicada en un sujeto experimental voluntario, el tratamiento se registró semanalmente y se adjuntó la evidencia. Los criterios de inclusión fueron: personas mayores de 18 años, participantes de sexo femenino preferentemente y/o masculino con presencia visible de estrías cutáneas; presencia de estrías localizadas en abdomen, muslos, glúteos, caderas o brazos; estrías de tipo *striae distensae* en fase rubra y/o alba. Participantes dispuestos a aplicar la crema conforme al protocolo establecido; participantes que acepten firmar el consentimiento informado (ver *anexo 1*). Personas sin tratamiento tópico o dermatológico activo para estrías durante el periodo del estudio. Participantes con disponibilidad para asistir a las evaluaciones programadas en caso de ser necesarias.

Los criterios de exclusión fueron: personas menores de 18 años, embarazo o en periodo de lactancia, antecedentes de hipersensibilidad a alergia a algún componente de la formulación, presencia de enfermedades dermatológicas activas en la zona de aplicación (dermatitis, psoriasis, infecciones cutáneas, heridas o quemaduras), uso activo de tratamientos tópicos, cosméticos o farmacológicos dirigidos al manejo de estrías durante el estudio, personas con enfermedades sistémicas que puedan interferir con la evaluación clínica, participantes que no cumplan con la aplicación adecuada del producto o con el seguimiento establecido.

Como puede observarse en la *tabla 42*, se delimitó la zona de las estrías en la evidencia, al inicio del tratamiento (semana 1) las estrías se perciben marcadas, pero de tamaño pequeño, para la semana 4 y 5, se han atenuado ligeramente, lo cual se continúa observando para las semanas 6-8 y finalmente al concluir el tratamiento en la semana 9 se aprecia un desvanecimiento parcial de dichas estrías. Este análisis de aplicación fue en un tiempo corto y en un solo participante, donde se pudo observar cambios visuales preliminares con posible actividad cosmética, lo que quiere decir que se observaron cambios visibles en la apariencia de las estrías y de la piel (disminuyó la coloración y menor apariencia de las estrías), sin embargo estos resultados son todavía exploratorios y no permiten afirmar una eficacia definitiva, debido al estudio (no fue un análisis estadístico robusto y aún faltan pruebas clínicas), por lo que sería necesario extender este análisis para poder tener resultados confiables.

Fecha	Semana	Evidencia
05/Abril/2024	1	
12/Abril/2024	2	
19/Abril/2024	3	
26/Abril/2024	4	
03/Mayo/2024	5	

10/Mayo/2024	6	
17/Mayo/2024	7	
24/Mayo/2024	8	
31/Mayo/2024	9	

Tabla 42. Seguimiento de la aplicación de la crema con NLS-Caf en sujeto experimental.

De manera general, las formulaciones 1 y 2, ambas incorporadas con Nanopartículas Lipídicas Sólidas cargadas con cafeína, presentaron un comportamiento fisicoquímico similar, en concordancia con los resultados obtenidos y discutidos previamente. En términos de apariencia y propiedades sensoriales, ambas formulaciones mostraron textura agradable al tacto y adecuada para su aplicación tópica. No obstante, la formulación 1 presentó una consistencia mayormente ligera en comparación con la formulación 2, aunque ambas proporcionaron una sensación favorable sobre la piel.

Respecto al tamaño de partícula, la formulación 2 presentó un valor promedio menor ($2\text{ }\mu\text{m}$) en comparación con la formulación 1 ($5\text{ }\mu\text{m}$). Por otra parte, la viscosidad de la formulación 1 fue de 35, 467 cPs, mientras que la formulación 2 alcanzó un valor de 73.089 cPs. Esta diferencia se reflejó en una menor consistencia y espesor de la formulación 1. Sin embargo, ambas formulaciones se mantuvieron dentro del intervalo de viscosidad considerado adecuado para sistemas de aplicación tópica, parámetro que resulta fundamental debido a su influencia sobre la estabilidad, facilidad de aplicación y permanencia del producto sobre la piel.

