



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTORA EN QUÍMICA

*FILTROS QUÍMICOS SOLARES, ESTUDIOS ANALÍTICOS CUANDO SE
ENCUENTRAN EN SISTEMAS DEL TIPO DE LAS MICROEMULSIONES*

Magister Danielle Silva do Nascimento

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2020

Prefacio

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctora en Química, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Química durante el período comprendido entre el 26 agosto de 2014 y el 22 de julio de 2020, bajo la dirección del Dr. Marcos Grünhut, Profesor Adjunto de Química Analítica.

Magister Danielle Silva do Nascimento

	<p>UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR Secretaría General de Posgrado y Educación Continua</p> <p>La presente tesis ha sido aprobada el .../.../....., mereciendo la calificación de(.....).</p>
---	---

Agradecimientos

Este trabajo ha sido posible gracias a mi director Marcos Grünhut, por su conocimiento colaboración y dedicación, a quien agradezco profundamente.

A la Dra. Beatriz Fernández Band, que me permitió formar parte de su grupo de investigación y sin su cariño y estímulo esta tesis doctoral no hubiera sido posible.

A la Universidad Nacional del Sur y a CONICET por la beca otorgada.

A mis compañeros del Área III, Química Analítica, por todo su apoyo.

A todos los docentes del Área de Química Analítica que, de alguna manera u otra, han colaborado en mi trabajo y formación.

A mis compañeras de oficina (INQUISUR), especialmente a Verónica Volpe, compañera de laboratorio y amiga.

A mis padres, Antônio Alves do Nascimento y Maria de Lourdes Silva do Nascimento, a mis hermanos, a mi hijo Luca Insausti y a toda familia Insausti. Todos ellos acompañaron con amor y admiración este recorrido.

A los amigos Gabi, Marina y Gastón, que siempre estuvieron presentes y a mi marido Matías Insausti, quien con su amor, compañerismo y perseverancia fue un apoyo incondicional para finalizar la tesis.

Muchas gracias a todos aquellos que aportaron su granito de arena en la construcción de esta tesis.

Resumen

El octil p-metoxicinamato (OMC) es un filtro químico del grupo de los metoxicinamatos, de amplio uso en productos para la protección solar de la piel. Debido a su alta lipofilidad, es necesario un medio adecuado para su solubilización y su posterior aplicación en la piel. Las microemulsiones (MEs) son sistemas organizados, transparentes y termodinámicamente estables muy utilizados en la preparación de productos farmacéuticos y de cuidado personal (PPCPs) para la administración tópica de diversos componentes activos.

Desde el punto de vista analítico, es de interés el estudio de este tipo de sistemas ya que las propiedades de una especie en un medio organizado pueden diferir respecto a sus propiedades en un medio acuoso. Por ello, este trabajo de tesis propone abordar esta temática, aportando información valiosa para el desarrollo y control de formulaciones portadoras de filtros químicos solares para su utilización como PPCPs.

En una primera etapa, se diseñaron, obtuvieron y caracterizaron fisicoquímicamente dos nuevas formulaciones del tipo de las microemulsiones aceite en agua (o/w) como portadoras del filtro químico solar OMC (MEI-OMC y MEII-OMC), a partir de materiales biocompatibles y de uso común en la producción de PPCPs.

MEI-OMC y MEII-OMC fueron utilizadas en una serie de estudios analíticos relacionados con el comportamiento del filtro químico solar OMC cuando se encuentra en un medio organizado. Un primer estudio se enfocó en el desarrollo de un sistema automático para el estudio de fotodegradación del OMC cargado en las formulaciones propuestas. El sistema estuvo acoplado a un detector de fluorescencia molecular y permitió monitorear en tiempo real dicho

proceso. Los datos espectrales de segundo orden se analizaron mediante resolución multivariada de curvas optimizada mediante mínimos cuadrados alternados (MCR-ALS) y, de esta manera, se obtuvieron las constantes de fotodegradación (K_f) para OMC.

En un segundo trabajo, se presenta un sistema automático de fácil implementación y bajo costo para el estudio de permeación de OMC en las formulaciones propuestas. El método utiliza la tradicional celda de difusión de Franz y fue diseñado para monitorear en línea mediante fluorescencia molecular y absorción molecular UV-Vis el proceso de permeación de OMC a través de una membrana sintética que simula la piel. El análisis espectral se realizó mediante cuadrados mínimos parciales (PLS) y, de esta manera, se obtuvieron los perfiles de permeación que permitieron calcular las correspondientes constantes de permeación (K_p). El método propuesto fue validado mediante cromatografía gaseosa-espectrometría de masas.

Finalmente, se plantea un potencial método de *screening* y un método de cuantificación del filtro químico solar OMC en la formulación MEI-OMC, por medio de la aplicación de herramientas quimiométricas de clasificación y calibración multivariada a los mapas espectrales obtenidos por espectroscopía Raman confocal (ERC). La discriminación de las clases se realizó para diferentes concentraciones de OMC utilizando el algoritmo de analogía de clases por modelado suave independiente (SIMCA) y la técnica de análisis discriminante lineal previa selección de variables utilizando el algoritmo de las proyecciones sucesivas (SPA-LDA). La cuantificación de OMC se llevó a cabo mediante cuadrados mínimos parciales (PLS).

Abstract

Octyl p-methoxycinnamate (OMC) is a chemical filter of the methoxycinnamate group widely used in products for sun protection. Due to the high lipophilicity of OMC, a suitable medium is necessary for its solubilization and its subsequent application on the skin. Microemulsions (MEs) are organized, transparent and thermodynamically stable systems widely used in pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) for the topical administration of various components.

The chemical study of this kind of systems is interesting since the properties of specie in an organized medium may differ with respect to an aqueous medium. Therefore, this thesis proposes to address this issue, providing valuable information for the development and control of solar chemical filters loaded MEs for use as PPCPs.

In the first place, two new formulations based on oil-in-water (o/w) microemulsions (MEI-OMC, MEII-OMC) as carriers of the OMC solar chemical filter were designed, obtained and physicochemically characterized. The systems were synthesized from biocompatible materials commonly used for the production of PPCPs.

Then, MEI-OMC and MEII-OMC were used as a model to carry out a series of analytical studies related to the behavior of the OMC sunscreen in an organized medium. A first study focused on the development of a continuous flow automatic system for the photolysis study of OMC loaded MEs. The system was coupled to a molecular fluorescence detector and allowed to monitor the photolysis process in real-time. Second order spectral data were analyzed using multivariate curve resolution optimized by alternating least squares (MCR-ALS). The

concentration profiles were obtained and used to calculate, by means of an appropriate kinetic model, the corresponding photodegradation constants for OMC (K_f).

In a second study, an easily implementable and low cost automatic system for the kinetic analysis of permeation of the proposed formulations is presented. The online method uses the traditional Franz diffusion cell and it was designed to monitor by molecular fluorescence and UV-Vis molecular absorption spectroscopies the permeation process of OMC through a synthetic membrane that simulates the skin. The spectral analysis was performed using partial least squares (PLS) and the permeation profiles were obtained. From this, the corresponding permeation constants (K_p) were calculated. The proposed method was validated by gas chromatography-mass spectrometry.

Finally, both screening and quantification methods for OMC in the MEI-OMC formulation are proposed applying chemometric classification and multivariate calibration tools to the spectral data obtained by confocal Raman spectroscopy (CRS). Class discrimination was carried out for different concentrations of OMC using the soft independent modeling class analogy algorithm (SIMCA) and the linear discriminant analysis technique after selection of variables using the successive projections algorithm (SPA-LDA). On the other hand, the quantification of OMC was carried out using partial least squares (PLS).

INDICE GENERAL

OBJETIVOS -----	2
Capítulo 1. INTRODUCCIÓN -----	4
1.1 Generalidades-----	4
1.2 Efectos de la radiación UV-----	7
1.3 Filtros solares-----	9
1.3.1 Factor de Protección Solar-----	13
1.4 Sistemas dispersos-----	15
1.4.1 Suspensiones-----	17
1.4.2 Sistemas vesiculares-----	17
1.4.3 Emulsiones-----	17
1.4.4 Nanoemulsiones-----	17
1.4.5 Microemulsiones-----	18
1.5 Aplicaciones de las MEs-----	24
1.5.1 MEs portadoras de filtros solares-----	26
1.6 Estudios analíticos en MEs-----	28
1.6.1 Técnicas Espectroscópicas-----	29
1.6.3 Sistemas automáticos-----	34
Capítulo 2. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MICROEMULSIONES PORTADORAS DE OCTIL P-METOXICINAMATO -----	38
2.1 Objetivos-----	38
2.2 Introducción-----	39
2.2.1 Fase oleosa-----	41
2.2.2 Surfactante-cosurfactante-----	45
2.3 Parte Experimental-----	47
2.3.1 Materiales-----	47
2.3.2 Métodos-----	47
2.3.2.1 Obtención de MEs-----	47
2.3.2.1.1 Diagramas pseudoternarios de fases para sistemas con AO-----	47
2.3.2.1.2 Diagramas pseudoternarios de fases para sistemas con AEA-----	48
2.3.2.2 Caracterización fisicoquímica de MEs-----	48
2.3.2.3 Preparación de MEs cargadas con OMC-----	49
2.3.2.4 Estudios de estabilidad de las MEs cargadas con OMC-----	50
2.3.2.4.1 Test de centrifugación-----	50
2.3.2.4.2 Ciclos de calentamiento-enfriamiento-----	50
2.3.2.5 Determinación del FPS de las MEs cargadas con OMC-----	50
2.3.2.6 Caracterización del AEA-----	50
2.4 Resultados y Discusión-----	51

2.4.1 Obtención de MEs -----	51
2.4.2 Caracterización fisicoquímica de las MEs -----	55
2.4.3 Selección de las MEs para su carga con OMC-----	57
2.4.3.1 Selección y carga de MEI-----	57
2.4.3.2 Selección y carga de MEII-----	59
2.4.4 Morfología de MEI-OMC y MEII-OMC-----	61
2.4.5 Estudios de estabilidad de MEI-OMC y MEII-OMC -----	62
2.4.6 Determinación del Factor de Protección Solar-----	63
2.4.7 Composición del AEA utilizado para la obtención de MEII -----	64
2.5 Conclusiones parciales -----	67
Capítulo 3. ESTUDIO DE FOTODEGRADACIÓN DE OCTIL P-METOXICINAMATO CARGADO EN MICROEMULSIONES -----	71
3.1 Objetivos -----	71
3.2 Introducción-----	72
3.2.1 Espectroscopia de fluorescencia molecular -----	77
3.2.2 Análisis de datos mediante algoritmos de segundo orden -----	80
3.3 Parte Experimental -----	83
3.3.1 Materiales -----	83
3.3.2 Métodos -----	84
3.3.2.1 Sistema automático en línea para el estudio de fotodegradación -----	84
3.3.2.2 Adquisición de datos -----	85
3.3.2.3 Análisis de datos -----	85
3.4 Resultados y Discusión -----	86
3.4.1 Sistema automático en línea -----	86
3.4.2 Estudio de fotodegradación -----	87
3.4.3 Análisis de datos mediante MCR-ALS -----	93
3.4.4 Obtención de las constantes cinéticas-----	96
3.5 Conclusiones Parciales -----	100
Capítulo 4. ESTUDIO DE PERMEACIÓN DEL OCTIL P-METOXICINAMATO CARGADO EN SISTEMAS DE MICROEMULSIONES -----	103
4.1 Objetivos -----	103
4.2 Introducción-----	104
4.3 Parte Experimental -----	114
4.3.1 Materiales -----	114
4.3.2 Métodos -----	116
4.3.2.1 Sistema automático en línea para el estudio de permeación -----	116
4.3.2.2 Adquisición y tratamiento de datos -----	117
Parte A. Formulación MEI-OMC -----	117

IA. Detección y cuantificación de OMC mediante espectroscopía UV-Vis -----	117
IIA. Detección y cuantificación de OMC mediante espectrometría de fluorescencia molecular -----	118
Parte B. Formulación MEII-OMC -----	118
IB. Detección de OMC mediante espectrometría de fluorescencia molecular sincrónica -	118
IIB. Cuantificación de OMC mediante PLS -----	119
4.3.2.3 Validación de la metodología propuesta -----	120
4.3.2.3.1 Análisis mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas.-----	120
4.3.2.3.2 Análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución -----	120
4.4 Resultados y Discusión -----	121
4.4.1. Sistema automático en línea-----	121
4.4.2 Cuantificación de OMC cargado en las formulaciones -----	122
Parte A. Formulación MEI-OMC -----	122
IA.1 Cuantificación de OMC mediante espectroscopía UV-Vis -----	122
IIA.2 Cuantificación de OMC mediante espectroscopía de fluorescencia molecular -----	123
Parte B. Formulación MEII-OMC -----	124
IIB.1 Evaluación de la espectrometría UV-Vis como técnica de detección-----	124
IIB.2 Cuantificación de OMC mediante espectrometría de fluorescencia sincrónica-----	125
4.4.3 Validación de las metodologías propuestas mediante GC-MS-----	128
4.4.4 Obtención de los perfiles de permeación -----	129
4.4.5 Aplicación de los métodos propuestos a una muestra comercial -----	133
4.4.6 Ventajas del sistema propuesto -----	133
4.5 Conclusiones Parciales -----	138
Capítulo 5. ESTUDIO DE CLASIFICACIÓN Y CUATIFICACIÓN DE OCTIL P-METOXICINAMATO CARGADO EN SISTEMAS DE MICROEMULSIONES-----	141
5.1 Objetivos -----	141
5.2 Introducción-----	142
5.3 Parte Experimental -----	155
5.3.1 Materiales -----	155
5.3.2.1 Adquisición de datos -----	156
5.3.2.2 Análisis de datos -----	156
5.3.2.2.1 Preprocesamiento de datos -----	157
5.3.2.2.2 Análisis de clasificación de muestras de MEI-OMC -----	159
5.4 Resultados y Discusión -----	161
5.4.1 Análisis espectral de los componentes de MEI-OMC mediante ERC -----	161
5.4.2 Análisis de Datos-----	163
5.4.2.1 Análisis exploratorio -----	163
5.4.2.2 Análisis de clasificación mediante SPA-LDA y SIMCA-----	164
5.4.2.3 Análisis de cuantificación de OMC en MEI mediante PLS -----	169

5.5 Conclusiones Parciales -----	173
Capítulo 6. CONCLUSIONES GENERALES -----	176
<i>Apéndice I</i> -----	180
Valores de la composición de varios puntos del sistema MEI utilizados en la construcción del diagrama pseudoternario.-----	180
<i>Apéndice II</i> -----	185
Valores de la composición de varios puntos del sistema MEII utilizados en la construcción del diagrama pseudoternario.-----	185
<i>Apéndice III - PRODUCTIVIDAD DE LA TESIS</i> -----	190

Lista de tablas

Tabla 1.1 Lista de los filtros UV admitidos en productos cosméticos según la directiva 83/574/CEE.-----	11
Tabla 1.2 Constantes para cada longitud de onda correspondiente al producto entre el efecto eritemogénico y la intensidad de la radiación determinadas por Sayre y col. -----	15
Tabla 1.3 Aplicación de los surfactantes en función de su valor de HLB.-----	24
Tabla 2.1 Composición de las MEs seleccionadas a partir de los diagramas pseudoternarios de fases. Las formulaciones MEI corresponden a una relación Smix 3:1 (% p/p) y las formulaciones MEII a una relación Smix 2:1 (% p/p). Todas las concentraciones de los componentes están expresadas en % (p/p).-----	55
Tabla 2.2 Resultados de la caracterización físicoquímica de las formulaciones MEI. En cada caso, las determinaciones se realizaron por triplicado. Cada valor se expresa con su correspondiente desviación estándar.-----	55
Tabla 2.3 Resultados de la caracterización físicoquímica de las formulaciones MEII. En cada caso, las determinaciones se realizaron por triplicado. Cada valor se expresa con su correspondiente desviación estándar. -----	56
Tabla 2.4 Caracterización físicoquímica de formulaciones MEII cargadas con 1,5% de OMC. Las determinaciones de los parámetros estudiados se realizaron por triplicado. Cada valor se expresa con su correspondiente desviación estándar. -----	60
Tabla 2.5 Caracterización físicoquímica de las formulaciones MEII cargadas con diferentes concentraciones de OMC. Las determinaciones de los parámetros se realizaron por triplicado. Cada valor se expresa con su correspondiente desviación estándar.-----	60
Tabla 2.6 Composición y caracterización físicoquímica de las formulaciones MEI y MEII cargadas con OMC y seleccionadas como sistemas óptimos. -----	61
Tabla 2.7 Determinación <i>in vitro</i> del factor de protección solar (FPS) para las formulaciones MEI-OMC y MEII-OMC. EE representa el efecto eritemogénico de la radiación de longitud de	

onda λ y I la intensidad de la radiación solar en la longitud de onda λ . Además, se utilizó un factor de corrección de 10, el cual es el apropiado para este tipo de estudio ^[104].----- **63**

Tabla 2.8 Valores de FPS correspondiente a formulaciones publicadas en bibliografía y comerciales que contienen OMC.----- **64**

Tabla 2.9 Resultado del análisis mediante GC-MS del aceite esencial de albahaca utilizado en la obtención de MEII (PM: peso molecular; TR: tiempo de retención). ----- **67**

Tabla 3.1 Optimización de los parámetros del sistema automático en línea. ----- **86**

Tabla 3.2 Constantes cinéticas de fotodegradación (K_f) a 25 °C calculadas para los distintos sistemas estudiados. El proceso siguió en todos los casos una cinética de primer orden. ----- **98**

Tabla 4.1 Diseño factorial completo 3^2 ----- **119**

Tabla 4.2 Parámetros analíticos correspondientes a los modelos PLS obtenidos para la cuantificación de OMC y AEA.----- **128**

Tabla 4.3 Modelos de ajuste para los perfiles de permeación obtenidos por los distintos métodos propuestos. ----- **131**

Tabla 4.4 Constantes cinéticas de permeabilidad (K_p) para OMC en las formulaciones estudiadasobtenidas mediante las metodologías propuestas y el método de referencia.----- **132**

Tabla 4.5 Constantes cinéticas de permeabilidad (K_p) para OMC en muestra real. ----- **133**

Tabla 4.6 Comparación entre varios métodos desarrollados para estudios de permeación *in vitro* utilizando la celda de difusión de Franz. ----- **136**

Tabla 5.1 Número de muestras (N) de entrenamiento y predicción en cada clase para el conjunto de datos obtenidos por ERC. ----- **160**

Tabla 5.2 Resumen de los resultados de la clasificación de las formulaciones MEI-OMC para SPA-LDA y SIMCA en nivel de confianza del 95%. ----- **169**

Tabla 5.3 Parámetros estadísticos correspondientes al modelo PLS para la cuantificación de OMC en muestras de MEI mediante ERC. ----- **172**

<i>Tabla I.1</i> Relación de componentes estudiada para la obtención MEs con AO como fase oleosa utilizando una mezcla Smix (DME:ET) 1:1. -----	181
<i>Tabla I.2</i> Relación de componentes estudiada para la obtención MEs con AO como fase oleosa utilizando una mezcla Smix (DME:ET) 2:1. -----	182
<i>Tabla I.3</i> Relación de componentes estudiada para la obtención MEs con AO como fase oleosa utilizando una mezcla Smix (DME:ET) 3:1. -----	183
<i>Tabla II.1</i> Relación de componentes estudiada para la obtención de MEs con AEA como fase oleosa utilizando una mezcla (DME:ET) 1:1. -----	186
<i>Tabla II.2</i> Relación de componentes estudiada para la obtención de MEs con AEA como fase oleosa utilizando una mezcla (DME:ET) 2:1. -----	187
<i>Tabla II.3</i> Relación de componentes estudiada para la obtención de MEs con AEA como fase oleosa utilizando una mezcla (DME:ET) 3:1. -----	188

Lista de figuras

Figura 1.1 Porcentaje del mercado de cosméticos en América Latina. -----	5
Figura 1.2 Zonas del espectro de radiación solar. Puede observarse las zonas correspondientes a la radiación UVA, UVB y UVC. -----	8
Figura 1.3 Representación de diferentes sistemas dispersos de interés para el desarrollo de PPCPs. -----	16
Figura 1.4 Esquema de las estructuras de microemulsiones inversas (w/o), bicontínuas y directas (o/w). Adaptado de ^[33] . -----	19
Figura 1.5 Efecto del cosurfactante (un alcohol en este caso) sobre el área molecular del surfactante en una interfase agua-aceite. -----	22
Figura 1.6 Los doce principios de la Química Verde. -----	29
Figura 1.7 Técnicas espectroscópicas con aplicaciones en diversos campos de la industria y la investigación. -----	30
Figura 1.8 Esquema básico de un proceso realizado mediante un analizador discreto o batch. -	35
Figura 1.9 Componentes básicos de un sistema en flujo contínuo. -----	36
Figura 2.1 Fórmula estructural del ácido oleico. Los átomos se representan como esferas con codificación de colores convencionales: carbono (gris), hidrogeno (blanco) y oxígeno (rojo). --	43
Figura 2.2 Fórmula estructural de los compuestos mayoritarios del aceite esencial de albahaca (AEA): (a) estragol, (b) cineol, (c) linalol, (c) α -pineno, (d) β -pineno. Los átomos se representan como esferas con codificación de colores convencionales: carbono (gris), hidrogeno (blanco) y oxígeno (rojo). -----	45
Figura 2.3 Fórmula estructural del surfactante no-iónico decaetilenglicol monododecil éter (DME). Los átomos se representan como esferas con codificación de color convencionales: carbono (gris), hidrogeno (blanco) y oxígeno (rojo). -----	45
Figura 2.4 Diagramas pseudoternarios de fases correspondientes a los sistemas obtenidos con ácido oleico (AO). En todos los casos, la zona coloreada representa la región de formación de MEs. (a) Smix 1:1 (% p/p), (b) Smix 2:1 (% p/p), (c) Smix 3:1 (% p/p). -----	52

Figura 2.5 Diagramas pseudoternarios de fases correspondientes a los sistemas obtenidos con aceite esencial de albahaca (AEA). En todos los casos, la zona coloreada representa la región de formación de MEs. (a) Smix 1:1 (% p/p), (b) Smix 2:1 (% p/p), (c) Smix 3:1 (% p/p).-----	53
Figura 2.6 Fotografía de mezclas correspondientes al diagrama pseudoternario de fases 2:1 (AO). En (a) puede observarse un sistema transparente el cual representa una microemulsión y en (b) un sistema opalescente el cual representa una emulsión.-----	54
Figura 2.7 Estudio de la variación del tamaño de partícula (Z) correspondiente a las formulaciones MEI durante 30 días. -----	58
Figura 2.8 Fotografía TEM (270.000x) de los sistemas de MEs (a) con fase interna AO (MEI-OMC) y (b) con fase interna AEA (MEII-OMC). Como puede verse, en ambos casos se corrobora una morfología esférica. -----	62
Figura 3.1 Fotoisomerización del OMC bajo los efectos de la radiación UV. Estructura molecular de los isómeros <i>trans</i> -OMC y <i>cis</i> -OMC.-----	73
Figura 3.2 Esquema de la fotólisis directa del OMC y sus productos de fotodegradación y fotoisomerización. Adaptado de Pattanaargson y col. ^[118] . Seguido al proceso de fotoisomerización se generan subproductos como 4-metoxibenzaldehído (4-MBA), 2-etilhexanol (2-EH), ciclodímeros y un producto de degradación obtenido a partir de la hidrólisis de los ciclodímeros. -----	75
Figura 3.3 Diagrama parcial de niveles de energía para un sistema fotoluminiscente. Adaptado de ^[128] . -----	78
Figura 3.4 Esquema básico de los componentes de un espectrofluorímetro. -----	78
Figura 3.5 Espectros de fluorescencia a 25 °C (pH = 6) correspondientes a los isómeros del OMC en un medio etanol:agua (1:1). El isómero <i>cis</i> -OMC está representado en color naranja mientras que isómero <i>trans</i> -OMC está representado en color azul. El valor máximo de emisión en cada caso es de 405 y 410 nm, respectivamente. -----	80
Figura 3.6 Esquema del sistema de flujo continuo utilizado para el estudio de fotodegradación de OMC. Las flechas indican la dirección del flujo (caudal: 0,78 mL min ⁻¹). -----	85

Figura 3.7 Espectros de fluorescencia en función del tiempo de fotodegradación (12 min) correspondientes a las muestras (a) MEI-OMC (b) MEI y (c) NOI-OMC. En total se registraron 24 espectros por muestra. La flecha indica el aumento en el tiempo de fotodegradación. ----- **90**

Figura 3.8 Espectros de fluorescencia en función del tiempo de fotodegradación (12 min) correspondiente a las muestras (a) MEII-OMC (b) MEII y (c) NOII-OMC. En total se registraron 24 espectros por muestra. La flecha indica el aumento en el tiempo de fotodegradación. ----- **92**

Figura 3.9 Perfiles de concentración correspondientes a la fotodegradación de OMC: a) en un medio no-organizado (NOI-OMC) y b) cargado en la MEI (MEI-OMC). Las líneas azules con puntos representan al isómero (*trans*-OMC), las líneas amarillas continuas (al isómero *cis*-OMC) y las líneas naranjas punteadas corresponden a un intermediario, posiblemente un fotodímero.- **94**

Figura 3.10 Perfiles de concentración correspondientes a la fotodegradación de OMC: a) en un medio no-organizado (NOII-OMC), y b) cargado en la MEII (MEII-OMC) Las líneas azules con puntos representan al isómero *trans*-OMC), las líneas amarillas continuas al isómero *cis*-OMC) y las líneas naranjas punteadas corresponden a un intermediario, posiblemente un fotodímero. **95**

Figura 3.11 Curvas obtenidas aplicando una cinética de primer orden a los perfiles de concentración de cada muestra analizada. (a) NOI-OMC (círculos azules) y MEI-OMC (cuadrados rojos) y (b) NOII-OMC (círculos azules) y MEII-OMC (cuadrados rojos). ----- **97**

Figura 3.12 Representación del FPS correspondiente a la formulación MEII-OMC para diferentes tiempos de fotodegradación. ----- **99**

Figura 4.1 Representación esquemática de una celda de difusión de Franz utilizada para realizar estudios de permeación.----- **105**

Figura 4.2 Espectros de fluorescencia EF y EFS de los estándares de azul de metileno, oxazina 170 y de la mezcla de los mismos. (a) espectros de emisión de EF de azul de metileno (línea azul continua) y oxazina 170 (línea roja punteada); (b) espectros de EFS de azul de metileno (línea azul continua) y oxazina 170 (línea roja punteada); (c) espectros de EF de la mezcla de azul de metileno (línea azul continua, $\lambda_{exc}=614$ nm) y oxazina 170 (línea roja punteada, $\lambda_{exc}=655$ nm) y

(d) espectros de ESF de la mezcla de azul de metileno y oxazina 170 ($\Delta\lambda=20$ nm). Adaptado de [161].	110
Figura 4.3 Sistema de flujo continuo para el estudio de permeabilidad in vitro del OMC con detección en línea. AA: accionador Arduino®; SR: solución receptora; ME: microemulsión; AM: agitador magnético; PA: membrana de poliamida; BP: bomba peristáltica; R: residuos; BA: baño de agua. El flujo fue de 0,25 mL min ⁻¹ y en cada muestreo se tomaron 100 µL de muestra los cuales se recuperaron con SR.	117
Figura 4.4 Espectros de absorción molecular UV-Vis de los componentes puros de la formulación MEI-OMC	122
Figura 4.5 Espectro de la solución estándar de OMC: (a) máxima absorción del OMC en 340 nm mediante espectrometría UV-Vis y (b) recta de calibración del OMC en un rango de concentración entre 6,0 – 60,0 mg L ⁻¹ . Cada medida se realizó por triplicado.	123
Figura 4.6 Espectro de fluorescencia molecular de una solución testigo de OMC (30 mg L ⁻¹) cuya máxima intensidad de fluorescencia se registró a 390 nm. (b) recta de calibración del OMC en un rango de concentración entre 6,0 – 36,0 mg L ⁻¹ . Cada medida se realizó por triplicado.	124
Figura 4.7 Espectros de absorción UV-Vis de los componentes puros de la formulación MEII-OMC.	125
Figura 4.8 Espectros de fluorescencia molecular sincrónica registrados en función del tiempo de permeación para una mezcla de calibración conteniendo 60 mg L ⁻¹ de OMC y 240 mg L ⁻¹ de AEA (experimento número 9, Tabla 4.1)	126
Figura 4.9 Gráfico de <i>loading</i> de la primera variable latente obtenida mediante PLS.	127
Figura 4.10 (a) Cromatograma de una solución testigo de OMC (30 mg L ⁻¹) con un tiempo de retención de 17,4 min. (b) Recta de calibración del OMC en un rango de concentración entre 6,0 -48,0 mg L ⁻¹ .	129
Figura 4.11 Perfiles de permeación de OMC obtenidos mediante los métodos propuestos y su comparación con una metodología de referencia. (a)MEI-OMC con detección GC-MS; (círculo negro); MEI-OMC con detección EF (rombo azul) y MEI-OMC con detección UV-Vis	

(cuadrado rojo). (b) MEII-OMC con detección GC-MS (círculo negro) y MEII-OMC con detección EFS (rombo azul). ----- 130

Figura 5.1 Esquema de los niveles energéticos en la dispersión Rayleigh (elástica) y en la dispersión Raman (inelástica). ----- 145

Figura 5.2 Ejemplo de un espectro Raman, con sus desplazamientos Stokes y anti-Stokes. --- 146

Figura 5.3 Espectros del amarillo ternario obtenidos con láser rojo y verde en los que vemos que las bandas Raman aparecen en las mismas posiciones frecuenciales en ambos casos. ----- 146

Figura 5.4 Fotografía de un microscopio Raman confocal, marca Renishaw Plc, modelo Wotton-Under-Edge, acoplado a un láser de longitud de onda de 532 nm y un microscopio con objetivo L50x. Este instrumento fue utilizado para el presente trabajo de tesis. ----- 148

Figura 5.5 Espectro Raman correspondiente a un punto de una imagen obtenida por ERC de una de las formulaciones analizadas en el presente trabajo de tesis (MEI-OMC). ----- 149

Figura 5.6 Ejemplo de selección de variables mediante SPA para un conjunto de 5 variables. El vector de inicio es X_0 y la mayor proyección sobre el plano ortogonal al mismo (S_0) corresponde a X_1 . ----- 153

Figura 5.7 Espectros Raman correspondientes a la formulación MEI-OMC cargada con un 5% del filtro OMC. (a) Espectros brutos sin pretratamiento (b) Espectros pretratados con AsLS para la corrección de la línea de base ($p = 0,001$; $\lambda = 10^3$). ----- 158

Figura 5.8 Espectros Raman correspondientes a la formulación sin carga (MEI, línea negra) y a sus componentes puros AO (fase oleosa, línea roja), DME (surfactante, línea azul) y OMC (filtro químico, línea verde). En los mismos se indican los números de onda (cm^{-1}) correspondientes a las bandas principales en cada caso. ----- 161

Figura 5.9 Gráfico de *scores* (PC1 vs PC2) correspondiente a la aplicación de PCA al conjunto de muestras analizadas conteniendo diferentes concentraciones de OMC. ----- 163

Figura 5.10 Espectro Raman con indicación de las variables seleccionadas por el algoritmo SPA en el modelo de clasificación. ----- 164

Figura 5.11 Gráfico de funciones discriminantes de Fisher (DF1, DF2 y DF4) correspondientes al modelo SPA-LDA. -----	165
Figura 5.12 Gráfico de las distintas funciones discriminantes de Fisher obtenidas luego de aplicar SPA-LDA al conjunto de espectros Raman. -----	166
Figura 5.13 Gráfico de Coomans representando las distancias ortogonales de las muestras de predicción respecto de las clases definidas por el modelo. (a) 3%MEI-OMC y 5%MEI-OMC; (b) 5%MEI-OMC y 7%MEI-OMC y (c) 3%MEI-OMC y 7%MEI-OMC. -----	168
Figura 5.14 Mapa de colores espectrales obtenidos por ERC correspondientes a las diferentes muestras del conjunto de predicción: a) 3,0% MEI-OMC; b) 5,0% MEI-OMC; c) 7,0% MEI-OMC. La imagen representa un área de la muestra de aproximadamente 204 μm^2 . -----	171
Figura 5.15 Representación de los valores nominales respecto de los valores predichos por el modelo PLS en la cuantificación de OMC en muestras de MEI.-----	173

OBJETIVOS

Filtros químicos solares, estudios analíticos cuando se encuentra en sistemas del tipo de las microemulsiones

Danielle Silva do Nascimento

OBJETIVOS

El presente trabajo de Tesis tiene por objetivo desarrollar metodologías analíticas confiables, accesibles y de fácil implementación, que permitan el estudio de sistemas de microemulsiones del tipo aceite en agua (o/w) portadoras de filtros químicos solares. Para ello, se plantea la obtención de nuevas formulaciones que se utilizarán como modelo para abordar dichos estudios. Además, se propone el empleo de técnicas de automatización, la utilización de técnicas espectroscópicas de detección y la aplicación de diversas herramientas quimiométricas que permitan el análisis de grandes volúmenes de datos. Los estudios analíticos se centrarán en el análisis de los procesos de fotólisis, permeación y cuantificación de la especie cargada. Los mismos contemplarán la comparación del comportamiento de la especie (filtro químico solar) en sistemas organizados respecto de su presencia en sistemas no organizados.

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

Capítulo 1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades

Los productos farmacéuticos y de cuidado personal, PPCPs (del inglés, *pharmaceuticals and personal care products*) comprenden diversos tipos de formulaciones con usos farmacéuticos, cosméticos y de higiene humana que se utilizan con el objeto de higienizar, perfumar, proteger o mantener en buen estado diversas partes del cuerpo ^[1]. En contraste, existen diversas sustancias naturales y sintéticas contenidas en los PPCPs que pueden producir efectos adversos localizados, dentro de los que se pueden mencionar, irritación, sensibilización y/o reacciones alérgicas ^[2]. Por dicha razón, es de vital importancia un control de calidad exhaustivo de los productos antes de su comercialización.

Dentro del grupo de PPCPs se encuentran los productos cosméticos que comprenden distintos tipos de formulaciones para uso corporal sobre las cuales existe una gran variedad de presentaciones y usos. Dada la amplitud de esta categoría y la interacción directa con el cuerpo humano, estos productos pueden definirse como: “*toda sustancia o mezcla destinada a ser puesta en contacto con las partes superficiales del cuerpo humano (epidermis, sistema piloso y capilar, uñas, labios y órganos genitales externos) o con los dientes y las mucosas bucales, con el fin exclusivo o principal de limpiarlos, perfumarlos, modificar su aspecto, protegerlos, mantenerlos en buen estado o corregir los olores corporales*” ^[3].

Según el estudio de Euromonitor, una compañía independiente dedicada a la investigación de mercado, considera la industria latinoamericana de cosméticos como

¹ PRASAD M.N.V., VITHANAGE M., KAPLEY A., *Pharmaceuticals and personal care products: Waste Management and Treatment Technology*, Ed. Butterworth-Heinemann, 2019, Capítulo 1, páginas 1-26.

² HAYES L. M., *COSMETICS: Types, Allergies and Applications*, Ed. Nova Science Publishers, 2013, Capítulo 2, páginas 37-68.

³ REGLAMENTO (CE) N.º. 1223/2009 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO, sobre los productos cosméticos, 2009.

un mercado emergente con un crecimiento anual del 3,6% para el periodo de 2017 a 2021^[4]. Mientras que los países con mayor crecimiento son Brasil y México, seguidos por Argentina, Chile y Colombia (Fig. 1.1).

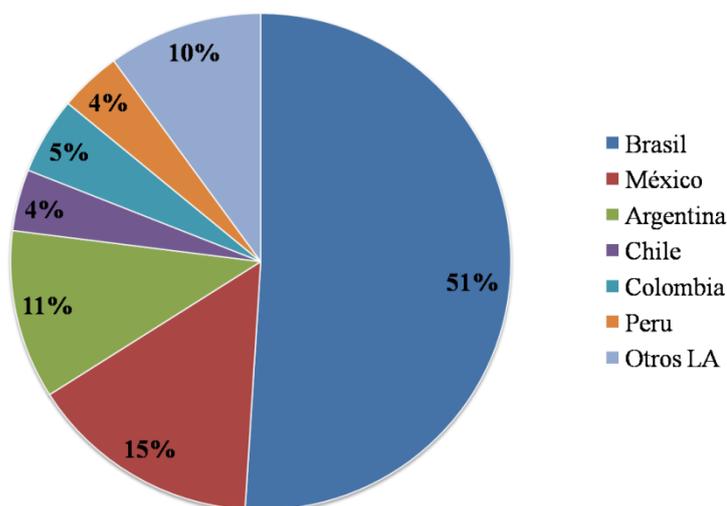


Figura 1.1 Porcentaje del mercado de cosméticos en América Latina.

En la actualidad la industria de perfumería y cosmética en Argentina es un sector económico de gran importancia, la cual está representada por la Cámara Argentina de la Industria de Cosmética y Perfumería (CAPA)^[5]. En esta industria, los productos se dividen en ocho grandes categorías: productos capilares, tocador, higiene, cremas, fragancias, higiene oral, maquillajes y productos para protección solar. En todos los casos, son necesarios numerosos controles de calidad para evaluar la funcionalidad e inocuidad de estos productos. Dentro de estos controles se incluyen la determinación de diversos parámetros fisicoquímicos, observación de las características organolépticas,

⁴ EUROMONITOR INTERNATIONAL, Beauty and Personal Care, Ingredients: Consumer trends in Latin America, 2014. Disponible en: <https://www.euromonitor.com/beauty-and-personal-care>

⁵ CÁMARA ARGENTINA DE LA INDUSTRIA DE COSMÉTICA Y PERFUMERÍA, Productos representados, <http://capa.org.ar/>, Consulta: 30 de enero de 2020.

ensayos microbiológicos del producto acabado, idoneidad de los envases y materiales de embalaje ^[6].

De esa manera, el objetivo del control de calidad del producto cosmético terminado es asegurar tanto el cumplimiento de las especificaciones establecidas para la formulación como la mantención de las características y composición del producto en forma constante desde un lote de producción a otro. La Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) ^[7], organismo estatal Argentino, comprueba que las calidades de materias primas, envases, embalajes y cualquier producto o utensilio que sea empleado en el laboratorio, se ajuste a las exigencias previamente definidas, en consonancia con la Normativa vigente.

En cuanto a lo expuesto en normativas internacionales, los ingredientes que podrán incorporarse en los productos cosméticos serán aquellos que están incluidos en los listados de ingredientes de la FDA de los Estados Unidos (*Food and Drug Administration*), CTFA (*Cosmetics Toiletry and Fragrance Association*), COLIPA (*European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association*) y directivas de la Unión Europea ^[8, 9].