En relación con la extensibilidad, esta propiedad mostró una dependencia directa de la viscosidad. En consecuencia, la formulación 1, al presentar una menor viscosidad, exhibió una mayor capacidad de esparcimiento. A pesar de ello, la formulación 2 también mostró una adecuada extensibilidad, sin diferencias sustanciales que comprometieran su aplicación tópica.

Los valores de pH obtenidos fueron 4.3 para la formulación 1 y de 5.4 para la formulación 2, encontrándose ambos dentro del rango fisiológicamente compatible con la piel. Asimismo, las dos formulaciones presentaron una distribución homogénea de sus componentes, sin evidencia de separación de fases, lo que indica una adecuada estabilidad física y química.

En cuanto a la capacidad hidratante, la formulación 1 produjo un incremento ligeramente superior en la humedad de la piel respecto a la formulación 2; sin embargo, la diferencia observada no fue significativa. Adicionalmente, ambas formulaciones demostraron estabilidad frente a las condiciones de temperatura evaluadas, comprendidas entre 5.1°C y 37.2°C . Aun así, se recomienda su almacenamiento en un lugar fresco y a temperatura ambiente con el fin de preservar sus propiedades y prolongar su vida útil.

Considerando en conjunto los parámetros fisicoquímicos evaluados, ambas formulaciones cumplieron con los criterios establecidos para su aplicación tópica. Sin embargo, la formulación 1 presentó ventajas moderadas asociadas principalmente a su menor viscosidad, mayor extensibilidad y ligeramente con mayor capacidad hidratante, características que la posicionan como alternativa más favorable para su aplicación sobre la piel.

Conclusión

En esta investigación, las materias primas fueron evaluadas conforme a especificaciones farmacopeicas, cumpliendo satisfactoriamente con los criterios de calidad requeridos para su empleo en el desarrollo de las formulaciones. Las Nanopartículas Lipídicas Sólidas cargadas con cafeína (NLS-Caf) se obtuvieron mediante homogeneización en caliente. A partir de los resultados iniciales de tamaño de partícula, se implementó un diseño de experimentos considerando como factores las concentraciones de lípido y surfactante. El análisis estadístico indicó concentraciones óptimas de 6 y 12 % respectivamente, para ambas formulaciones. Aunque la formulación 1 presentó una respuesta estadísticamente favorable, las diferencias observadas no justificaron descartar la formulación 2, por lo que ambas continuaron en evaluación.

La caracterización fisicoquímica de las NLS-Caf reveló que la formulación 1 presentó un desempeño superior, evidenciado por una distribución de tamaño uniforme, menor tamaño de partícula, pH adecuado y menor viscosidad, características asociadas con una mayor estabilidad del sistema. Asimismo, la cuantificación de cafeína mediante voltamperometría diferencial de pulso permitió determinar eficiencias de encapsulación entre el 80 y 90 %, confirmando la incorporación mayoritaria del principio activo dentro de la matriz lipídica sólida.

Posteriormente, las NLS-Caf se incorporaron exitosamente en una crema cosmética base sin evidencias de incompatibilidades entre componentes. Las formulaciones obtenidas cumplieron con las especificaciones farmacopeicas y no farmacopeicas evaluadas, incluyendo aspecto, tamaño de partícula, viscosidad, extensibilidad, pH, homogeneidad, capacidad hidratante y estabilidad frente al ciclado térmico. Aunque ambas formulaciones mostraron resultados satisfactorios, la formulación 1 presentó un comportamiento global ligeramente superior. La evaluación preliminar en un voluntario con estrías leves mostró una mejoría visual tras dos meses de aplicación continua. Sin embargo, debido al tamaño limitado de la muestra, estos resultados deben considerarse exploratorios. Por ello, se recomienda ampliar la población del estudio y seguir criterios de inclusión y exclusión específicos de selección para confirmar la eficacia clínica del producto.