Dentro de los productos cosméticos existe un importante grupo de productos destinados a influir en la salud y la apariencia de la piel, ofreciendo ingredientes activos de tratamiento para poder prevenir, en la medida de lo posible, las agresiones que alteran la funcionalidad de la piel evitando los efectos causados por algunos factores

⁶ FARMACOPEA ARGENTINA, MINISTERIO DE SALUD, ANMAT, 2003. Disponible en: [http://www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/pfds/Farmacopea Argentina 2013 Ed.7.pdf](http://www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/pfds/Farmacopea_Argentina_2013_Ed.7.pdf)

⁷ ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA MÉDICA. Disponible en: <https://www.anmat.gov.ar/>

⁸ NORMATIVA DE COSMÉTICOS – ANMAT Resolución 155/98 - “Productos cosméticos”, Buenos Aires, 1998.

⁹ US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA, Sunscreen drug products for over-the-counter human use: proposed rule. *Federal Register*, 2019. Disponible en: <https://www.govinfo.gov/content/pkg/FR-2019-02-26/pdf/2019-03019.pdf>

extrínsecos como: la polución, el humo de cigarrillo, la exposición altas temperaturas y a los rayos ultravioleta ^[10, 11].

1.2 Efectos de la radiación UV

El sol es imprescindible para la vida terrestre. En el ser humano, la exposición a la radiación solar presenta efectos beneficiosos cuando la misma se realiza de manera moderada. Entre los efectos más importantes se distingue el rol que cumple en el sistema nervioso, siendo importante para la actividad intelectual y emocional. Además, promueve el engrosamiento de la capa córnea de la epidermis, formando una barrera contra los rayos UV. Por otro lado, estimula la producción de melanina, previene la dermatosis, actúa como bactericida y antiséptico, estimula la circulación y promueve la síntesis de vitamina D ^[12], entre otras funciones. Sin embargo, diversos estudios demuestran la incidencia negativa de la radiación solar sobre la piel, principalmente por parte de la radiación UV durante periodos de exposición prolongados. Cabe destacar que gran parte de la población se expone diariamente a la radiación UV de los rayos solares. Dentro de los efectos dañinos más comunes debido a esta exposición, se encuentran los que ocasionan eritema, pigmentación y lesiones en el ADN, lo que puede conducir la formación de diferentes tipos de tumores ^[13].

El espectro de radiación UV puede dividirse en tres regiones (Fig. 1.2):

¹⁰ PRASAD M.N.V., VITHANAGE M., KAPLEY A., Pharmaceuticals and personal care products: Waste Management and Treatment Technology, Ed. Butterworth-Heinemann, 2019, Capítulo 5, páginas 115-128.

¹¹ QUANTIN P., THÉLU A., CATOIRE S., FICHEUX H., Perspectives and strategies of alternative methods used in the risk assessment of personal care products, *Annales Pharmaceutiques Françaises* 2015, 73, 6, 422-435.

¹² NOLE G., JOHNSON A. W., An analysis of cumulative lifetime solar ultraviolet radiation exposure and the benefits of daily sun protection, *Dermatologic Therapy* 2004, 17, 1, 1-68.

¹³ D'ORAZIO J., JARETT S., AMARO-ORTIZ A., SCOTT T., UV radiation and the skin, *International Journal of Molecular Science* 2013, 14, 6, 12222-12248.

Capítulo 1. INTRODUCCIÓN

La región UVA que abarca desde 320 a 400 nm. Este espectro es el responsable de la reacción de pigmentación de la piel, y de otros efectos como son el fotoenvejecimiento y la fotosensibilización de la piel.

La región UVB comprende a la radiación entre 290 y 320 nm. Presenta también una marcada acción pigmentógena y es la región responsable de las quemaduras solares.

La radiación UVC corresponde a longitudes de onda menores a 290 nm. Esta región es eritematogena, mutagénica y carcinogénica ^[14].

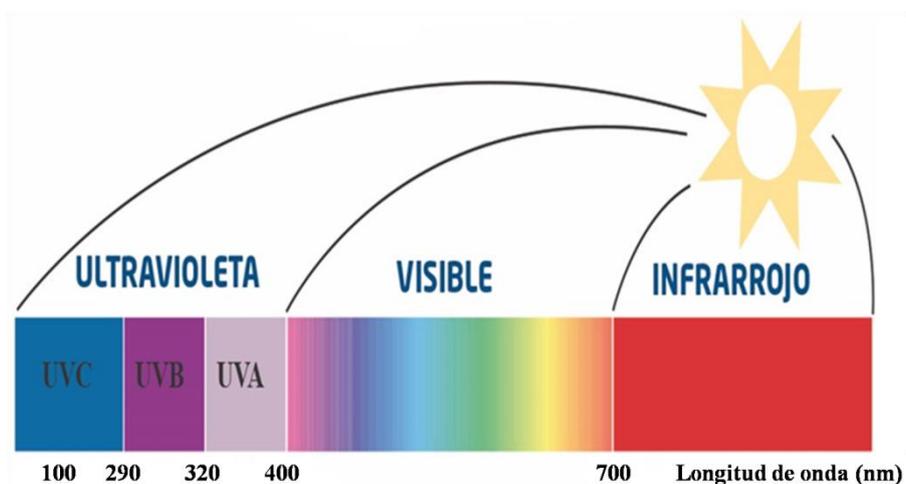


Figura 1.2 Zonas del espectro de radiación solar. Puede observarse las zonas correspondientes a la radiación UVA, UVB y UVC.

Para evitar los efectos nocivos que la radiación UV puede provocar en el ser humano, se han desarrollado diferentes sistemas denominados “protectores solares”, los cuales son productos de uso externo que contienen diferentes tipos de sustancias químicas que actúan como barrera protectora de la piel frente a la radiación solar ^[15]. Los protectores solares constituyen una defensa de primera línea, siempre que reúnan condiciones necesarias de eficacia, seguridad y calidad del producto.

¹⁴ DIFFEY B. L., Sources and measurement of ultraviolet radiation, *Methods* 2002, 28, 1, 4-13.

¹⁵ BERKEY C., OGUCHI N., MIYAZAWA K., DAUSKARDT R., Role of sunscreen formulation and photostability to protect the biomechanical barrier function of skin, *Biochemistry and Biophysics Reports* 2019, 19, 100657-100665.

En la normativa 6830/2001 de la ANMAT, los productos para protección solar son clasificados según el factor de protección solar, y se encuadran en diferentes categorías acorde a la protección que ofrece el producto contra los rayos UV, al tipo de piel y tiempo de exposición ^[16].

1.3 Filtros solares

Los componentes activos que otorgan protección solar a una formulación son los filtros UV. Estos pueden agruparse en dos categorías generales: los filtros inorgánicos y los filtros orgánicos.

Los filtros inorgánicos, antes llamados filtros físicos, son moléculas estables a la radiación, que ejercen su efecto de protección mediante la dispersión, reflexión o absorción de radiación UV. Estas moléculas brindan protección frente a radiaciones de hasta 380 nm de longitud de onda ^[17].

Los filtros orgánicos o químicos, son moléculas orgánicas con grupos cromóforos que absorben radiación en la región UV ^[18]. Según el rango de longitud de onda en la cual absorben radiación, los filtros químicos se clasifican en UVB, UVA y de amplio espectro. Generalmente, estos filtros se componen de uno o varios anillos bencénicos conjugados con dobles enlaces y/o grupos carbonilo. Su uso se ha extendido a otros campos, como el de la industria textil, pinturas, pigmentos, fotografía, y en la fabricación de productos plásticos, en los cuales se utilizan para prevenir procesos de fotodegradación o pérdida de color ^[19]. Sin embargo, estos compuestos poseen potencial efecto de disrupción endocrina y efecto ecotoxicológico, debido a su estructura química

¹⁶ NORMATIVA – ANMAT Resolución 6830/01 - “Protección solar”, Buenos Aires, 2001.

¹⁷ EL-BOURY S., COUTEAU C., BOULANDE L., PAPARIS E., COIFFARD L. J. M., Effect of the combination of organic and inorganic filters on the sun protection factor (SPF) determined by *in vitro* method, *International Journal of Pharmaceutics* 2007, 340, 1, 1-5.

¹⁸ NOHYNEK G. J., SCHAEFER H., Benefit and risk of organic ultraviolet filters, *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2001, 33, 3, 285-299.

¹⁹ KOCKLER J., OELGEMOLLER M., ROBERTSON S., GLASS B. D., Photostability of sunscreens, *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* 2012, 13, 1, 91-110.

y su lipofilia y, en general, su baja biodegradabilidad, generando metabolitos o productos de degradación en el medio de dispersión en que se encuentran ^[20].

En relación con las regiones del espectro UV antes descritas, los filtros químicos UVB absorben la radiación en el intervalo de 280-320 nm, siendo su máximo de absorción entre 305 y 310 nm. En esa región presentan un máximo de efectividad eritematosa ^[21]. Por otro lado, para proteger la piel de los efectos adversos de la radiación UVA son empleados los filtros UVA, cuyo intervalo de absorción se encuentra entre 320 y 400 nm. Además, estos filtros ayudan a minimizar los efectos de los medicamentos fotosensibles, que se activan en este intervalo de radiación produciendo reacciones fototóxicas y fotoalérgicas ^[22].

Como se muestra en la Tabla 1.1, los filtros UV pueden clasificarse en distintos grupos dependiendo de su estructura química. Así tenemos: derivados de la benzofenona, derivados del ácido p-aminobenzoico, salicilatos, metoxicinamatos, derivados del alcanfor, derivados de la triazina, derivados del benzotriazol, derivados del bencimidazol, entre otros ^[23], como parte de los filtros químicos orgánicos, y dióxido de titanio como principal ejemplo de filtros químicos inorgánicos.

²⁰ MANCEBO BS S. E., HU MD J. Y., WANG MD S. Q., Sunscreens: A review of health benefits, regulations and controversies, *Dermatologic Clinics* 2014, 32, 3, 427-438.

²¹ FORESTIER S., Rationale for sunscreen development, *Journal of the American Academy of Dermatology* 2008, 58, 5, 133-138.

²² SAMBANDAN BA D., RATNER MD D., Sunscreens: An overview and update, *Journal of the American Academy of Dermatology* 2011, 64, 4, 748-758.

²³ RASTOGI S. C., UV filters in sunscreen products – a survey, *Contact Dermatitis* 2002, 46, 348-351.

Capítulo 1. INTRODUCCIÓN

Tabla 1.1 Lista de los filtros UV admitidos en productos cosméticos según la directiva 83/574/CEE.

Nombre Químico	Nomenclatura INCI ^a	Cantidad ^b
Ácido 4-aminobenzoico	PABA	5%
Metilsulfato de N,N,N-trimetil-4-(2-oxoborn-3-bornilidín)-metil) anilina	Alcanfor benzalconio metosulfato	6%
Benzoato de 2-hidroxi-, 3,3,5-trimetilciclohexílico/homosalato	Homosalato	10%
2-Hidroxi-4-metoxibenzofenona (oxibenzona)	Benzofenona-3	10%
Ácido 2-fenilbencimidazol-5-sulfónico y sus sales de potasio, sodio y trietanolamina/ensulizol	Ácido fenilbencimidazol sulfónico	8% (de ácido)
Ácido 3,3'-(1,4-fenilendimetileno) bis(7,7-dimetil-2-oxobis[2,2,1]hept-1-il-metano sulfónico) y sus sales	Ácido tereftalidén dicánfor sulfónico	10% (de ácido)
1-(4- <i>Tert</i> -butil-fenil)-4'-metoxidibenzoilmetano	Butil metoxidibenzoilmetano	5%
Ácido α -(2-oxoborn-3-ilidén)-toluen-4-sulfónico y sus sales	Ácido bencilidén alcanfor sulfónico	6% (de ácido)
Ester 2-etilhexílico del ácido 2-ciano-3,3-difenilacrílico	Octocrileno	10% (de ácido)
Polímero de N-[(2 y 4)-[(2-oxoborn-3-ilidén)metil]bencil]acrilamida	Poliacrilamidometil bencilidén alcanfor	6%
Octil metoxicinamato /octinoxato	Etilhexil metoxicinamato	10%
Etil-4-Aminobenzoato etoxilado	PEG-25 PABA	10%
Isopentil-4-metoxicinamato/amiloxato	Isoamil metoxicinamato	10%
2,4,6-Triánilino-(p-carbo-2'-etilhexil-1'-oxi)-1,3,5-triazina	Etilhexil triazona	5%
2-(2H-Benzotriazol-2-il)-4-metil-6-[2-metil-3-(1,3,3,3-tetrametil-1-((trimetilsilil)oxi)disiloxanil)propilo] fenol	Drometizol trisiloxano	15%
Benzoato Bis (2-etilhexil) bis(4,4'-[[6-[[4-[[1,1-dimetiletil]amino] carbonil] fenil]amino]1,3,5-triazina-2,4-diil]diimino]Iscotrizinol (USAN)	Dietilhexil butamido triazona	10%
3-(4'-Metilbencilidén)-D,L-1 alcanfor/enzacameno	4-Metilbencilidén alcanfor	4%

Capítulo 1. INTRODUCCIÓN

3 Bencilideno Alcanfor	3-Bencilideno alcanfor	2%
Salicilato de 2-etilhexilo/octisalato	Etilhexil salicilato	5%
Benzoato de 4-(dimetilamino)-2-etilhexilo/padimato O (USAN:BAN)	Etilhexil dimetil PABA	8%
Ácido 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona-5-sulfónico y su sal de sodio	Benzofenona-4	5% (de ácido)
2,2'-Metilen-bis-6-(2H-benzotriazol-2-il)-4-(1,1,3,3-tetrametil butil)fenol/bisoctrizol	Metilen bisbenzotriazolil tetrametilbutilfenol	10%
Sal sódica de ácido 2,2' bis-(1,4-fenilen)-1H-bencimidazol-4,6-disulfónico/bisdisulizol disódico (USAN)	Ácido fenildibencimidazol tetrasulfónico	10% (de ácido)
2,2'-(6-(4-Metoxifenil)-1,3,5-triazina-2,4-diil]bis[5-((2-etilhexil)oxil)fenol)/bemotrizino	Bis-etilhexiloxifenol metoxifenil triazina	10%
Benzalmalonato de dimeticodietilo	Polisilicona-15	10%
Dióxido de titanio	Dióxido de titanio	25%
Hexilbenzoato de 2-[4-(dietilamino)-2-hidroxi-benzoil]	Dietilamino hidroxibenzoil hexil benzoato	10%

^a Nomenclatura internacional de ingredientes cosméticos (INCI, del inglés *International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*); ^b cantidad máxima permitida por la Unión Europea.

En lo que se refiere a la determinación de filtros UV, es de destacar que no existe ningún método oficial para la determinación de los filtros UV admitidos en la directiva Europea (96/45/CE). Simplemente se dispone de un método de análisis oficial para la determinación de gliceril PABA. Este compuesto fue prohibido por la Directiva Europea 92/86/CEE de 21 de octubre de 1992. El método se basa en una determinación cualitativa mediante cromatografía de capa fina y su posterior determinación cuantitativa mediante cromatografía líquida de alta resolución. De esta manera, con este ejemplo se demuestra la necesidad de una revisión de los métodos oficiales de análisis existentes en la actualidad para los productos cosméticos en general, y en particular la necesidad de poner a punto métodos para los productos para la protección solar, ya que

la concentración de los filtros UV presentes en estos productos está limitada por la legislación (83/574/CEE).

1.3.1 Factor de Protección Solar

Una medida de la eficacia de los filtros para la radiación UV es el factor de protección solar (FPS), el cual se determina a través del *international sun protection factor test method*. El valor numérico que se indica en el envase de un fotoprotector solar se refiere al efecto a la radiación UVB, debido a que el FPS indica la capacidad de protección frente al eritema y no frente a los otros efectos producidos por la radiación UVA. De esta manera, el FPS está dado por el cociente entre la mínima dosis de radiación necesaria para producir eritema con el filtro solar (aplicado a dosis de 2 mg/cm²) y la mínima dosis de radiación necesaria para producir eritema en piel no protegida ^[24]. El incremento de protección es lineal en el caso de una quemadura solar, es decir, una formulación de FPS 30 protege el doble que una de FPS 15. En cambio, la eficacia de absorción de radiación UVB no es lineal respecto del FPS, por ejemplo, una formulación de FPS 15 absorbe el 93% de radiación, mientras que una de FPS 30 un 97%; FPS mayores de 50 absorben en torno a un 98% de radiación ^[24].

La determinación del FPS en formulaciones puede realizarse por métodos *in vivo*, en donde las áreas protegidas y no protegidas de los individuos están expuestas a luz solar artificial por un determinado período de tiempo en el cual se observa la formación del eritema. No obstante, para disminuir los costos en los ensayos *in vivo*, aumentar la seguridad y acelerar los procesos de medición, son utilizados los métodos *in vitro*. En general, estos métodos utilizan la técnica de espectroscopia de absorción

²⁴ DUTRA E. A., OLIVEIRA D. A. G. C., HACKMANN E. R. M. K., SANTORO M. I. R. M. Determination of sun protection factor (SPF) of sunscreens by ultraviolet spectrophotometry, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2004, 40, 3, 381-385.

molecular UV-Vis para monitorear la absorbancia de soluciones diluidas de los productos testeados ^[25].

Un método muy utilizado es el descrito por Mansur y col. (1986) ^[26]. Éste es un método espectrofotométrico simple, en el cual la formulación se diluye en etanol hasta una concentración de 0,20 mg mL⁻¹, condición necesaria para establecer una correlación con el método *in vivo*. Los valores de absorbancia medidos a determinadas longitudes de onda, son relacionados empíricamente con el FPS de la formulación mediante la siguiente fórmula:

$$FPS = FC \sum_{290}^{320} (EE_{(\lambda)} I_{(\lambda)} A_{(\lambda)}) \quad \text{Ecuación 1.1}$$

(concentración = 0,20 μL μL⁻¹ o 0,20 mg mL⁻¹)

donde FPS es el factor de protección solar; FC es un factor de corrección; EE_(λ) es el efecto eritemogénico de la radiación de longitud de onda λ; I_(λ) representa la intensidad del sol en la longitud de onda λ; y A_(λ) es la absorbancia de la solución a longitud de onda λ.

En la Tabla 1.2 se observa que la relación entre el efecto eritemogénico y la intensidad de la radiación a cada longitud de onda es una constante determinada por Sayre et al. (1979) ^[27].

²⁵ FONSECA A. P., RAFAELA N., Determination of Sun Protection Factor by UV-Vis Spectrophotometry, *Health Care: Current Reviews* 2013, 1, 1, 1-4.

²⁶ MANSUR J. S., BREDER M. N. R., MANSUR M. C. A., AZULAY R. D., Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria, *Anais Brasileiros de Dermatologia* 1986, 61, 121-124.

²⁷ SAYRE R. M., AGIN P. P., LEVEE G. J., MARLOWE E., A comparison of in vivo and in vitro testing of sunscreening formulas, *Photochemistry and Photobiology* 1979, 29, 559-566.

Tabla 1.2 Constantes para cada longitud de onda correspondiente al producto entre el efecto eritemogénico y la intensidad de la radiación determinadas por Sayre y col.

Longitud de onda (nm)	EE(λ) I(λ)
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180
Total	1,0000

1.4 Sistemas dispersos

En relación al uso de los filtros químicos solares, existe una preocupación real sobre la pérdida de la eficacia que ofrece el producto en función del tiempo. Estas sustancias sintéticas como la oxibenzona, octocrileno, octisalato o avobenzona, entre otras, se activan cuando incide la radiación UV sobre ellas provocando una reacción fotoquímica que es la encargada de proteger la piel de las radiaciones solares. El inconveniente de estos filtros químicos es que pueden provocar irritaciones ya que la absorción de este tipo de moléculas si bien no se consideran nocivas, puede interaccionar con la piel provocando alergia e irritación.