Finalmente, los estudios de absorción percutánea sugieren que las NLS de cafeína constituyen una estrategia prometedora para optimizar la administración tópica de este compuesto. En conjunto, los resultados demuestran la viabilidad de desarrollar e incorporar nanopartículas lipídicas sólidas cargadas con cafeína en una formulación cosmética

destinada al tratamiento de estrías, aunque se requieren estudios adicionales para corroborar su eficacia terapéutica.

Referencias

1. Abd, E., Gomes, J., Sales, C.C., Yousef, S., Forouz, F., Telaprolu, K.C., Roberts, M.S., Grice, J.E., Lopes, P.S., Leite-Silva, V.R. and Andréo-Filho, N. (2021). Deformable liposomes as enhancer of caffeine penetration through human skin in a Franz diffusion cell test. *Int. J. Cosmet. Sci.*, 43: 1-10. <https://doi.org/10.1111/ics.12659>
2. Akanda, M., Hossain S. y Douroumis D. (2023). Solid lipid nanoparticles: An effective lipid-based technology for cancer treatment. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, (86): 104709, <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.104709>.
3. AL-Smadi, K., Imran, M., Abdoh, A. et al. (2025). Nanopartículas lipídicas cargadas con vitamina D: propiedades antioxidantes, preparación, optimización y caracterización in vitro. *Drug Deliv. and Transl. Res.* 15 , 4338–4366. <https://doi.org/10.1007/s13346-025-01946-1>
4. Ayala, A. (2000). Las estrías. Etiología, clínica y tratamiento. *Offarm.* 19(2): 74-83. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-las-estrias-etilogia-clinica-tratamiento-15449>
5. Azhar B. & Hamishehkar, H. (2016). The Impact of Variables on Particle Size of Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers; A Comparative Literature Review. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 6(2), 143–151. <https://doi.org/10.15171/apb.2016.021>
6. Binder L., Mazál J., Petz R., Klang V., Valenta C. (2019). The Role of Viscosity on Skin Penetration from Cellulose Ether-Based Hydrogels. *Ski. Res. Technol.* 25:725–734. doi: 10.1111/srt.12709.
7. Chandrasekar* R., B. Sivagami. (2018). Formulation and Evaluation of a Poly Herbal Skin Care Cream containing Neem and Tulsi. *Research J. Topical and Cosmetic Sci.* 9(1): page 25-32. doi: 10.5958/2321-5844.2018.00006.7
8. Constantin, M. M., Poenaru, E., Poenaru, C., & Constantin, T. (2014). Skin Hydration Assessment through Modern Non-Invasive Bioengineering Technologies. *Maedica*, 9(1), 33–38. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4268288/>