La capacidad de los protectores solares dependerá de varios factores: la asociación de los filtros utilizados, su fotoestabilidad, su compatibilidad con los excipientes y sus propiedades de lipo/hidrosolubilidad. En consecuencia, existe un creciente interés en el desarrollo de sistemas que permitan mejorar la estabilidad de los filtros solares y evitar así la pérdida de su eficacia. Dentro de estos sistemas se destacan los sistemas dispersos ^[28], los cuales están conformados por una fase dispersa y una fase continua o medio dispersante. La fase dispersa está constituida por un soluto (sólido o

²⁸ BRUNAUGH A. D., SMYTH H. D. C., WILLIAMS III R. O., *Disperse Systems: Suspensions*, Ed. Springer, 2019, Capítulo 6, 91-110.

líquido) dispersado en la fase continua, generalmente un medio líquido acuoso u orgánico ^[29]. Este tipo de sistemas pueden verse en la Fig. 1.3 e incluyen a las suspensiones, sistemas vesiculares, emulsiones, nanoemulsiones y microemulsiones ^[30].

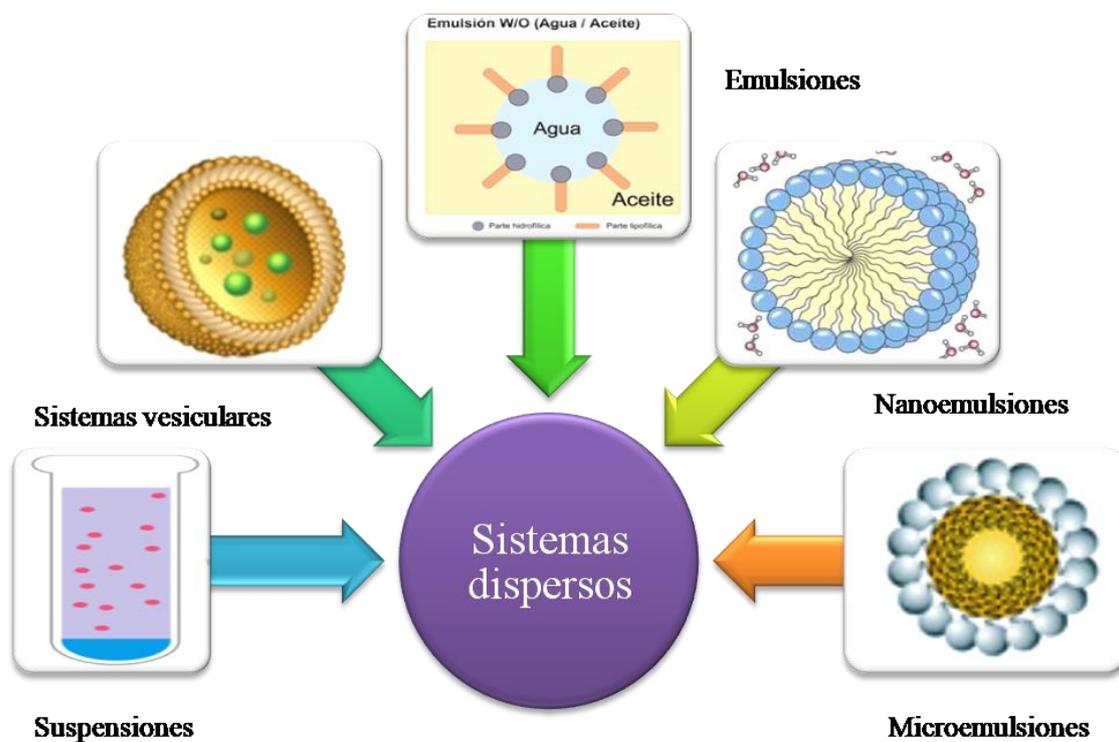


Figura 1.3 Representación de diferentes sistemas dispersos de interés para el desarrollo de PPCPs.

²⁹ KULSHRESHTHA A. K., SINGH O. N., WALL G. M., Pharmaceutical Suspensions: From Formulation Development to Manufacturing, Ed. Springer, 2010, Capítulo 2, 38-66.

³⁰ KULSHRESHTHA A. K., SINGH O. N., WALL G. M., Pharmaceutical Suspensions: From Formulation Development to Manufacturing, Ed. Springer, 2010, Capítulo 1, 1-37.

1.4.1 Suspensiones

Las suspensiones son preparados líquidos constituidos por partículas sólidas dispersadas en una fase líquida en la cual las partículas no son solubles. Estos productos se diseñan para administrarse por diferentes vías como suspensiones inyectables, suspensiones orales, suspensiones tópicas, etc.

1.4.2 Sistemas vesiculares

Las vesículas son estructuras coloidales, que presentan una membrana bimolecular compuestas de agentes con actividad superficial (surfactantes). En exceso de medio acuoso se cierran encapsulando en su interior dicho medio. Existen varios tipos de vesículas: liposomas, niosomas, cubosomas, virosomas, proteosomas, etc.

1.4.3 Emulsiones

Las emulsiones son dispersiones termodinámicamente inestables de dos o más líquidos inmiscibles o parcialmente miscibles. Los diámetros de las gotas líquidas en la fase dispersa se encuentran en el rango de 0,1 a 20 μm . Aunque se traten de dispersiones termodinámicamente inestables, las emulsiones pueden convertirse en cinéticamente estables en la presencia de agentes surfactantes.

1.4.4 Nanoemulsiones

Las nanoemulsiones son sistemas coloidales de un líquido disperso en otro líquido. Estos sistemas son transparentes o translúcidos, no requieren elevadas concentraciones de surfactantes, poseen elevada estabilidad cinética y el tamaño de gota se encuentra comprendido entre 20 y 500 nm. Sin embargo, estas dispersiones son termodinámicamente inestables y sus propiedades dependen del método de preparación.

1.4.5 Microemulsiones

Las microemulsiones (MEs) son definidas como una dispersión conformada por agua, aceite y surfactante(s) que representan un sistema isotrópico y termodinámicamente estable con un diámetro del dominio disperso que puede variar de 1 a 100 nm, generalmente 10 a 50 nm ^[31].

La estructura de las MEs se basa en microgotas esféricas de tamaño uniforme de una de las fases en el seno de la otra. Las microemulsiones directas (oil in water: o/w) están constituidas por gotas de aceite dispersas en la fase acuosa (fase continua). Las partes polares del surfactante están orientadas hacia el exterior de la micela, mientras que las cadenas hidrófobas están orientadas hacia el interior. Por otro lado, las microemulsiones inversas (water in oil: w/o), son obtenidas por la dispersión de una fase acuosa en una fase continua de carácter oleoso. Las cabezas polares se dirigen hacia el interior de la estructura formándose un medio polar que favorece la solubilización de agua o compuestos hidrófilos en su interior. Aparte de las dos estructuras presentadas, hay una tercera clasificación definida para sistemas en los cuales las cantidades de agua y de aceite son similares, resultando una microemulsión bicontínua ^[32]. En este último caso, ambos, el aceite y el agua existen como una fase continua en presencia de una interfase continuamente fluctuante que es estabilizada por un surfactante (Fig. 1.4).

³¹ SLOMKOWSKI S., ALEMAN J. V., GILBERT R. G., HESS M., HORIE K., JONE R. G., KIBISA P., MEISEL I., MORMANN W., PENCZEK S., STEPTO R. F. T., Terminology of polymers and polymerization processes in dispersed systems (IUPAC recommendations 2011), *Pure and Applied Chemistry* 2001, 83, 12, 2229-2259.

³² ACHARYA D. P., HARTLEY P. G., Progress in microemulsion characterization, *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 2012, 17, 5, 274-280.

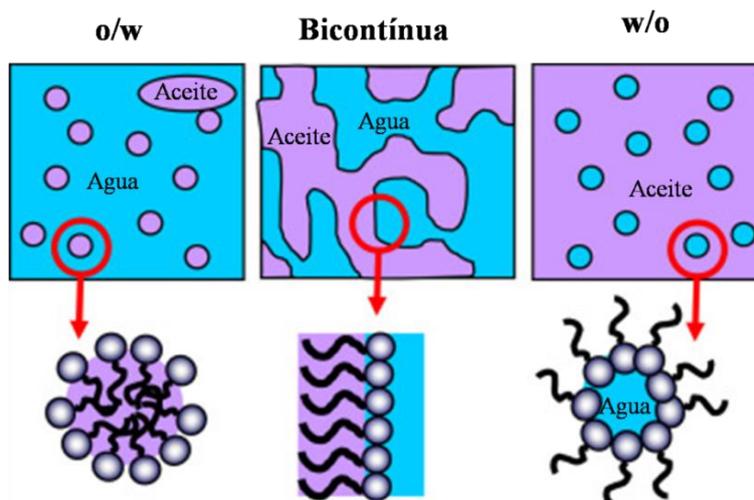


Figura 1.4 Esquema de las estructuras de microemulsiones inversas (w/o), bicontínuas y directas (o/w). Adaptado de ^[33].

Debe considerarse que el término “fase oleosa” se refiere a cualquier líquido insoluble en agua (aceites vegetales, ésteres de ácidos grasos, aceites minerales, aceites esenciales, entre otros). A su vez, la fase acuosa puede estar conformada, además de por agua, por un líquido de características hidrofílicas (propilenglicol, soluciones salinas, polietilenglicol, etc.).

Por otro lado, la fase dispersa es usualmente estabilizada por surfactante(s) o una mezcla surfactante/cosurfactante, quienes disminuyen la tensión interfacial y en consecuencia hacen termodinámicamente favorable el fenómeno de formación de la ME. Una manera simple de describir el proceso de formación de una ME es considerando una subdivisión de la fase dispersada en muy pequeñas gotas. De esta manera, el cambio de entropía configuracional (ΔS_{conf}) puede aproximarse a:

$$\Delta S_{\text{conf}} = -nK_B + \left[\ln \varnothing + \left\{ \frac{1-\varnothing}{\varnothing} \right\} \ln(1 - \varnothing) \right] \quad \text{Ecuación 1.2}$$

donde n es el número de gotas de fase dispersa, K_B es la constante de Boltzmann y \varnothing es la fracción de volumen de fase dispersa. El cambio de energía libre asociado a

³³ FANUN M., Microemulsions as delivery systems, *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 2012, 17, 306-313.

este proceso puede ser expresado como la suma de la energía libre para crear un área de interfase ($\Delta A\gamma_{12}$) y la entropía configuracional (ΔS_{conf}):

$$\Delta G_{\text{form}} = \Delta A\gamma_{12} - T\Delta S_{\text{conf}} \quad \text{Ecuación 1.3}$$

donde ΔA es el cambio en el área interfacial A (igual a $4\pi r^2$ por gota de radio r) y γ_{12} es la tensión interfacial entre las fases 1 y 2 (por ejemplo, aceite y agua) a una temperatura T . Sustituyendo la ecuación 1.2 en la ecuación 1.3 se obtiene la expresión correspondiente a la máxima tensión interfacial entre las fases 1 y 2. En dispersión, el número de gotas se incrementa y ΔS_{conf} es positivo. Si un surfactante puede reducir la tensión interfacial a un valor suficientemente bajo, el término $\Delta A\gamma_{12}$ en la ecuación 1.3 será relativamente pequeño y positivo, permitiendo así un cambio de energía libre de signo negativo y por lo tanto favorable, dando como resultado la formación de una ME.

En un sistema aceite-agua (o/w) libre de surfactante, $\gamma_{o/w}$ está en el orden de 50 mN m⁻¹ y durante la formación de la ME el incremento de ΔA es muy grande (10⁴ a 10⁵). Por ello, en ausencia de surfactante, el segundo término en la ecuación 1.3 es del orden de 1000K_BT, y por ello, para cumplir con la condición $\Delta A\gamma_{12} \leq T\Delta S_{\text{conf}}$, la tensión interfacial debe ser muy baja (aproximadamente 0,01 mN m⁻¹). Algunos surfactantes, como por ejemplo iónicos de doble cadena y algunos no iónicos, pueden reducir significativamente la tensión interfacial (10⁻² a 10⁻⁴ mNm⁻¹). Sin embargo, en la mayoría de los casos, esto no es posible a partir del solo agregado de surfactante ya que puede alcanzarse la concentración micelar crítica antes de lograr un valor bajo de $\gamma_{o/w}$. Por ello, una manera efectiva de disminuir $\gamma_{o/w}$ es incluir una segunda especie activa, la cual puede ser otro surfactante o bien un alcohol de cadena media, denominada cosurfactante. Este hecho puede explicarse fisicoquímicamente por medio de la ecuación de Gibbs extendida para sistemas de multicomponentes. Esta ecuación

relaciona la tensión interfacial con la composición de la capa de surfactante y el potencial químico (μ) de cada componente en el sistema (ecuación 1.4).

$$d\gamma_{o/w} = -\sum_i(\Gamma_i d\mu_i) \approx (\Gamma_i RT d\ln C_i) \quad \text{Ecuación 1.4}$$

donde C_i es la concentración molar del componente i en la mezcla, y Γ_i representa el exceso de superficie (mol m^{-2}). Asumiendo que tanto el surfactante como el cosurfactante son los únicos componentes adsorbidos (es decir, $\Gamma_w = \Gamma_o = 0$) la ecuación 1.4 queda:

$$d\gamma_{o/w} = -\Gamma_s RT d\ln C_s - \Gamma_{Co} RT d\ln C_{Co} \quad \text{Ecuación 1.5}$$

Integrando la ecuación 1.5 se obtiene:

$$\gamma_{o/w} = \gamma_{o/w}^0 - \int_0^{C_s} \Gamma_s RT d\ln C_s - \int_0^{C_{Co}} \Gamma_{Co} RT d\ln C_{Co} \quad \text{Ecuación 1.6}$$

Así podemos ver que $\gamma_{o/w}^0$ puede disminuirse por dos términos, uno correspondiente al surfactante y otro al cosurfactante, siendo sus efectos aditivos. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que las dos especies deben ser adsorbidas simultáneamente, y no deben interactuar entre ellas, es decir, deben ser de diferente naturaleza química, de lo contrario el proceso de formación de la MEs no ocurrirá ^[34].

En la Fig. 1.5 puede verse como disminuye el área interfacial entre un sistema conteniendo un surfactante y un sistema conteniendo una mezcla surfactante-cosurfactante.

³⁴ COSGROVE T., Colloid Science: Principle, Methods and Applications, 2da Edición, Ed. John Wiley & Sons, 2010, Capítulo 5, 91-114.

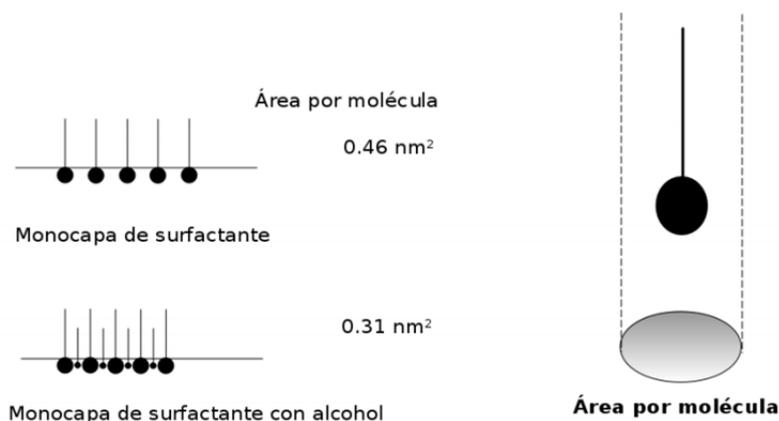


Figura 1.5 Efecto del cosurfactante (un alcohol en este caso) sobre el área molecular del surfactante en una interfase agua-aceite.

Los surfactantes son moléculas anfifílicas ya que presentan en su estructura un grupo hidrofílico y un grupo hidrofóbico [35]. Estos pueden clasificarse de acuerdo con la naturaleza de la carga del grupo polar de la molécula en cuatro clases: aniónicos, catiónicos, anfóteros y no-iónicos [36].

Los surfactantes aniónicos son aquellos que poseen uno o más grupos funcionales que al ionizarse en medio acuoso, proporcionan una o más cargas negativas a la molécula. Ejemplo: dodecil sulfato sódico, lauril éter sulfato de sodio, etc.

Los surfactantes catiónicos son aquellos que en medio acuoso, se cargan positivamente. Entre los más comunes se encuentran los surfactantes cloruro de benzalconio y bromuro de hexadecil trimetilamonio.

Por otro lado, los surfactantes anfóteros poseen en su estructura un grupo ácido y otro básico. Estos compuestos en solución acuosa presentan características aniónicas y catiónicas dependiendo de las condiciones de pH del medio (Ejemplos: N-dodeciltrimetilaminobetaína, 2-aminoetanosulfónico, etc).

³⁵ SAKAMOTO K., LOCHHEAD R. Y., MAIBACH H. I., YAMASHITA Y., *Cosmetic Science and Technology: Theoretical principles and Applications*, Ed. Elsevier, 2017, Capítulo 15, 231-244.

³⁶ VAN OS N. M., HAAK J. R., RUPERT L. A. M., *Physico-chemical properties of select anionic, cationic and non-ionic surfactants*, Ed. Elsevier, 1993.

Finalmente, los surfactantes no-iónicos, también llamados neutros, poseen una cabeza polar que no se disocia para generar cargas en solución acuosa. Algunos ejemplos son ésteres de ácidos grasos de sorbitán (conocido bajo el nombre comercial de Span), los productos etoxilados correspondientes (conocidos como Tween) y los derivados de polioxietileno (donde el número de carbonos que conforman la cadena hidrocarbonada es 12, e incluye un grupo de surfactantes del tipo $C_{12}E_n$, donde E representa cadenas de unidades de óxido etileno y $n= 6, 7, 8, 9, 10$ y 23).

Las microemulsiones empleadas en la administración tópica de moléculas activas utilizan materiales biocompatibles, no tóxicos, aceptables clínicamente y surfactantes en un rango de concentración apropiada. El uso de surfactantes no-iónicos tales como los derivados de polioxietileno son particularmente atractivos debido a su baja irritabilidad y a su elevada estabilidad química.

Por otro lado, el parámetro más característico de un surfactante es su HLB (del inglés, *hydrophilic-lipophilic balance*), que está relacionado con su capacidad emulsionante. Los surfactantes solubles en agua favorecen la formación de emulsiones o/w, mientras que los solubles en aceite favorecen las emulsiones w/o ^[37]. Según Griffin, el HLB es el balance del tamaño y la fuerza entre la parte hidrófila y la parte hidrofóbica de una molécula tensioactiva y se basa en la composición de los grupos moleculares del surfactante ^[38].

El HLB del agente surfactante puede ser usado para la correcta formulación de una ME específica. En la Tabla 1.3 se especifica el rango de HLB correspondiente a distintas aplicaciones.

³⁷ GOODZARDI F., ZENDEHBOUDI S., A Comprehensive Review on Emulsions and Emulsion Stability in Chemical and Energy Industries, *The Canadian Journal of chemical Engineering* 2019, 97, 281-309.

³⁸ GRIFFIN W. C., Classification of surface-active agents by "HLB", *The Journal of the Society of Cosmetic Chemists* 1949, 1, 311-326.

Tabla 1.3 Aplicación de los surfactantes en función de su valor de HLB.