9. Crespi, F. (2020) Differential Pulse Voltammetry: Evolution of an In Vivo Methodology and New Chemical Entries, A Short Review. *Journal of New Developments in Chemistry*. 2(4):20-28. <https://doi.org/10.14302/issn.2377-2549.jndc-20-3298>
10. Duan, Y., Dhar, A., Patel, C., Khimani, M., Neogi, S., Sharma, P., Siva Kumar, N., & Vekariya, R. L. (2020). A brief review on solid lipid nanoparticles: part and parcel of contemporary drug delivery systems. *RSC advances*, 10(45), 26777–26791. <https://doi.org/10.1039/d0ra03491f>
11. Esfahani, M. H., Ghorbani, A., & Latifi, M. (2023). Evaluation of lipid nanocarriers in the form of SLN and their application in drug delivery and medical science. *Nanochemistry Research*, 8(1), 57-70. doi: 10.22036/ncr.2023.01.006
12. Esoje, E.; Muazu, J.; Madu, S.J. (2016). Formulation and in-vitro assessment of cream prepared from *Allium cepa* L., bulb. *Asian J. Pharm. Sci. Technol.* 6, 1–5.
13. Fernandes, L.D.S.; Amorim, Y.M.; da Silva, E.L.; Silva, S.C.; Santos, A.J.A.; Peixoto, F.N.; Pires, L.M.N.; Sakamoto, R.Y.; Pinto, F.D.C.H.; Scarpa, M.V.C. (2018). Formulation, stability study and preclinical evaluation of a vaginal cream containing curcumin in a rat model of vulvovaginal candidiasis. *Mycoses* 2018, 61, 723–730.
14. FEUM, (2013). *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 13a Ed.* Secretaría de Salud, Comisión permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.
15. Gardouh, A., Sayed, H., Ghorab, M. y Abdel-Rahman, S. (2010). Preparación y caracterización de nanopartículas lipídicas sólidas II. Efecto de la viscosidad, el método de preparación y la velocidad de homogeneización en las características físicas de las nanopartículas lipídicas sólidas. *Zagazig Journal of Pharmaceutical Sciences* , 19 (2), 5-19. doi: 10.21608/zjps.2010.167378
16. Gardouh, R., Ahmed & Gamal, Alshimaa & Gad, Shadeed. (2020). Formulation and pharmacokinetic evaluation of rifampicin solid lipid nanoparticles. *Journal of Research in Pharmacy*. 24. 539-551. 10.35333/jrp.2020.202
17. Garzón Serra M.L., García Fernández B. (2019). Las nanopartículas sólidas lipídicas y los acarreadores lipídicos nanoestructurados en usos terapéuticos. *Razón y Palabra*,(68),1-14. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=199520297008>
18. Ghasemiyeh, P., & Mohammadi-Samani, S. (2018). Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers as novel drug delivery systems: applications,

advantages and disadvantages. *Research in pharmaceutical sciences*, 13(4), 288–303. <https://doi.org/10.4103/1735-5362.235156>

19. Gordillo A. & Mora E. (2018). Solid Lipid Nanoparticles and nanostructured lipid carriers: A review emphasizing on particle structure and drug release. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 133, 285-308. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.10.017>.
20. Gururaj A., Archana Bhat, Shreya Shenoy. (2023). Recent Advances in Dermatology Semisolid Dosage Forms. *International Journal of Medical Science in Clinical Research and Review*, 6(06), Page: 1089–1095. Retrieved from <https://ijmscr.in/index.php/ijmscr/article/view/651>
21. Hernández-Esquivel, R.-A., Navarro-Tovar, G., Zárate-Hernández, E., & Aguirre-Bañuelos, P. (2022). Solid Lipid Nanoparticles (SLN). *IntechOpen*. doi: 10.5772/intechopen.102536
22. Ialongo, Davide, Valeria Tudino, Merve Arpacioğlu, Antonella Messori, Elisa Patacchini, Roberta Costi, Roberto Di Santo, and Valentina Noemi Madia. (2023). "Synergistic Effects of Caffeine in Combination with Conventional Drugs: Perspectives of a Drug That Never Ages" *Pharmaceutics*. 16(5):730. <https://doi.org/10.3390/ph16050730>
23. Jankovic A., Gaurav Chaudhary, Francesco Goia. (2021). Designing the design of experiments (DOE) – An investigation on the influence of different factorial designs on the characterization of complex systems. *Energy and Buildings*. 250, 111298, <https://doi.org/10.1016/j.enbuild.2021.111298>.
24. Jin, X., Imran, M., & Mohammed, Y. (2022). Topical Semisolid Products- Understanding the Impact of Metamorphosis on Skin Penetration and Physicochemical Properties. *Pharmaceutics*, 14(11), 2487. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14112487>
25. Khairnar, S. V., Pagare, P., Thakre, A., Nambiar, A. R., Junnuthula, V., Abraham, M. C., Kolimi, P. (2022). Review on the Scale-Up Methods for the Preparation of Solid Lipid Nanoparticles. *Pharmaceutics*, 14(9), 1886. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics14091886>

26. Lokhande, A. J., & Mysore, V. (2019). Striae Distensae Treatment Review and Update. Indian dermatology online journal, 10(4), 380–395. https://doi.org/10.4103/idoj.IDOJ_336_18
27. Lotfi, S., Veisi, H., & Karmakar, B. (2021). A convenient strategy for the electrochemical evaluation of acetaminophen and caffeine in combined drugs and biological samples over TiO₂@polymethyldopa/Pd nanocomposite functionalized glassy carbon electrodes. Measurement. 186,110156. <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2021.110156>.
28. Lukić, M., Pantelić, I., & Savić, S. D. (2021). Towards Optimal pH of the Skin and Topical Formulations: From the Current State of the Art to Tailored Products. Cosmetics, 8(3), 69. <https://doi.org/10.3390/cosmetics8030069>
29. Maha, HL; Sinaga, KR; Masfria, M. (2018). Formulación y evaluación de nanoemulsiones y cremas de nitrato de miconazol. Asian J. Pharm. Clin. Res. 2018 , 11 , 319–321.
30. Malekipour Esfahani, M. H., Ghorbani, A., & Latifi, M. (2023). Evaluation of lipid nanocarriers in the form of SLN and their application in drug delivery and medical science. Nanochemistry Research, 8(1), 57-70. doi: 10.22036/ncr.2023.01.006
31. Mawazi, S. M., Ann, J., Othman, N., Khan, J., Alolayan, S. O., Al thagfan, S. S., & Kaleemullah, M. (2022). A Review of Moisturizers; History, Preparation, Characterization and Applications. Cosmetics, 9(3), 61. <https://doi.org/10.3390/cosmetics9030061>
32. Montero, C. (2019). Uso de nanopartículas para la liberación de fármacos en el segmento anterior ocular: basado en nanopartículas lipídicas, dendrímeros y sistemas compuestos. Universidad de Sevilla, Facultad de Farmacia. Disponible en: <https://idus.us.es/handle/11441/91762>
33. Moon, S., Saboe, A., & Smanski, M. J. (2024). Using design of experiments to guide genetic optimization of engineered metabolic pathways. Journal of industrial microbiology & biotechnology, 51, kuae010. <https://doi.org/10.1093/jimb/kuae010>
34. Mukherjee, S., Ray, S., & Thakur, R. S. (2009). Solid lipid nanoparticles: a modern formulation approach in drug delivery system. Indian journal of pharmaceutical sciences, 71(4), 349–358. <https://doi.org/10.4103/0250-474X.57282>
35. Muñoz, I. (2013). Nanopartículas de LPGA: Una aportación innovadora en el uso terapéutico de cannabinoides. Universidad de Sevilla, Facultad de Farmacia.

[https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/72454/file_1.pdf?sequence=1&isAllowed](https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/72454/file_1.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

[=y](#)

36. Musielak, E., Feliczak-Guzik, A., & Nowak, I. (2022). Optimization of the Conditions of Solid Lipid Nanoparticles (SLN) Synthesis. *Molecules*, 27(7), 2202. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/molecules27072202>
37. Naseri, N., Valizadeh, H., & Zakeri-Milani, P. (2015). Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers: Structure, Preparation and Application. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 5(3), 305–313. <https://doi.org/10.15171/apb.2015.043>
38. National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 2519, Caffeine. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Caffeine>.
39. Patel H.K., Barot B.S., Parejiya P.B., Shelat P.K., Shukla A. (2013). Topical Delivery of Clobetasol Propionate Loaded Microemulsion Based Gel for Effective Treatment of Vitiligo: Ex Vivo Permeation and Skin Irritation Studies. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 102:86–94. doi: 10.1016/j.colsurfb.2012.08.011.
40. Pérez-Bueno, T., Rodríguez-Perdomo, Y., Morales-Lacarrere, I., Soler-Roger, D., Viaña, N. (2011). Comportamiento reológico y extensibilidad de una formulación semisólida a partir del extracto acuoso de *Rhizophora mangle* L. *Tecnología, Ciencia, Educación*, vol. 26, núm. 2, pp. 75-79
41. Piacentini, E. (2016). Encapsulation Efficiency. In: Drioli, E., Giorno, L. (eds) *Encyclopedia of Membranes*. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-44324-8_1945
42. Puglia C, Alessia Offerta, Giorgia Giusy Tirendi, Maria Stella Tarico, Sergio Curreri, Francesco Bonina & Rosario Emanuele Perrotta (2016). Design of solid lipid nanoparticles for caffeine topical administration, *Drug Delivery*, 23:1, 36-40, DOI: 10.3109/10717544.2014.903011
43. Sagoe, P. N. K., Velázquez, E. J. M., Espiritusanto, Y. M., Gilbert, A., Orado, T., Wang, Q., & Jain, E. (2023). Fabrication of PEG-PLGA Microparticles with Tunable Sizes for Controlled Drug Release Application. *Molecules*, 28(18), 6679. <https://doi.org/10.3390/molecules28186679>
44. Schoenfelder, H., Wiedemann, Y., & Lunter, D. J. (2025). Development and characterization of topical formulation for maintenance therapy containing sorbitan monostearate with and without PEG-100-stearate. *International journal of cosmetic science*, 47(2), 223–233. <https://doi.org/10.1111/ics.13023>