HLB	Aplicación
3-6	emulsiones (w/o)
7-9	agentes humectantes
10-18	emulsiones (o/w)
13-16	detergentes
15-18	solubilizantes

1.5 Aplicaciones de las MEs

Las MEs son en la actualidad sistemas organizados de alta innovación tecnológica, y ocupan un lugar importante entre los nuevos sistemas propuestos para el desarrollo de PPCPs ^[39]. La aplicación de MEs se debe principalmente a las ventajas generales de estos sistemas, como ser fácil preparación, transparencia, estabilidad termodinámica, la posibilidad de vehiculización de diferentes compuestos con distinta solubilidad, y la protección de los mismos frente a diversas variables del entorno, como fotodegradación, termodegradación, pH, entre otros. En general, las MEs son sistemas estables en función del tiempo, sin observarse coalescencia, sedimentación o separación de fases, siempre que se conserve la misma composición y un intervalo de temperaturas adecuado en cada caso.

De esta manera, los sistemas w/o presentan ventajas tales como protección de componentes hidrosolubles, liberación sostenida y aumento de la biodisponibilidad. Vicentini y col. (2008) evaluaron el potencial de una microemulsión w/o como un sistema para el suministro de quercetina como antioxidante ^[40]; Li y col. (2017) propusieron que estos sistemas w/o son vehículos apropiados para administrar insulina

³⁹ FARNUR M., Microemulsions as delivery systems, *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 2012, 17, 5, 306-313.

⁴⁰ VICENTINI F. T. M. C., SIMI T. R. M., DEL SIAMPO J. O., WOLGA O. N., PITOL D. L., IYOMASA M. M., BENTLEY V. L. B., FONSECA M. J. V., Quercetin in w/o microemulsion: *In vitro* and *in vivo* skin penetration and efficacy against UVB-induced skin damages evaluated *in vivo*, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2008, 69, 3, 948-957.

por vía oral ^[41] y, más recientemente, Szumała y col. (2019) demostraron el uso terapéutico de una microemulsión w/o con colágeno y ácido hialurónico para mejorar y regenerar la barrera de la piel envejecida o enferma ^[42].

En el caso de las microemulsiones o/w, estos sistemas proporcionan un aumento de la solubilidad de compuestos lipofílicos, protección de compuestos activos liposolubles y aumento de la biodisponibilidad. Por ejemplo, Araya y col. (2005) diseñaron una nueva microemulsión o/w para mejorar la absorción gastrointestinal de compuestos poco solubles en agua ^[43]; Songkro y col. (2014) investigaron los efectos de sistemas (o/w) en la liberación *in vitro* y permeación en la piel del filtro químico solar benzofenona-3 ^[44]; Zhao y col. (2020) estudiaron la liberación sostenida de lidocaína utilizada en anestesia local ^[45].

Por otro lado, es importante tener en cuenta que el diseño de nuevas formulaciones de MEs para el desarrollo de PPCPs exige una selección adecuada de sus componentes, debiendo presentar los mismos óptimas propiedades fisicoquímicas, así como un bajo potencial alergénico y una alta biocompatibilidad, entre otros.

⁴¹ LI Y., YOKOYAMA W., XU S., SHU S., MA J., ZHONG F., Formation and stability of w/o microemulsion formed by food grade ingredients and its oral delivery of insulin in mice, *Journal of Functional Food* 2017, 30, 134-141.

⁴² SZUMAŁA P., JUNGNICHEL C., KOZŁOWSKA-TYLINGO K., JACYNA B., CAL K., Transdermal transport of collagen and hyaluonic acid using water in oil microemulsion, *International Journal Pharmaceutics* 2019, 572, 15, 118738.

⁴³ ARAYA H., TOMITA M., HAYASHI M., The novel formulation design of o/w microemulsion for improving the gastrointestinal absorption of poorly water soluble compounds, *International Journal Pharmaceutics* 2005, 305, 1, 61-74.

⁴⁴ SONGKRO S., LO N. -L., TANMANEE N., MANEENUAN D., BOONME P., *In vitro* release, skin permeation and retention of benzophenone-3 from microemulsion (o/w and w/o), *Journal of Drug Delivery Science and Tecnology* 2014, 24, 6, 703-711.

⁴⁵ ZHAO Z., LIAN Y., ZHU Y., YE H., LIU M., LI J., Depot lidocaine-loaded microemulsion for prolonged local anesthesia: different efficacy model studies, *Journal of Drug Delivery Science and Tecnology* 2020, 55, 101404.

1.5.1 MEs portadoras de filtros solares

Es reconocido que el rendimiento de una formulación de protector solar depende no solo de las propiedades fisicoquímicas de los filtros, sino también del transportador utilizado para suministrarlo ^[46]. Incluso, la mayoría de los productos de protección solar se han basado en emulsiones, aceites y geles que, a pesar de sus ventajas, también tienen algunas limitaciones importantes, como la lavabilidad en agua, la inestabilidad y la mayor absorción percutánea de sus componentes ^[47,48].

Por lo tanto, diversos autores proponen diversos vehículos para superar estas limitaciones y garantizar una eficacia adecuada de los filtros solares. Estos portadores son microesferas ^[45], nanopartículas ^[49], liposomas ^[50], nanoemulsiones ^[51] y microemulsiones ^[52, 53]. Se ha demostrado que estos sistemas organizados mejoran la acumulación del filtro solar en el sitio de administración, elevan la resistencia al agua, y aumentan el FPS y la fotoestabilidad de estos compuestos activos ^[48, 54, 55]. En este

⁴⁶ LIONETTI N., RIGANO L., The new sunscreens among formulation strategy, stability issues, changing norms, safety and efficacy evaluations, *Cosmetics* 2017, 4, 2, 15.

⁴⁷ OLVERA-MARTÍNEZ B. I., CÁZARES-DELGADILLO J., CALDERILLA-FAJARDO S. B., VILLALOBOS-GARCIA R., GANEM QUINTANAR A., QUINTANAR-GUERRERO D., Preparation of polymeric nanocapsules containing octyl methoxycinnamate by the emulsification-diffusion technique: penetration across the stratum corneum, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2005, 94, 7, 1552-1559.

⁴⁸ PUGLIA C., DAMIANI E., OFFERTA A., RIZZA L., TIRENDI G. G., TARICO M. S., CURRERI S., BONINA F., PERROTTA R. E., Evaluation of nanostructured lipid carriers (NLC) and nanoemulsions as carriers for UV-filters: Characterization, *in vitro* penetration and photostability studies, *European Journal of Pharmaceutics Sciences* 2014, 51, 23, 211-217.

⁴⁹ JIMÉNEZ M. M., PELLETIER J., BOBIN M. F., MARTINI M. C., Influence of encapsulation on the *in vitro* percutaneous absorption of octyl methoxycinnamate, *International Journal of Pharmaceutics* 2004, 272, 1, 45-55.

⁵⁰ SHI L., SHAN J., JU Y., AIKENS P., PRUD'HOMME R. K., Nanoparticles as delivery for sunscreens agents, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2012, 396, 122-129.

⁵¹ MONTEIRO M. M. S. B., OZZETTI R. A., VERGNANINI A. L., BRITO-GITIRANA L., VOLPATO N. M., FREITAS Z. M. F., RICCI-JÚNIOR E., SANTOS E. P., Evaluation of octyl p-methoxycinnamate included in liposomes and cyclodextrins in anti-solar preparations: preparations, characterizations, and *in vitro* penetration studies, *International Journal Nanomedicine* 2012, 7, 3045-3058.

⁵² MORGANTI P., Use and potential of nanotechnology in cosmetic dermatology, *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology* 2010, 3, 5-13.

⁵³ PUGLIA C., BONINA F., RIZZA L., BLAZI P., SCHOUBENN A., PERROTTA R., TARICO M. S., DAMIANI E., Lipid nanoparticles as carrier for octyl-methoxycinnamate: *In vitro* percutaneous absorption and photostability studies, *Journal of Pharmaceutics Sciences* 2012, 101, 1, 301-311.

⁵⁴ VETTOR M., PERUGINI P., SCALIA S., CONTI B., GENTA I., MODENA T., PAVANETTO F., Poly (D, L-lactide) nanoencapsulation to reduce photoinactivation of a sunscreen agent, *International Journal of Cosmetic Science* 2008, 30, 3, 219-227.

sentido, las MEs poseen la capacidad de mejorar la fotoestabilidad de los absorbentes UV fotolábiles y permiten la liberación sostenida del compuesto activo, reduciendo la irritación a la piel debido a altas concentraciones del mismo ^[56]. Además, los componentes cargados en este tipo de sistemas también podrían ser protegidos frente a la degradación química, mejorando así la estabilidad de los mismos.

Montenegro y col. (2011) y Jiménez y col. (2004) evaluaron la liberación *in vitro* y la permeación del filtro químico solar octil p-metoxicinamato, demostrando un mejoramiento de la cinética de estos procesos cuando el mismo se encuentra cargado en MEs. Además, Santoro y col. (2005) estudiaron la estabilidad de una formulación conteniendo octil p-metoxicinamato y benzofenona-3 almacenada en diferentes tipos de materiales de embalaje (frascos de vidrio y plástico; tubos de plástico y tubos metálicos) mediante cromatografía líquida ^[57].

El desarrollo de nuevos sistemas portadores de filtros químicos solares basados en MEs requiere en primera instancia una serie exhaustiva de estudios previos a su evaluación en sistemas biológicos, ya sean *in vitro* o *in vivo*. Dentro de los mismos se incluyen estudios fisicoquímicos en los cuales en primer lugar se determina la relación apropiada de los componentes (fase acuosa, fase oleosa y surfactante-cosurfactante) para formar MEs. Posteriormente, se evalúa la capacidad de carga de la ME con la(s) molécula(s) de interés, y finalmente se caracterizan los sistemas cargados en términos de tamaño de partícula, polidispersidad, conductividad, pH, índice de refracción y estabilidad, entre otros. A continuación, es necesario llevar a cabo estudios analíticos en

⁵⁵ DAMIANI E., PUGLIA C., Nanocarriers and microcarriers for enhancing the UV protection of sunscreens: An overview, *Journal of Pharmaceutics Sciences* 2019, 108, 12, 3769-3780.

⁵⁶ MONTENEGRO L., CARBONE C., PUGLISI C., Vehicles effects on in vitro release and skin permeation of octyl methoxycinnamate from microemulsions, *International Journal of Pharmaceutics* 2011, 405, 1, 162-168.

⁵⁷ SANTORO M. I. R. M., OLIVEIRA D. A. G. C. E., KEDOR-HACKMANN E. R. M., SINGH A. K., The effect of packaging materials on the stability of sunscreen emulsions, *International Journal of Pharmaceutics* 2005, 297, 1, 197-203.

el sistema propuesto, con el fin de evaluar su comportamiento frente a diversas variables (fotodegradación, temperatura, pH, entre otros), determinar su cinética de permeación en el órgano blanco (*in vitro*, *in vivo*, *ex vivo*) y cuantificar la(s) molécula(s) activa(s) y los demás componentes de la ME.

1.6 Estudios analíticos en MEs

El desarrollo de métodos analíticos que permitan el estudio en sistemas organizados del tipo de las MEs resulta un desafío importante en el campo de la Química Analítica. Esto se debe principalmente a que las propiedades fisicoquímicas de las especies químicas en un medio organizado pueden diferir respecto de aquellas en otros medios. Por consiguiente, en muchos casos, los métodos analíticos que se disponen para el estudio de una determinada especie química no son útiles cuando ésta se encuentra formando parte de MEs. Esto hace que el desarrollo de nuevos métodos analíticos para el estudio de dichos sistemas resulte un tema innovador dentro de esta disciplina, ya que hay que considerar el medio en que se encuentra la especie química y el comportamiento cuando la misma se encuentra en un sistema organizado.

Los análisis cualitativo y cuantitativo de filtros químicos solares en productos cosméticos se basan en la primera directiva Europea sobre análisis de productos cosméticos (80/1335/CEE), en la cual se abordan aspectos como la toma y tratamiento de muestras en función del tipo y del estado físico del producto cosmético, además de incluirse protocolos de análisis para unos pocos compuestos utilizados en las formulaciones cosméticas. Por otro lado, el desarrollo de herramientas analíticas resulta aún más desafiante si pueden emplearse técnicas de menor costo, mayor simplicidad de uso y mayor rapidez en la obtención y análisis de la respuesta analítica. Además, un aspecto de gran importancia es el desarrollo de metodologías amigables con el ambiente, las cuales deben cumplir con los 12 principios propuestos por la Química

Verde (Fig. 1.6) ^[58]. En este sentido, las técnicas espectroscópicas asociadas con diversas herramientas quimiométricas permiten el manejo, análisis y aprovechamiento de gran cantidad de información, lo que se traduce en resultados con calidad analítica. Por otro lado, la automatización de los procesos analíticos contribuye a mejorar la performance de la metodología propuesta. De esta manera, las ventajas inherentes a estas técnicas pueden en combinación proporcionar métodos que mejoren significativamente la calidad analítica de los resultados, disminuir los costos y facilitar su implementación en los laboratorios de control.



Figura 1.6 Los doce principios de la Química Verde.

1.6.1 Técnicas Espectroscópicas

La espectroscopía es una herramienta invaluable en química y posee aplicaciones en diversos campos de la industria y la investigación (Fig. 1.7). Básicamente, la espectroscopia estudia la interacción entre la radiación electromagnética y la materia. Esto dio lugar al desarrollo de técnicas de análisis basadas en la absorción de radiación, como ser la espectroscopía de absorción molecular UV-Vis, emisión de radiación, como por ejemplo la espectroscopía de fluorescencia molecular, y técnicas basadas en la dispersión de la radiación, como es la espectroscopía

⁵⁸ ANASTAS P., EGHBALI N., Green Chemistry: Principles and Practice, *Chemical Society Reviews* 2010, 39, 301-312.

Raman, entre muchas otras. Una ventaja importante del uso de estas técnicas, es la posibilidad de obtener, cuando la instrumentación lo permite, un gran volumen de datos. Sin embargo, en algunas técnicas (sobre todo en la espectroscopía de absorción molecular y, a veces, en la espectroscopía de fluorescencia molecular) la selectividad resulta insuficiente, debido principalmente a la gran cantidad de moléculas que absorben radiación en la región UV-Vis, o bien, emiten radiación cuando son debidamente excitadas.

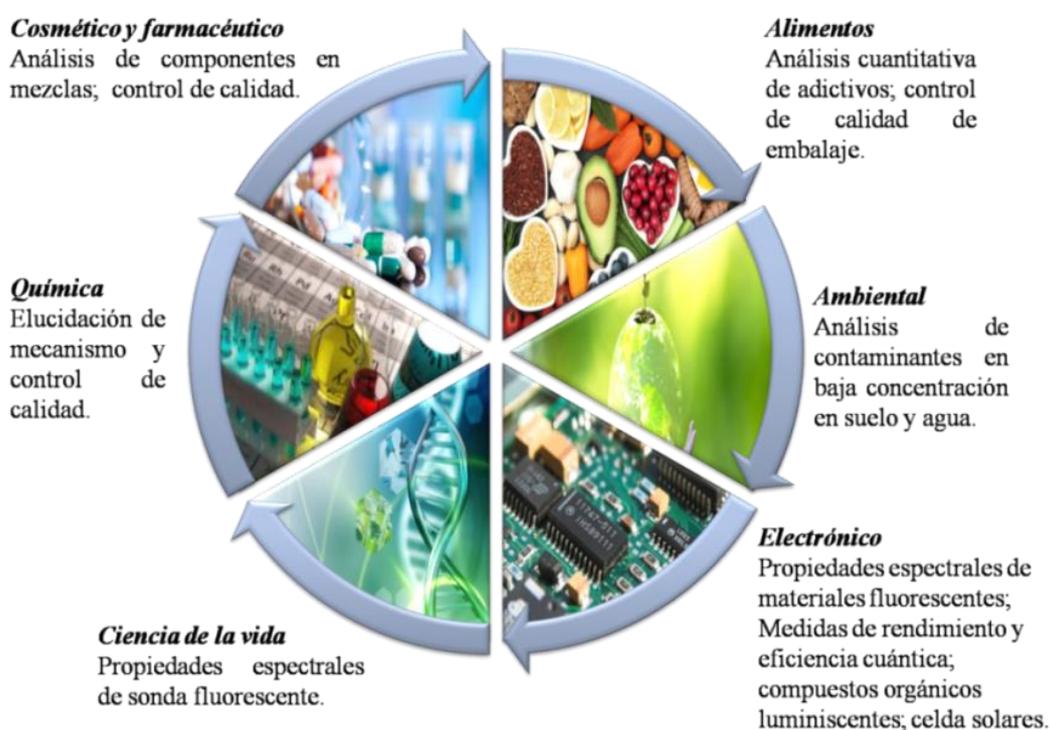


Figura 1.7 Técnicas espectroscópicas con aplicaciones en diversos campos de la industria y la investigación.

Una manera eficiente de potenciar las ventajas de las técnicas espectroscópicas y, además, solucionar ciertos inconvenientes inherentes a las mismas, es la utilización de diversas herramientas quimiométricas que permitan procesar los datos espectrales obtenidos por una determinada de técnica.

1.6.2 Técnicas quimiométricas

La quimiometría es una disciplina que utiliza métodos matemáticos y estadísticos basados en la lógica, para resolver problemas en el campo de la química, transformando señales analíticas y datos complejos en información útil ^[59]. Estas herramientas pueden emplearse tanto para la optimización de los procedimientos experimentales, el pretratamiento de datos, y procedimientos para el análisis de clasificación y calibración en sistemas de multicomponentes.

La metodología estadística para optimizar la experimentación se conoce como *diseño experimental* ^[60]. El diseño experimental puede ser definido como un conjunto de pruebas en las cuales se realizan cambios en los parámetros de control de un proceso o sistema, para observar e identificar las razones de los cambios en la variable de salida o respuesta del proceso. En este sentido, un método analítico es en sí mismo un procedimiento o proceso. Por lo tanto, el diseño experimental propone por un camino eficiente, obtener la optimización de un proceso analítico con un mínimo de experimentos, y puede ser aplicado en dos contextos:

- ✚ Describir la serie de experimentos que será llevada a cabo con la intención de desarrollar un modelo; por ejemplo, un modelo de regresión.

- ✚ La optimización de un proceso analítico para determinar las condiciones que son requeridas para obtener un resultado óptimo y de calidad analítica.

Por otro lado, el preprocesamiento de datos es uno de los pasos más importantes previo a la aplicación de un modelo quimiométrico de clasificación y/o calibración. Los métodos de pretratamiento se basan en la aplicación de diversos algoritmos a los datos

⁵⁹ KUMAR N., BANSAL A., SARMA G. S., RAWAL R. K., Chemometrics tools used in analytical chemistry: An overview, *Talanta* 2014, 123, 186-199.

⁶⁰ ZIEGEL E. R., Chemometrics: Experimental design, *Technometrics* 1993, 35, 1, 99.

obtenidos con el fin de eliminar o minimizar la variación indeseada en los mismos como el ruido instrumental, desplazamiento de la línea de base, etc ^[61].

Existe una gran cantidad de técnicas de pretratamiento de datos como por ejemplo: centrado, autoescalado, normalización de la señal, deconvolución, filtrado de la señal, sustracción del ruido de fondo, ponderación de las variables, aplicación de una transformación no lineal, derivación y corrección de línea de base, entre otras. Es importante mencionar que la calidad de los resultados está significativamente influenciada por el pretratamiento de datos, por lo que el tipo de preprocesamiento aplicado debe ser estudiado y seleccionado cuidadosamente antes de la aplicación de una determinada técnica quimiométrica. Una vez pre-procesados los datos y seleccionado el modelo adecuado, se puede proceder a la estimación y optimización del modelo de clasificación y/o cuantificación.

En lo que respecta al análisis cualitativo de muestras, las técnicas de reconocimiento de patrones son herramientas quimiométricas ampliamente utilizadas las cuales están basadas en la identificación de relaciones y/o vínculos entre objetos. Esas técnicas utilizan la información química (señal analítica) obtenida para discriminar las muestras en clases o categorías, considerando sus diferencias y similitudes. Las técnicas de reconocimiento de patrones pueden dividirse en: *no supervisadas* y *supervisadas* ^[62].