45. Shen, Y., Pang, Q. y Xu, J. (2022). Comprehensive pathogenesis and clinical therapy in striae distensae: An overview and current perspective, *Chinese Journal of Plastic and Reconstructive Surgery*, 4(4), 203-207, <https://doi.org/10.1016/j.cjprs.2022.10.002>.
46. Sirirak T., Subongkot T. (2020). Development and Skin Penetration Pathway Evaluation of Microemulsions for Enhancing the Dermal Delivery of Celecoxib. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 193:111103. doi: 10.1016/j.colsurfb.2020.111103.
47. Subroto, E., Andoyo, R., Indarto, R. (2023). Solid Lipid Nanoparticles: Review of the Current Research on Encapsulation and Delivery Systems for Active and Antioxidant Compounds. *Antioxidants*, 12, 633. <https://doi.org/10.3390/antiox12030633>
48. Sukmawati, A., Utami W., Yuliani, R., Da, M., Nafarin, A. (2018). Effect of tween 80 on nanoparticle preparation of modified chitosan for targeted delivery of combination doxorubicin and curcumin analogue. *Materials Science and Engineering* 311 (2018) 012024 doi:10.1088/1757-899X/311/1/012024
49. Surendra, B., Kumar, M., Iriveru, P. (2020). Formulation and evaluation of caffeine-loaded solid lipid nanoparticles to treat clinical mastitis. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 79(85). Disponible en: 10.22159/ajpcr.2020.v13i7.37641
50. Švorc, L. (2013). Determination of Caffeine: A Comprehensive Review on Electrochemical Methods. *International Journal of Electrochemical Science*. (23)14720-1. <https://doi.org/10.1016/s1452-3981%2823%2914720-1>
51. Tasić, Ž. Z., Petrović Mihajlović, M. B., Simonović, A. T., Radovanović, M. B., & Antonijević, M. M. (2022). Recent Advances in Electrochemical Sensors for Caffeine Determination. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 22(23), 9185. <https://doi.org/10.3390/s22239185>
52. Tran, V., Truong, T., Hoang V., Thi, N. (2022). Use of herbal extract for body-care formulations. *Nanotechnology for the preparation of cosmetics using plant-based extract. Micro and nano technologies*, 10, 263-282. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822967-5.00011-4>
53. Üner, M., & Yener, G. (2007). Importance of solid lipid nanoparticles (SLN) in various administration routes and future perspectives. *International Journal of Nanomedicine*, 2(3), 289–300. <https://doi.org/10.2147/IJN.S2.3.289>
54. Verdelli, A., Bonan, P., Fusco, I., Madeddu, F., & Piccolo, D. (2023). Striae Distensae: Clinical Results and Evidence-Based Evaluation of a Novel 675 nm Laser

Wavelength. *Medicina*, 59(5), 841. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/medicina59050841>