Las técnicas de reconocimiento de patrones no supervisadas evalúan la existencia de agrupamientos naturales utilizando solamente informaciones provenientes de una técnica analítica, sin considerar información previa acerca de los miembros de las clases. Dentro de las técnicas de reconocimiento de patrones no supervisadas más conocidas y aplicadas en Química Analítica, se destaca el *análisis de componentes*

⁶¹ GERRETZEN J., SZYMAŃSKA E., JANSEN J. J., BART J., VAN MANEN H., VAN DEN HEUVEL E. R., BUYDENS L. M. C, Simple and effective way for data preprocessing selection based on design of experiments, *Analytical Chemistry* 2015, 87, 24, 12096-12103.

⁶² HOPKE P. K., The evolution of chemometrics, *Analytica Chimica Acta* 2003, 500, 1, 365-377.

principales, PCA (del inglés, *Principal Component Analysis*). El PCA facilita la representación gráfica del conjunto de datos, facilitando consecuentemente la interpretación de los resultados ^[63].

Las técnicas de reconocimiento de patrones supervisados están basadas en el modelaje de un conjunto de muestras de categoría conocida, denominado conjunto de entrenamiento, utilizando por ello información adicional acerca de los miembros de las clases. El modelo así obtenido es posteriormente empleado en la identificación de muestras desconocidas. Dentro de este grupo de métodos se destacan el *análisis discriminante lineal*, LDA (del inglés, *Linear Discriminant Analysis*) ^[64] y el *modelado suave independiente por analogía de clases*, SIMCA (del inglés, *Soft Independent Modeling by Class Analogy*) ^[65].

Por último, debemos considerar las técnicas quimiométricas utilizadas en procesos de calibración multivariada. Estas comprenden un gran número de algoritmos que permiten el análisis cuantitativo en sistemas de multicomponentes, y resultan de gran interés cuando se cuenta con datos de origen espectrométrico. Estas técnicas permiten resolver problemas tales como presencia de interferentes, solapamiento espectral u otros efectos de la matriz de la muestra, sin pasos previos de separación. Estas técnicas pueden ser de primer orden, en el caso de obtener un vector de datos por cada muestra (por ejemplo, espectros de absorbancia, espectros de fluorescencia, etc.), o de segundo orden, lo que sería una matriz de datos por muestra (por ejemplo, espectros de fluorescencia en función del tiempo). Dentro de los algoritmos de calibración multivariada de primer orden más utilizados tenemos la *regresión de componentes*

⁶³ HOTELLING H., Analysis of a complex of statistical variables into principal components. *Journal of Educational Psychology* 1993, 24, 6, 417-441.

⁶⁴ PONTES M. J. C., GALVÃO R. K. H., ARAÚJO M. C. U., MOREIRA P. N. T., NETO O. D. P., JOSÉ G. E., SALDANHA T. C. B., The successive projections algorithm for spectral variable selection in classification problems, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 2005, 78, 1, 11-18.

⁶⁵ DUDA R. O., HART P. E., STORK D. G., Pattern Classification, 2da Edición, Ed. John Wiley & Sons, 2001.

principales, PCR (del inglés, *Principal Component Regression*) y los *cuadrados mínimos parciales*, PLS (del inglés, *Partial Least-Squares*)^[66]. Por último, diversos algoritmos para el análisis de datos de segundo orden son utilizados en el análisis de datos en Química Analítica, destacándose la técnica de *resolución multivariada de curvas optimizada mediante mínimos cuadrados alternados*, MCR-ALS (del inglés, *Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares*) aprovechando, de esta manera, la llamada ventaja de segundo orden y permitiendo cuantificar una especie química en presencia de otras sustancias no modeladas^[67].

1.6.3 Sistemas automáticos

La gran demanda de análisis químicos de diversos sectores estimuló el desarrollo de la automatización en el campo de la Química Analítica. La automatización implica la sustitución parcial o completa de la participación humana en una operación o secuencia de operaciones. La IUPAC (del inglés, *International Union of Pure and Applied Chemistry*) define a la automatización como “*el empleo combinado de dispositivos, aparatos e instrumentos para sustituir, ampliar o suplementar el esfuerzo, los sentidos y la inteligencia humana en el desarrollo de un proceso*”. De esta manera, la automatización permite reducir la participación humana, con la consecuente reducción de errores, permite la utilización de pequeños volúmenes de muestra y reactivos, y simplifica de forma considerable el proceso analítico.

En general, los analizadores automáticos pueden clasificarse a partir de la forma en que las muestras son transportadas y manipuladas en el sistema. A partir de esto tenemos:

⁶⁶ WOLD S., SJÖSTRÖM M., ERIKSSON L., PLS-regression: a basic tool of chemometrics, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 2001, 58, 2, 109-130.

⁶⁷ GARRIDO M., RIUX F. X., LARRECHI M. S., Multivariate curve resolution-alternating least squares (MCR-ALS) applied to spectroscopic data from monitoring chemical reactions processes, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2008, 309, 8, 2059-2066.

✚ *Analizadores Discretos o Analizadores en Batch.* En estos sistemas la muestra preserva su integridad en un recipiente y es transportada mecánicamente a distintas zonas del analizador, donde de manera secuencial son llevados a cabo diferentes procedimientos analíticos, como ser dilución, agregado de reactivos, mezclado, calentamiento, etc. Finalmente, la muestra es llevada al detector, donde son registradas las señales (Fig. 1.8).

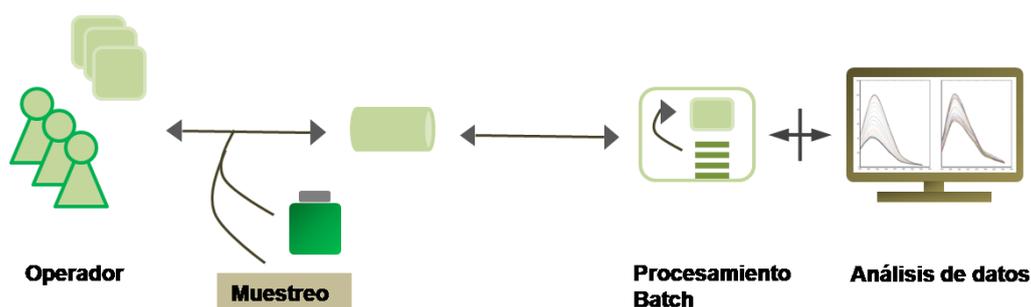


Figura 1.8 Esquema básico de un proceso realizado mediante un analizador discreto o batch.

✚ *Analizadores Continuos.* Están caracterizados por el uso de una corriente continua de líquido o en algunos casos un gas. Las muestras, usualmente líquidas, son introducidas secuencialmente a intervalos regulares en un canal portando un líquido, pudiendo confluir o no, con otro canal portador de reactivos, solución reguladora, etc. Una vez alcanzado el detector, generalmente provisto con una celda de flujo, la mezcla resultante genera una señal analítica que es registrada (Fig. 1.9). Las principales ventajas que poseen estos sistemas son su versatilidad, rapidez, precisión, facilidad de operación y bajo costo. Además, es posible acoplar distintos procesos en línea (calentamiento, extracción líquido-líquido, filtración, etc.) ^[68], así como monitorear en

⁶⁸ VALCÁRCEL M., LUQUE DE CASTRO M. D., Automatic methods of analysis, 1ra edición, Ed. Elsevier Science, 1988.

tiempo real diversos procesos cinéticos como ser, fotodegradación, permeación, entre otros ^[69].

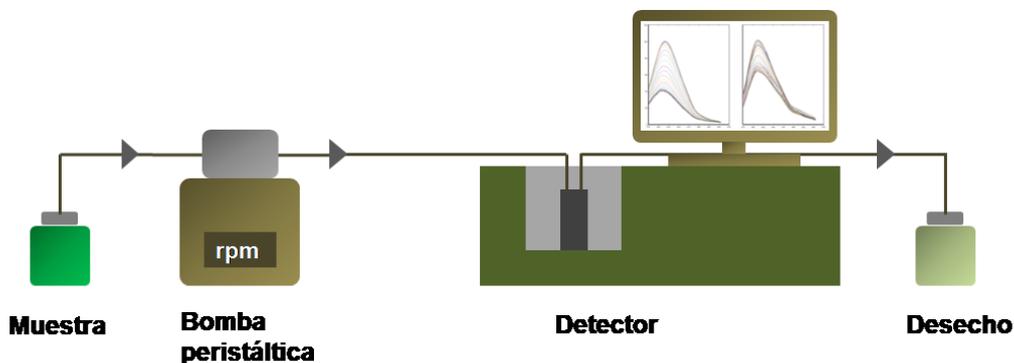


Figura 1.9 Componentes básicos de un sistema en flujo continuo.

En los últimos años, existe una tendencia en el diseño de procedimientos amigables con el ambiente en Química Analítica ^[70] y, en este sentido, la automatización es una herramienta que facilita significativamente dicho objetivo.

Finalmente podemos decir que el análisis y control de nuevas formulaciones cosméticas es una actividad fundamental para conseguir y garantizar la calidad de los mismos. A tal fin, es un constante desafío para los laboratorios que ejercen el respectivo control, la implementación de métodos rápidos, automáticos, sencillos y de bajo impacto en el ambiente para el monitoreo de las distintas etapas que comprende el desarrollo, la producción y comercialización de una formulación de un determinado producto.

⁶⁹ KLIMUNDOVÁ J., MERVARTOVÁ K., SKLENÁROVÁ H., SOLICH P., POLÁSECK M., Automated sequential injection fluorimetric set-up for multiple release testing of topical formulation, *Analytical Chimica Acta* 2006, 573, 574, 360-370.

⁷⁰ MELCHERT W. R., REIS B. F., ROCHA F. R. P., Green Chemistry and the evolution of flow analysis. A review, *Analytical Chimica Acta* 2012, 714, 8-19.

Capítulo 2

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MICROEMULSIONES PORTADORAS DE OCTIL P-METOXICINAMATO

Capítulo 2. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MICROEMULSIONES PORTADORAS DE OCTIL P-METOXICINAMATO

2.1 Objetivos

Obtener microemulsiones del tipo aceite en agua (o/w) a partir de materiales biocompatibles y de uso común en la elaboración de productos farmacéuticos y de cuidado personal (PPCPs), capaces de cargar el filtro químico solar octil p-metoxicinamato (OMC) en concentraciones suficientes para brindar una apropiada protección frente a la radiación UV. Adicionalmente, se pretende evaluar como fase oleosa el uso de aceite esencial de albahaca (AEA) para la síntesis de una formulación con propiedad antiinflamatoria y repelente de insectos. A continuación, se plantea caracterizar fisicoquímicamente las microemulsiones obtenidas, evaluar su estabilidad, y en base a los resultados seleccionar los sistemas más adecuados para el posterior estudio analítico de los mismos.

2.2 Introducción

El octil p-metoxicinamato (OMC) es una molécula orgánica ampliamente utilizada como filtro químico solar en preparaciones tópicas. Debido a su gran lipofilia y un alto coeficiente de partición ($\log P = 5,96$), resulta muy apropiado el uso de OMC en productos a prueba de agua. Además, su aplicación es bien tolerada y presenta niveles muy bajos de irritación de la piel ^[71]. El OMC se utiliza principalmente como filtro UVB, aunque su espectro de absorción se extiende hasta el UVA ^[72].

Este principio activo presenta isomería configuracional, siendo el isómero *trans* el que cuenta con un apropiado coeficiente de absorción molar ($24,000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ^[73]. Sin embargo, este filtro químico ha demostrado ser sensible a la radiación, registrando una disminución en la eficiencia de protección frente a la exposición solar. Este hecho está directamente relacionado, con el proceso de fotoisomerización del OMC, en el cual el isómero *trans* (E) se fotoisomeriza al isómero *cis* (Z) ^[74]. Aunque los dos isómeros tienen un máximo de longitud de onda de absorción similar, el isómero *cis* tiene un coeficiente de absorción molar significativamente más bajo ($12,600 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

De esta manera, Huong y col. (2007) demostraron que el OMC en su forma libre puede reducir el FPS de una formulación en más del 30%. Además, los mismos autores demostraron que diversos sistemas portadores pueden tener una fuerte influencia en la efectividad y la estabilidad de este filtro químico. Por esta razón, se han propuesto hasta

⁷¹ KANLAYAVATTANAKUL M., KASIKAWATANA N., LOURITH N., Analysis of octyl methoxycinnamate in sunscreens products by a validated UV-Spectrophotometric method, *Journal of Cosmetic Science* 2016, 67, 3, 167-173.

⁷² DONDI D., ALBINI A., SERPONE N., Interactions between different solar UVB/UVA filters contained in commercial suncreams and consequent loss of UV protection, *Photochemical and Photobiological Sciences* 2006, 5, 835-843.

⁷³ HOUNG S. P., ANDRIEU V., REYNEIR J. P., ROCHER E., FOURNERON J. D., The photoisomerization of the sunscreen ethylhexyl p-methoxycinnamate and its influence on the sun protection factor, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2007, 186, 1, 65-70.

⁷⁴ PATTANAARGSON S., LIMPHONG P., Stability of octyl methoxycinnamate and identification of its photo-degradation product, *International Journal of Cosmetic Science* 2001, 23, 3, 153-160.

el momento diversos sistemas portadores de OMC. Por ejemplo, Olvera-Martinez y col. (2005) prepararon nanocápsulas poliméricas con OMC para evaluar su perfil de distribución *in vivo* a través del estrato córneo ^[75]; Carlotti y col. (2005) estudiaron la fotoestabilidad de OMC cuando se encuentra en nanopartículas lípidas sólidas ^[76]; Carlotti y col. (2007) estudiaron la degradación fotoquímica del OMC vehiculizado en un gel, una emulsión y en un éster emoliente ^[77]; Puglia y col. (2012) evaluaron las nanopartículas sólidas como vehículos portadores de OMC para su liberación *in vitro* y absorción en piel humana ^[78].

Como se ha mencionado anteriormente, las MEs presentan numerosas ventajas y resultan una excelente alternativa como sistemas portadores para un amplio espectro de compuestos. Estos sistemas son capaces de cargar cantidades considerables de sustancias de diversa polaridad, ya que presentan amplios dominios acuosos, oleosos e interfaciales en su estructura ^[79]. Es importante destacar que el diseño de una ME requiere, en primer lugar, evaluar el tipo de sistema (o/w, w/o ó bicontinua), para lo cual es necesario tener en cuenta la polaridad de la especie a cargar. Así, dadas las características altamente apolares del OMC, resulta conveniente el desarrollo de un sistema del tipo o/w, debido a que el fármaco permanecerá cargado en una fase dispersa de característica oleosa. Se han reportado trabajos donde se obtuvieron MEs del tipo o/w

⁷⁵ OLVERA-MARTÍNEZ B. I., CÁZARES-DELGADILLO J., CALDERILLA-FAJARDO S. B., VILLALOBOS-GARCIA R., GANEM QUINTANAR A., QUINTANAR-GUERRERO D., Preparation of polymeric nanocapsules containing octyl methoxycinnamate by the emulsification-diffusion technique: penetration across the stratum corneum, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2005, 94, 7, 1552-1559.

⁷⁶ CARLOTTI M. E., SAPINO S., VIONE D., PELIZZETTI E., UGAZIO E., MOREL S., Study on the photostability of octyl-p-methoxy cinnamate in SLN, *Journal of Dispersion Science and Technology*, 2005, 26, 6, 809-816.

⁷⁷ CARLOTTI M. E., SAPINO S., VIONE D., MINERO C., TROTTA M., GALLARATE M., Photostability of octyl-p-methoxy cinnamate in o/w emulsion and in SLNs vehicled in the emulsions, *Journal of Dispersion Science and Technology* 2007, 28, 7, 1034-1043.

⁷⁸ PUGLIA C., BONINA F., RIZZA L., BLAZI P., SCHOUBENN A., PERROTTA R., TARICO M. S., DAMIANI E., Lipid nanoparticles as carrier for octyl-methoxycinnamate: In vitro percutaneous absorption and photostability studies, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2012, 101, 1, 301-311.

⁷⁹ ACHARYA D. P., HARTLEY P. G., Progress in microemulsion characterization, *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 2012, 17, 5, 274-280.

portadoras de filtros químicos solares como benzofenona-3^[80] y 4-metilbenzilideno alcanfor^[81]. En la mayoría de los casos, se logró una efectiva protección contra la radiación solar, y se consiguió un efecto impermeable, de fácil dispersión en la piel y con una gran estabilidad de los componentes activos^[82].

Por otro lado, el correcto diseño de una ME exige una selección adecuada de sus componentes, en cuanto a sus características fisicoquímicas (viscosidad, punto de fusión, estabilidad química, naturaleza iónica, HLB, entre otras) y principalmente de biocompatibilidad (pH, ausencia de toxicidad, poder sensibilizante o irritante, entre otras)^[83].

2.2.1 Fase oleosa

Los aceites vegetales y los aceites esenciales son compuestos naturales de gran uso en la formulación de PPCPs. La principal diferencia entre ambos se encuentra en su composición química, la cual se ve afectada por el origen, parte o tipo de la planta utilizada, y por el método de extracción. Los aceites vegetales son sustancias extraídas de las partes grasas de las plantas (fruto ó semilla). Están conformados por ácidos grasos naturales, vitaminas liposolubles, antioxidantes y oligoelementos, que contribuyen a la nutrición y protección de la piel^[84]. Además, estos componentes ayudan a conservar la parte hidrolipídica de la piel, evitando la pérdida de agua y manteniendo su estado de hidratación natural. Se han reportado numerosos trabajos

⁸⁰ SONGKRO S., LO N. -L., TANMANEE N., MANEENUAN D., BOONME P., *In vitro* release, skin permeation and retention of benzophenone-3 from microemulsion (o/w and w/o), *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 2014, 24, 6, 703-711.

⁸¹ CARLOTTI M. E., GALLARATE M., ROSSATO V., O/W microemulsion as a vehicle for sunscreens, *Journal of Cosmetic Sciences* 2003, 54, 451-462.

⁸² BOONME P., Applications of microemulsions in cosmetics, *Journal of Cosmetic Dermatology* 2007, 6, 4, 223-228.

⁸³ FANUN M., Microemulsions as delivery systems, *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 2012, 17, 5, 306-313.

⁸⁴ GORE E., PICARD C., SARAVY G., Spreading behavior of cosmetic emulsions: Impact of the oil phase, *Biotribology* 2018, 16, 17-24.

empleando este tipo de aceites para el desarrollo de MEs, como aceite de soja ^[85], aceite de limón ^[86 87], aceite de sésamo ^[88] y los aceites de castor y de girasol ^[89].

Particularmente, el ácido oleico (AO) es un ácido que presenta numerosas aplicaciones dentro del campo de la tecnología farmacéutica. Su utilización como emoliente, vehículo oleoso, promotor de la absorción a través de la piel y solvente de numerosas sustancias de aplicación tópica lo hace presente en distintos PPCPs, tales como cremas, emulsiones, bronceadores y protectores solares. A su vez, el AO se ha propuesto como fase oleosa en diversos sistemas de MEs ^[90 91]. Químicamente, el AO es un ácido graso monoinsaturado de la serie omega 9, típico de los aceites vegetales (Fig. 2.1). Su fórmula molecular es $C_{18}H_{34}O_2$ y su peso molecular $282,46 \text{ g mol}^{-1}$.

⁸⁵ MA Q., DAVIDSON P. M., ZHONG Q., Antimicrobial properties of microemulsions formulated with essential oils, soybean oil, and tween 80, *International Journal of Food Microbiology* 2016, 226, 2, 20-25.