55. Viegas C., Patrício A.B., Prata J.M., Nadhman A., Chintamaneni P.K., Fonte P. (2023). Solid Lipid Nanoparticles vs. Nanostructured Lipid Carriers: A Comparative Review. *Pharmaceutics*; 15(6):1593. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15061593>
56. Visconti, Michael J.; Haidari, Wasim; Feldman, Steven. (2020). Therapeutic Use of Caffeine in Dermatology: A Literature Review. *Journal of Dermatology and Dermatologic Surgery*. 24(1): 18-24. DOI: 10.4103/jdds.jdds_52_19
57. Weber, S.G. y Long, J.T. (1988). Detection Limits and Selectivity in Electrochemical Detectors. *Analytical Chemistry*. 60(15): 903A-913A. <https://doi.org/10.1021/ac00166a730>

Anexos

Consentimiento informado

04/Abr/2024

Protocolo: Aplicación de un sistema de nanopartículas lipídicas sólidas para mejorar la penetración de la cafeína en la piel en una crema cosmética.

Investigador responsable: Yessica Abigail Galicia Franco, abigailgf@gmail.com, 2192033839@alumnos.xoc.uam.mx. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, Departamento de Sistemas Biológicos.

Se le invita a participar de manera voluntaria en el presente estudio de investigación, cuyo objetivo es evaluar las propiedades y los efectos de una crema tópica formulada para el tratamiento de estrías.

Antes de participar en el estudio que se le ha propuesto, es importante que éste informado a cerca de las características de este y que esté de acuerdo con los procedimientos a los que será sometido. Su participación en el estudio es completamente voluntaria. Puede realizar todas las preguntas que considere necesarias.

Si acepta participar en el estudio:

Se realizará una evaluación inicial de la piel y sus estrías, se le proporcionará la crema para su aplicación conforme a las indicaciones establecidas. Se realizarán evaluaciones periódicas para observar cambios en la apariencia en las estrías y posibles reacciones cutáneas. Podrán tomarse fotografías clínicas únicamente con fines de investigación y confidencialidad.

Procedimiento:

1. Definir la zona de su cuerpo en donde tenga presencia visible de estrías.
2. Limpiar suavemente la zona, secarla y aplicar una capa fina de la crema. Masajear hasta su completa absorción y lavarse las manos enseguida. Aplicar diariamente en la misma zona durante 2 meses.
3. Tomar una fotografía de la zona en tratamiento como evidencia semanal, la cual deberá ser nítida, con buena iluminación y del mismo ángulo permitiendo un seguimiento adecuado y enviarla a la investigadora Yessica Abigail Galicia Franco, vía correo electrónico.
4. Informar sobre cualquier reacción adversa que pudiera generar el producto.

1

Riesgos

Si observa reacciones leves como enrojecimiento, irritación, ardor o comezón en la zona administrada deberá suspender la aplicación de inmediato e informar de forma consecuente a la investigadora.

Beneficios

Su participación puede contribuir al desarrollo de nuevas alternativas tópicas para el tratamiento de estrías. Sin embargo, no se garantiza una mejoría específica.

Confidencialidad

Toda la información obtenida será confidencial y utilizada únicamente con fines académicos y de investigación. Los datos personales serán protegidos conforme a la normatividad vigente.

Participación voluntaria

Su participación es completamente voluntaria. Puede retirarse del estudio en cualquier momento, sin penalización ni consecuencia alguna.

Consentimiento

He leído y comprendido la información anterior. Hago constar que he recibido toda la información acerca de la naturaleza y propósito del estudio, así como el riesgo descrito. Además, se me ha informado que puedo retirar mi consentimiento en cualquier momento.

Estoy de acuerdo que la información clínica derivada del estudio, sea informada a la comunidad científica verbalmente o por escrito, manteniendo los derechos de privacidad. Por lo tanto, acepto participar voluntariamente en este estudio de investigación.

 04/Abril/2024 Maria Enriqueta Franco López	 04/Abril/2024 Yessira Abigail Galán Franco
Nombre, firma, fecha del participante	Nombre, firma, fecha del investigador