⁸⁶ LV X., CONG Z., LIU Z., MA X., XU M., TIAN Y., ZHANG X., XU B., ZHANG J., TANG Z., Improvement of the solubility, photostability, antioxidant activity and UVB photoprotection of trans-resveratrol by essential oil based microemulsions for topical application, *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 2018, 48, 346-354.

⁸⁷ CALLIGARIS S., MANZOCCO L., VALOPPI F., COMUZZO P., NICOLI M. C., Microemulsions as delivery systems of lemon oil and β -carotene into beverages: stability test under different light conditions, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2019, 99, 15, 7016-7020.

⁸⁸ NAZARI M., MEHRNIA M. A., JOOYANDER H., BARZEGAR H., Preparation and characterization of water in sesame oil microemulsion by spontaneous method, *Journal of Food Process Engineering* 2019, 42, 4, 1-8.

⁸⁹ PAKKANG N., URAKI Y., KODA K., NITHITANAKUL M., CHAROENSAENG A., Preparation of water-in-oil microemulsion from the mixtures of castor oil and sunflower oil as makeup remover, *Journal of Surfactants and Detergents* 2018, 21, 6, 809-816.

⁹⁰ MONTENEGRO L., LAI F., OFFERTA A., SARPIETRO M. G., MICICCHÈ L., MACCIONI A. M., VALENTI D., FADDA A. M., From nanoemulsions to nanostructured lipid carriers: A relevant development in dermal delivery of drugs and cosmetics, *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 2016, 32, 100-112.

⁹¹ RHEE Y. S., CHOI J. G., PARK E. S., CHI S. C., Transdermal delivery of ketoprofen using microemulsions, *International Journal of Pharmaceutics* 2001, 228, 1, 161-170.

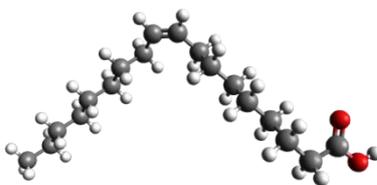


Figura 2.1 Fórmula estructural del ácido oleico. Los átomos se representan como esferas con codificación de colores convencionales: carbono (gris), hidrogeno (blanco) y oxígeno (rojo).

Por otro lado, los aceites esenciales son las sustancias aromáticas naturales responsables de las fragancias de las flores y otros órganos vegetales que se obtienen, en la mayoría de los casos, mediante arrastre en corriente de vapor de agua o por expresión del pericarpio en el caso de los cítricos. Son líquidos con escasa solubilidad en agua, solubles en alcoholes y en disolventes orgánicos, constituidos por mezclas complejas y muy variables que pertenecen, de forma casi exclusiva, al grupo de los terpenos y, en menor medida, al grupo de los compuestos aromáticos derivados del fenilpropano (aldehído cinámico, eugenol, anetol, aldehído anísico y safrol, entre otros). Los aceites esenciales poseen numerosas acciones farmacológicas, por lo que constituyen la base de la aromaterapia, pero además son ampliamente utilizados en perfumería y cosmética ^[92].

Dentro de sus acciones farmacológicas, los aceites esenciales presentan diversas características y propiedades del tipo calmante, tónico, antiinflamatorio, antiséptico, antioxidante, entre otras ^[93]. Además, existen diversos trabajos en la literatura relacionados con la actividad biocida de aceites esenciales por acción de sus componentes individuales ^[94]. Se han realizado estudios comparativos de actividad antibacteriana, antifúngica, antiviral, insecticida y repelente de aceites esenciales provenientes de numerosas especies vegetales. Así, se ha correlacionado el tipo de

⁹² LUENGO M. T. L., Los aceites esenciales: Aplicaciones farmacológicas, cosméticas y alimentarias, *Ámbito Farmacéutico – Fitoterapia*, *OFFARM* 2004, 23, 88-91.

⁹³ RAUT J. S., KARUPPAYIL S. M., A status review on the medicinal properties of essential oils, *Industrial Crops and Products* 2014, 62, 250-264.

⁹⁴ SEOUD M. ABO-EL., SARHAN M. M., OMAR A. E., HELAL M. M., Biocides formulation of essential oils having antimicrobial activity, *Journal Archives of Phytopathology and Plant Protection* 2005, 38, 3, 175-184.

aceite y el grado de toxicidad con la composición química, y se ha podido establecer, en muchos casos, las concentraciones y dosis letales ^[95]. De este modo, el conocimiento de la contribución de cada componente a la toxicidad general o específica de un aceite esencial es una herramienta útil para seleccionar las especies y variedades más adecuadas para la formulación de un PPCPs con actividad biocida. En particular, la incorporación de un aceite esencial como fase oleosa en sistemas como las MEs es de gran interés debido a la mejora en la solubilidad y biodisponibilidad de los compuestos lipofílicos cargados. Además, la presencia de estos aceites aporta a la formulación sus propiedades farmacológicas y, en algunos casos, sus propiedades biocidas. Se han reportado trabajos utilizando aceites esenciales como fase oleosa en sistemas de MEs ^[96, 97, 98]. Particularmente, el aceite esencial de albahaca (AEA) se utiliza en medicina tradicional como antiinflamatorio, antioxidante, antimicrobiano, antifúngico, larvicida y repelente de insectos. Estas propiedades se basan en la presencia de compuestos bioactivos y volátiles, como estragol (C₁₀H₁₂O), linalol (C₁₀H₁₈O), cineol (C₁₀H₁₈O), α -pineno (C₁₀H₁₆), β -pineno (C₁₀H₁₆), entre otros. En la Fig. 2.2 se observa la estructura química de los mismos.

⁹⁵ PROPERZI A., ANGELINI P., BERTUZZI G., VENANZONI R., Some biological activities of essential oils, *Medicinal and Aromatic Plants* 2013, 2, 5, 1-4.

⁹⁶ SIENIAWSKA E., ŚWIĄTEK Ł., WOTA M., RAJTAR B., POLZ-DACEWICZ M., Microemulsions of essentials oils – Increase of solubility and antioxidant activity or cytotoxicity?, *Food and Chemical Toxicology* 2019, 129, 115-124.

⁹⁷ TIWARI N., EBENAZER A., FRANKLYNE J. S., SIVAKUMAR A., MUKHERJEE A., CHANDRASEKARAN N., Drug loaded essential oil microemulsions enhance photostability and evaluation on in vitro efficacy, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2020, 29, 101638.

⁹⁸ NOHYNEK G. J., SCHAEFER H., Benefit and risk of organic ultraviolet filters, *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2001, 33, 3, 285-299.

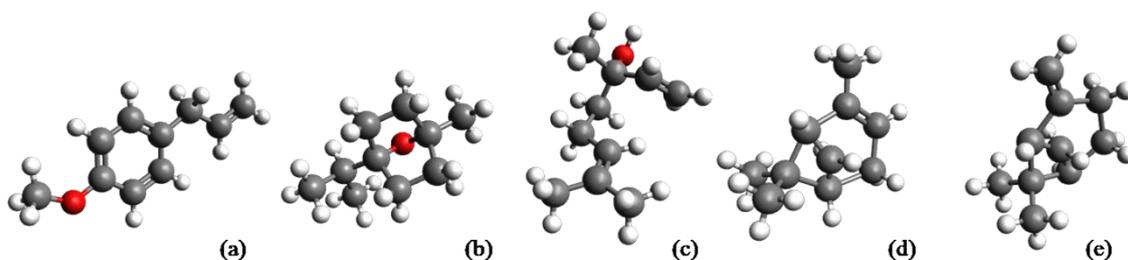


Figura 2.2 Fórmula estructural de los compuestos mayoritarios del aceite esencial de albahaca (AEA): (a) estragol, (b) cineol, (c) linalol, (c) α -pineno, (d) β -pineno. Los átomos se representan como esferas con codificación de colores convencionales: carbono (gris), hidrógeno (blanco) y oxígeno (rojo).

2.2.2 Surfactante-cosurfactante

Los surfactantes se usan ampliamente en productos de consumo, agrícolas, farmacéuticos, marcadores químicos, pesticidas, detergentes, cosméticos, etc. Particularmente, los surfactantes no-iónicos presentan óptimas propiedades como detergentes, humectantes, emulsionantes y, en algunos casos, espumantes. El surfactante no-iónico decaetilenglicol monododecil éter (DME), conocido como polioxietileno (10) lauril éter o $C_{12}E_{10}$, es un líquido viscoso, incoloro, de fórmula molecular $C_{32}H_{66}O_{11}$ y peso molecular $626,86 \text{ g mol}^{-1}$, cuya estructura se observa en la Fig. 2.3. Este surfactante presenta bajo nivel de toxicidad y es de gran aplicación en la producción de fármacos, cosméticos y alimentos.

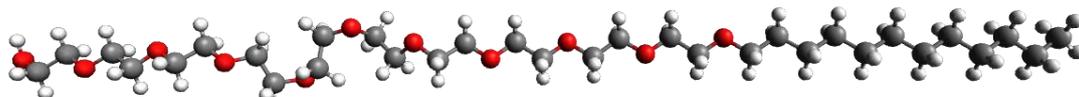


Figura 2.3 Fórmula estructural del surfactante no-iónico decaetilenglicol monododecil éter (DME). Los átomos se representan como esferas con codificación de color convencionales: carbono (gris), hidrógeno (blanco) y oxígeno (rojo).

La concentración de surfactante en la que se alcanza la mínima tensión superficial es denominada concentración micelar crítica (CMC), y representa a su vez la concentración de surfactante a partir de la cual las micelas se forman espontáneamente. La CMC es un parámetro característico para cada surfactante. Además de la CMC, otra

propiedad con la cual caracteriza a los surfactantes es el HLB, el cual fue descrito en la sección 1.4.5. Klammt y col. (2005) y Ontiveros y col. (2014) determinaron que el surfactante DME posee una CMC de 1×10^{-4} mol L⁻¹ y un HLB de 14 [99 100]. La parte lipofílica del DME consiste en alcoholes grasos, mientras que la parte hidrófila la forman los polietilenglicoles de cadena corta (polioxietilenos). Estos productos suelen derivar de los ácidos láurico, palmítico, esteárico, u oleico. Este surfactante es utilizado en la preparación de emulsiones y MEs o/w, por sus propiedades solubilizantes tanto de aceites esenciales, vitaminas y otros compuestos de baja solubilidad en agua. DME es estable en medios altamente ácidos o básicos, y se considera un agente no tóxico ni irritante.

Por otro lado, el etanol (ET) es un alcohol incoloro de peso molecular 46,07 g mol⁻¹, que puede ser utilizado como cosurfactante. ET es un compuesto biocompatible, que presenta características anfifílicas, con afinidad tanto por la fase oleosa como por la fase acuosa. Cuando el ET se comporta como cosurfactante, se particiona en la monocapa que forma junto con el surfactante (interface aceite-agua) estabilizando el sistema y reduciendo la tensión interfacial, favoreciendo la formación de la ME.

Durante el desarrollo de la presente tesis, se obtuvieron dos MEs del tipo o/w utilizando combinaciones adecuadas de surfactante (DME), cosurfactante (ET) y aceites, tanto AO como AEA, a fin de ser utilizadas como sistemas portadores del filtro químico solar OMC. De esta manera, una de las formulaciones obtenidas, denominada MEI, presentó: una fase oleosa conformada por AO, mientras que la otra formulación, denominada MEII, presentó una fase oleosa constituida por AEA.

⁹⁹ KLAMMT C., SCHWARZ D., FENDLER K., HAASE W., DÖTSCH V., BERNHARD F., Evaluation of detergents for the soluble expression of α -helical and β -barrel-type integral membrane proteins by a preparative scale individual cell-free expression system, *The FEBS Journal* 2005, 272, 6024-6038.

¹⁰⁰ ONTIVEROS J. F., PIERLOT C., CATTÉ M., MOLINIER V., SALAGER J. L., AUBRY J. M., A simple method to assess the hydrophilic lipophilic balance of food and cosmetic surfactants using the phase inversion temperature of C₁₀E₄/n-octane/water emulsions, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2014, 458, 32-39.

2.3 Parte Experimental

2.3.1 Materiales

Todos los reactivos empleados fueron calidad analítica y las soluciones se prepararon usando agua ultra pura (18M Ω cm).

- ✚ Decaetilenglicol mono-dodecil éter (Sigma)
- ✚ Etanol absoluto (Dorwil)
- ✚ Ácido oleico (Applichem)
- ✚ Octil-p-metoxicinamato (Sigma)
- ✚ Aceite esencial de albahaca (Euma)

2.3.2 Métodos

2.3.2.1 Obtención de MEs

La relación de los componentes utilizados para preparar MEs fue obtenida en cada caso mediante la construcción de diagramas pseudoternarios de fases. De esta manera, los límites de las zonas de una fase se pueden obtener mediante la observación directa de mezclas de composición conocida. Estos diagramas se construyen variando los porcentajes de fase acuosa, fase oleosa y de la mezcla surfactante:cosurfactante mediante una titulación con agua, con agitación moderada y a temperatura ambiente (25 °C).

2.3.2.1.1 Diagramas pseudoternarios de fases para sistemas con AO

En el caso de la obtención de MEs con AO, se construyeron tres diagramas pseudoternarios de fase, ya que se variaron las relaciones surfactante:cosurfactante (Smix) en relaciones 1:1, 2:1 y 3:1. La zona de formación MEI se obtuvo en cada diagrama combinando diferentes cantidades de mezcla DME:ET (Smix) con diferentes cantidades de AO en proporciones que variaron de 9,5:0,5 a 8,75:1,25 (% p/p), respectivamente. Así, cada mezcla se tituló gradualmente con agua ultrapura, utilizando

un dosificador, bajo agitación magnética constante (300 rpm) mediante un agitador magnético (Hanna Instruments, HL190M) y durante 5 min. De esta manera, las mezclas obtenidas fueron evaluadas minuciosamente por inspección visual. En caso de observarse turbidez o alteraciones de fase, las mezclas se descartaron. Por lo contrario, en caso de observarse sistemas transparentes y estables, éstos fueron considerados ME_s y así fueron marcados en el diagrama pseudoternario de fases correspondiente. Las diferentes combinaciones de componentes estudiadas para la obtención de los diagramas pseudoternarios de fases se pueden consultar en el Apéndice I.

2.3.2.1.2 Diagramas pseudoternarios de fases para sistemas con AEA

En el caso de la obtención de ME_s con AEA, se estudiaron las mismas relaciones S_{mix} (DME:ET), esto es, 1:1, 2:1 y 3:1, por lo que se obtuvieron tres diagramas pseudoternarios de fases. En cada caso, se mezcló la correspondiente S_{mix} con la fase oleosa (AEA), en las proporciones 9,5:0,5 a 1:1 (% p/p), respectivamente. Entonces, cada mezcla (S_{mix} :AEA) fue titulada gradualmente con agua ultrapura y bajo agitación magnética moderada. De esta manera, la nueva mezcla formada fue examinada visualmente y la región de formación de ME_s fue definida según el criterio anteriormente descrito, es decir, como sistemas transparentes e isotrópicos. El resto del diagrama correspondió a alteraciones de fase las cuales se evidenciaron por la presencia de turbidez. Las diferentes combinaciones de componentes estudiadas para la obtención de los diagramas pseudoternarios de fase se pueden consultar en el Apéndice II.

2.3.2.2 Caracterización fisicoquímica de ME_s

En los sistemas de ME_s seleccionados se determinó tamaño de partículas (Z), índice de polidispersidad (PdI), conductividad (C), pH e índice de refracción (IR). Para ello, 5,0g de cada ME fue dispersada en 50mL de agua ultrapura mediante agitación magnética constante durante 2 h a temperatura ambiente (25 °C).

De esta manera, las medidas de Z y PdI se realizaron mediante dispersión de luz dinámica (DLS) con un ángulo de 90° utilizando un instrumento marca Malvern®, modelo Zetasizer Nanoseries. La conductividad y el valor de pH de las MEs se obtuvieron utilizando un conductímetro marca Adwa®, modelo AD32 y un pHmetro marca Orion-Ross®, modelo 710^a, respectivamente. Además, el índice de refracción se determinó con un refractómetro marca Atago®, modelo RX-5000 utilizando una gota de las dispersiones como muestra.

Por otro lado, la morfología de las formulaciones seleccionadas como sistemas óptimos se evaluó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) utilizando un microscopio marca JEOL, modelo 100 CXII, operado a 80 kV. Para realizar la observación, se colocó una gota de la MEs en una rejilla de cobre y se realizó un contraste negativo con una solución de acetato de uranilo durante 1 min. Antes de la observación, la muestra se secó a temperatura ambiente (25 °C).

2.3.2.3 Preparación de MEs cargadas con OMC

Las MEs cargadas con OMC fueron preparadas teniendo en cuenta los valores máximos permitidos de OMC en productos cosméticos reportados en normativas de la FDA (7,5%) y de la Unión Europea (10%) ^[101].

En primer lugar, se agregaron diferentes cantidades de OMC a la fase oleosa, con agitación magnética constante a 25 °C. Luego, a esta mezcla se añadió la combinación surfactante:cosurfactante (Smix) correspondiente y se tituló con agua ultrapura bajo agitación magnética moderada. Las concentraciones finales de OMC en las formulaciones preparadas fueron 2,5; 5,0 y 7,5% (p/p) para sistemas con AO y 1,0; 1,5 y 2,0% (p/p) para sistemas con AEA. Todas las MEs cargadas con OMC se almacenaron en recipientes de vidrio de color ámbar, a temperatura ambiente (25 °C).

¹⁰¹ BAREL A. O., PAY M., MAIBACH H. I., Handbook of Cosmetic Science and Tecnology, 3ra edición, Nova York, Ed. Marcel Bekker, 2009.

2.3.2.4 Estudios de estabilidad de las MEs cargadas con OMC

2.3.2.4.1 Test de centrifugación

La separación de fases de MEs cargadas con OMC fue evaluada utilizando una centrífuga marca Rolco[®], CM 2036. Las muestras se colocaron en tubos de polipropileno de 15 mL, y las mismas se centrifugaron a 3000 rpm durante 30 min.

2.3.2.4.2 Ciclos de calentamiento-enfriamiento

Los ciclos de enfriamiento-calentamiento consistieron en el almacenamiento de las formulaciones cargadas con el filtro químico solar durante 48 h a 4 °C, seguido de un almacenamiento durante 48 h a 40 °C. Se realizaron de esta manera un total de tres ciclos por muestra, y luego de ello se evaluó si el sistema en estudio presentó separación de fases.

2.3.2.5 Determinación del FPS de las MEs cargadas con OMC

El FPS de las MEs cargadas con OMC fue obtenido mediante el método *in vitro* de Mansur^[102]. Para ello, las muestras fueron diluidas en etanol absoluto hasta una concentración final de 0,2 mL mL⁻¹. Las mediciones espectrofotométricas se realizaron entre 290 y 320 nm, cada 5 nm, utilizando un espectrofotómetro UV-Vis marca Agilent[®], modelo 8453, equipado con una celda de cuarzo con un paso óptico de 1 cm. El FPS se calculó utilizando la ecuación 1.1. Los valores de EE e I fueron obtenidos de la Tabla 1.2.

2.3.2.6 Caracterización del AEA

La caracterización del AEA utilizado como fase oleosa para obtener el sistema MEII se llevó a cabo mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS, del inglés, *gas chromatography–mass spectrometry*). El análisis de la muestra se realizó utilizando un cromatógrafo de gases marca Agilent GC modelo

¹⁰² MANSUR J. S., BREDER M. N. R., MANSUR M. C. A., AZULAY R. D., Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria, *Anais Brasileiros de Dermatologia* 1986, 61, 121-124.

7890B, equipado con una columna capilar de sílice fundida HP-5 (30 m x 0,25 mm d.i; espesor de película 0,25 μm) y acoplado a un espectrómetro de masas modelo 5977A. La temperatura del inyector se mantuvo a 290 °C y se utilizó helio como gas portador a una velocidad de flujo de 1,0 mL min⁻¹. El programa de temperatura del horno fue de 40–100 °C con un gradiente de 3 °C min⁻¹. A continuación, se programó con 280 °C a un gradiente de 10 °C min⁻¹. Finalmente, la temperatura del horno se mantuvo a 280 °C durante 5 min. La inyección se efectuó en modo split (1:20). El rango de masas fue de 40 a 500 unidades de masa atómica. Los compuestos se identificaron mediante la comparación con espectros de masas contenidos en la librería del programa.

2.4 Resultados y Discusión

2.4.1 Obtención de ME_s

La proporción adecuada de componentes para la obtención de ME_s se llevó a cabo mediante el estudio del comportamiento de fase para una serie de mezclas y la construcción de los respectivos diagramas pseudoternario de fases. Cada diagrama está representado por un triángulo equilátero, cuyos lados representan los porcentajes en peso de cada componente, en este caso, S_{mix} (DME:ET), agua y fase oleosa.

Las Fig. 2.4 y 2.5 muestran los diagramas pseudoternarios de fases correspondientes a la obtención de sistemas con AO y AEA, respectivamente. Como se mencionó anteriormente, en cada caso, se evaluaron tres relaciones surfactante:cosurfactante (S_{mix}): 1:1, 2:1 y 3:1 (% p/p).

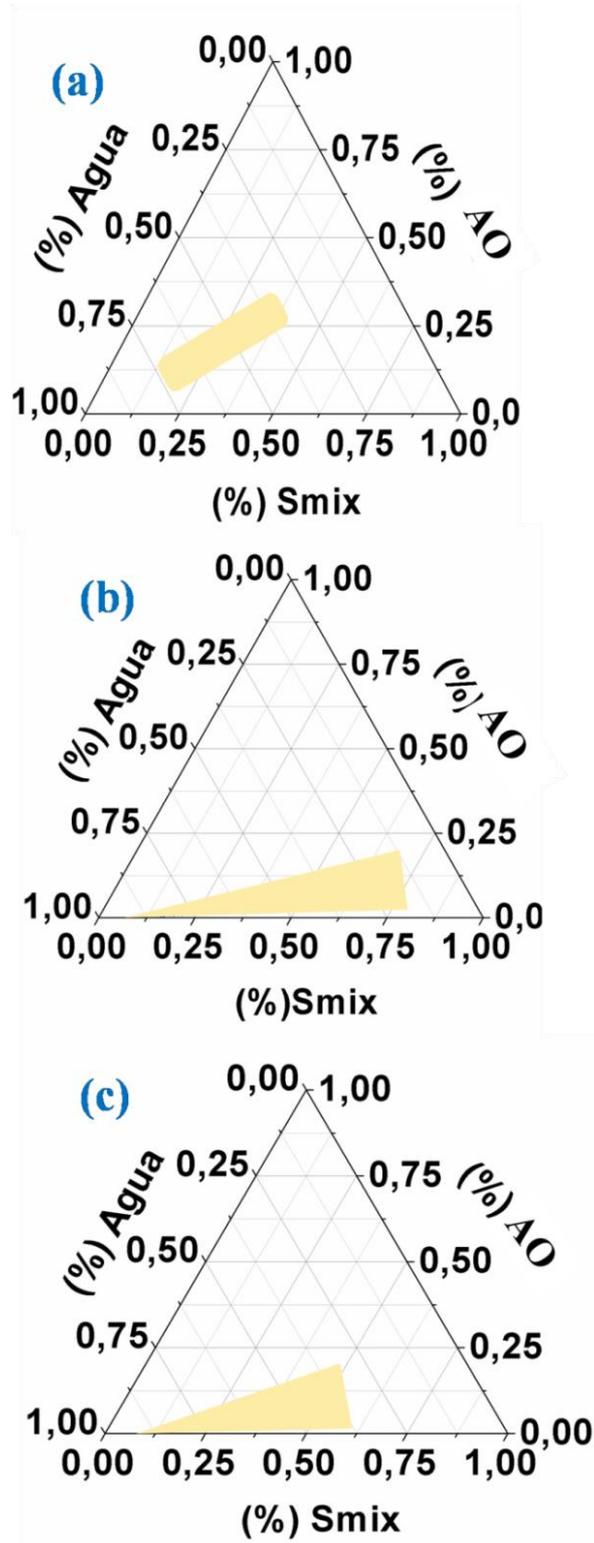


Figura 2.4 Diagramas pseudoternarios de fases correspondientes a los sistemas obtenidos con ácido oleico (AO). En todos los casos, la zona coloreada representa la región de formación de MEs. (a) Smix 1:1 (% p/p), (b) Smix 2:1 (% p/p), (c) Smix 3:1 (% p/p).

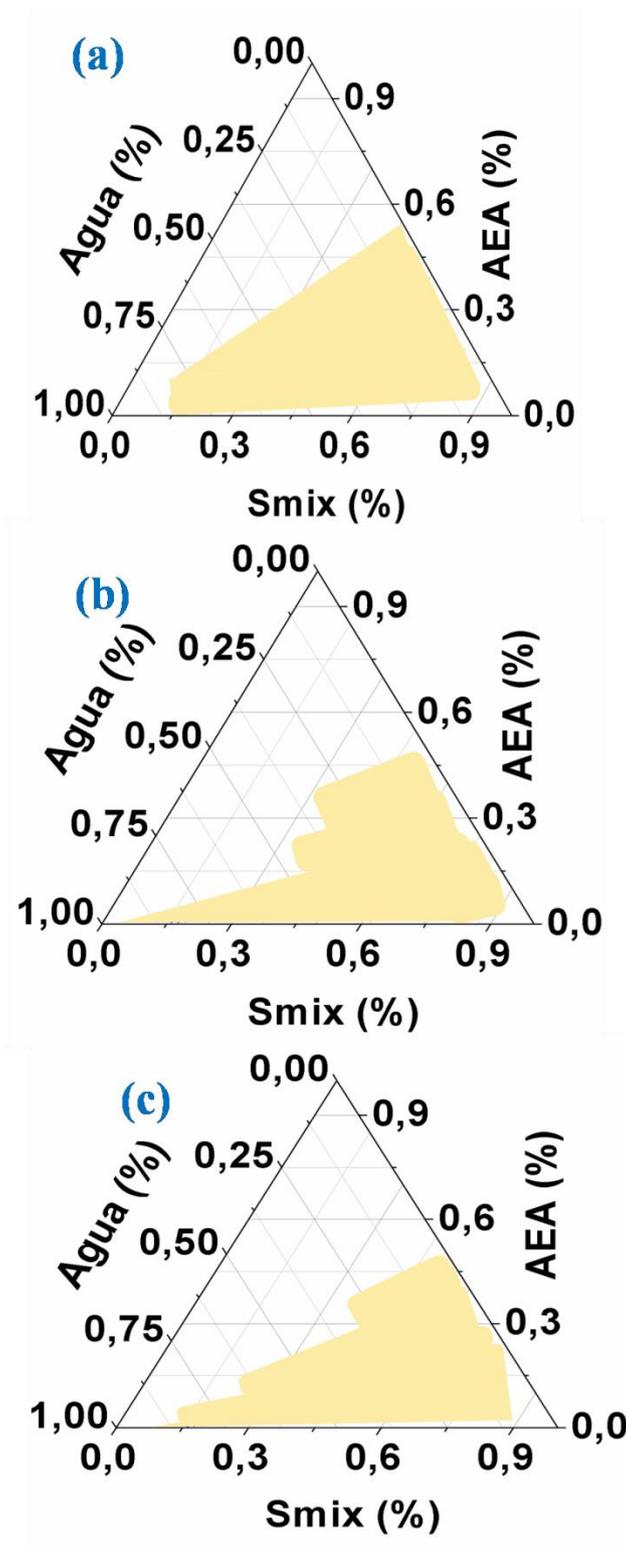


Figura 2.5 Diagramas pseudoternarios de fases correspondientes a los sistemas obtenidos con aceite esencial de albahaca (AEA). En todos los casos, la zona coloreada representa la región de formación de MEs. (a) Smix 1:1 (% p/p), (b) Smix 2:1 (% p/p), (c) Smix 3:1 (% p/p).

En cada diagrama se puede observar el área de formación de MEs (zona coloreada), la cual se obtuvo por inspección visual de cada mezcla y la evaluación de la

estabilidad de la misma en el tiempo. La Fig. 2.6 (a) muestra una mezcla correspondiente a la proporción $2_{(AO)}:38_{(S_{mix})}:60_{(agua)}$ (% p/p) la cual se observó transparente, isotrópica y termodinámicamente estable, conformando por ende un punto del área que representa la zona de formación de MEs. Por el contrario, la Fig. 2.6 (b) muestra un sistema opalescente y termodinámicamente inestable que corresponde a un punto fuera del área de formación de MEs.

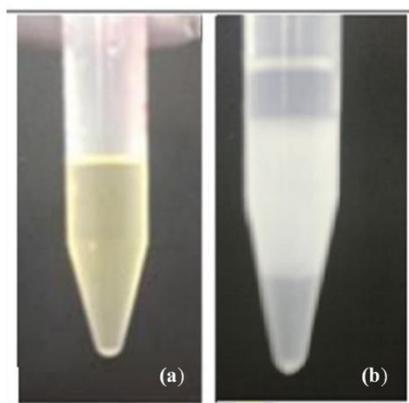


Figura 2.6 Fotografía de mezclas correspondientes al diagrama pseudoternario de fases 2:1 (AO). En (a) puede observarse un sistema transparente el cual representa una microemulsión y en (b) un sistema opalescente el cual representa una emulsión.

En el caso de sistemas preparados con AO, se seleccionó el área de formación de MEs correspondiente a una relación S_{mix} de 3:1 (% p/p). Esto se debió a que esta proporción surfactante:cosurfactante posee una mayor área de formación de MEs y además éstas presentaron alta estabilidad, con respecto a los otros sistemas obtenidos cuyas proporciones de DME: ET fueron 1:1 y 2:1. Sin embargo, para sistemas preparados con AEA resultó apropiada una relación S_{mix} 2:1 (% p/p), ya que estas formulaciones exhibieron mayor estabilidad a lo largo del tiempo con respecto a los otros sistemas estudiados. En la Tabla 2.1 se detallan las MEs seleccionadas para los futuros estudios de caracterización fisicoquímica. Las mismas fueron denominadas MEI y MEII según se utilizó AO o AEA como fase oleosa, respectivamente.

Tabla 2.1 Composición de las MEs seleccionadas a partir de los diagramas pseudoternarios de fases. Las formulaciones MEI corresponden a una relación Smix 3:1 (% p/p) y las formulaciones MEII a una relación Smix 2:1 (% p/p). Todas las concentraciones de los componentes están expresadas en % (p/p).

	Formulaciones MEI			Formulaciones MEII		
	AO	Smix	agua	AEA	Smix	agua
ME1	1,3	25,3	73,4	6,0	23,0	71,0
ME2	1,4	27,1	71,5	8,0	32,0	60,0
ME3	1,5	29,2	69,3	8,5	34,0	57,5
ME4	1,7	31,7	66,6	9,0	36,0	56,0
ME5	1,8	34,5	63,7	9,5	35,0	55,5
ME6	2,0	38,0	60,0	10,0	40,0	50,0

2.4.2 Caracterización fisicoquímica de las MEs

Los valores correspondientes al estudio de los parámetros fisicoquímicos (Z, Pdl, pH, índice de refracción y conductividad) para MEI y MEII se pueden ver en las Tablas 2.2 y 2.3, respectivamente.

Tabla 2.2 Resultados de la caracterización fisicoquímica de las formulaciones MEI. En cada caso, las determinaciones se realizaron por triplicado. Cada valor se expresa con su correspondiente desviación estándar.

MEI	Z(nm)	Pdl	C (mS cm ⁻¹)	pH	IR
MEI1	11,56± 0,10	0,312± 0,003	0,122± 0,004	5,31 ± 0,02	1,37± 0,01
MEI2	12,45± 0,20	0,361± 0,012	0,129± 0,002	5,53 ± 0,03	1,38± 0,02
MEI3	13,98± 0,20	0,278± 0,002	0,127± 0,008	5,73 ± 0,02	1,39± 0,02
MEI4	13,56± 0,20	0,307± 0,005	0,128± 0,011	5,74 ± 0,03	1,36± 0,02
MEI5	12,76± 0,50	0,280± 0,018	0,117± 0,007	5,80 ± 0,04	1,37± 0,02
MEI6	14,23± 0,10	0,308± 0,011	0,121± 0,003	5,60 ± 0,03	1,39± 0,01

Tabla 2.3 Resultados de la caracterización físicoquímica de las formulaciones MEII. En cada caso, las determinaciones se realizaron por triplicado. Cada valor se expresa con su correspondiente desviación estándar.

MEII	Z(nm)	PdI	C (mS cm ⁻¹)	pH	IR
MEII1	11,70± 0,10	0,228± 0,005	0,032± 0,001	4,61± 0,03	1,36± 0,02
MEII2	12,90± 0,10	0,349± 0,003	0,041± 0,005	4,93± 0,05	1,38± 0,02
MEII3	13,00± 0,30	0,395± 0,023	0,013± 0,003	4,74± 0,03	1,38± 0,03
MEII4	13,40± 0,50	0,395± 0,017	0,029± 0,015	4,73± 0,06	1,39± 0,02
MEII5	13,60± 0,20	0,390± 0,013	0,034± 0,011	4,80± 0,07	1,39± 0,01
MEII6	12,40± 0,60	0,372± 0,010	0,030± 0,012	5,00± 0,08	1,39± 0,02

Los sistemas obtenidos presentaron un valor Z inferior a 100 nm. En ambos casos, este valor fue similar, variando entre 11,56 - 14,23 nm para MEI y entre 11,70 - 13,60 nm en el caso de MEII, demostrando que el tamaño de las gotas se corresponde a lo esperado para MEs.

En cuanto al PdI, éste parámetro representa la relación entre la desviación estándar y el tamaño medio de la gota, para una serie de medidas, pudiendo variar entre 0 y 1. Un valor de PdI cercano a cero indica un sistema monodisperso. Cuando el PdI se encuentra entre 0,20 y 0,40 existe una leve dispersión en el tamaño de las gotas, aunque puede considerarse que la muestra se aproxima a un sistema monodisperso. Por el contrario, cuando el PdI es mayor a 0,40 el sistema se considera polidisperso, ya no siendo adecuado para una futura aplicación ^[103]. Tanto para MEI como para MEII, los valores de PdI fueron menores a 0,40; más precisamente, estuvieron en el rango de 0,278-0,361 y 0,228-0,395, respectivamente. Esto indica que los sistemas obtenidos presentan un tamaño de gota uniforme, aproximándose a sistemas monodispersos.

Por otro lado, la conductividad de las MEs analizadas estuvo en el rango de 0,117 a 0,129 mS cm⁻¹ para MEI y entre 0,013 y 0,041 mS cm⁻¹ para MEII, lo que

¹⁰³ SINGH M., SINGH S. P., RACHANA R., Development, characterization and cytotoxicity evaluation of Ginkgo biloba extract (EGB761) loaded microemulsion for intra-nasal application, *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 2017, 7, 24-34.

demuestra que todos los sistemas fueron dispersiones aceite en agua (o/w). Además, respecto de las mediciones del índice de refracción, éstas oscilaron entre 1,37 y 1,39 para MEI y entre 1,36 y 1,39 para MEII, indicando que los sistemas obtenidos son isotrópicos. Por último, el pH de los sistemas estuvo comprendido entre 5,31 y 5,80 para MEI y entre 4,61 y 5,0 para MEII. Ambos rangos son apropiados para una futura aplicación tópica, ya que son valores cercanos al pH normal de la piel ^[104]. Éste es, uno de los parámetros más importantes a tener en cuenta en el desarrollo de nuevas formulaciones para evitar la irritación luego de la aplicación del producto.

2.4.3 Selección de las MEs para su carga con OMC

En esta etapa se procedió a seleccionar los sistemas adecuados tanto MEI como MEII, para realizar la carga con el filtro químico solar OMC. Dicha selección estuvo basada en los resultados del estudio fisicoquímico previo de las MEs, la estabilidad de los sistemas, como así también en la proporción de los componentes que conforman el sistema en cada caso.

2.4.3.1 Selección y carga de MEI

Las seis formulaciones correspondientes a MEI se prepararon con cantidades crecientes de AO y Smix, las cuales variaron de 1,3 a 2,0 % (p/p) y de 25,3 a 38,0 % (p/p), respectivamente. Como puede verse en la Fig. 2.7, el tamaño de gota de MEI1 a MEI5 permaneció prácticamente sin cambios a lo largo de 30 días. Sólo MEI6 presentó un aumento de Z a partir de la mitad del período estudiado. Además, Z aumentó en la serie de muestras a medida que la concentración de AO y Smix aumentaron. De esta manera, dicho estudio contribuyó a corroborar que estamos en presencia de sistemas estables.

¹⁰⁴ BADAWI A. A., EL-AZIZ A.B., AMIN M.M., SHETA N.M., Topical benzophenone-3 microemulsion-based gels: preparation, evaluation and determination of microbiological UV blocking activity, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2014, 6, 562-570.

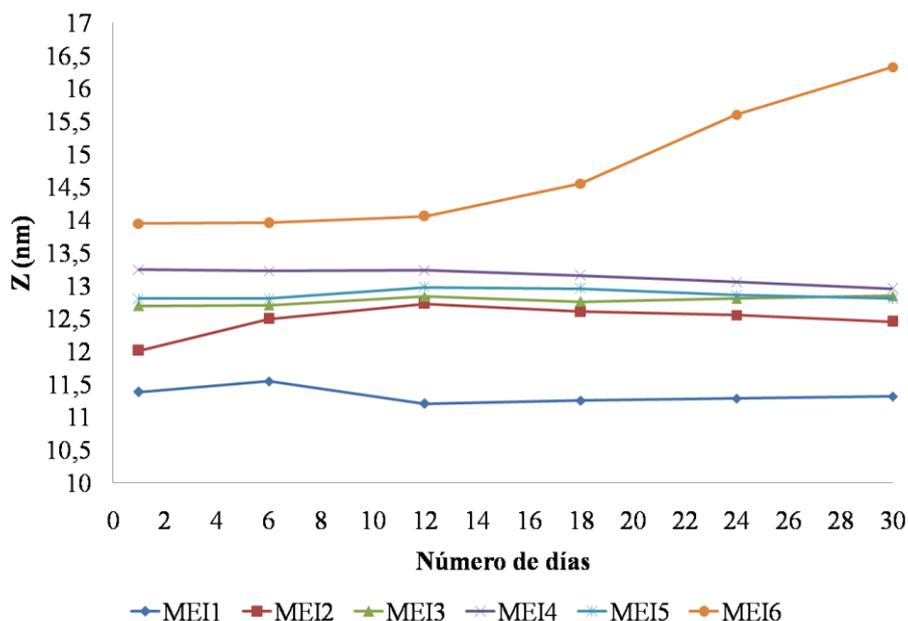


Figura 2.7 Estudio de la variación del tamaño de partícula (Z) correspondiente a las formulaciones MEI durante 30 días.

Es un hecho conocido que las MEs utilizadas como portadoras de compuestos lipofílicos deberían contener la menor cantidad de surfactante y cosurfactante posible, ya que estos componentes en altas proporciones pueden generar efectos indeseados en los tejidos. Sin embargo, el contenido de fase oleosa, en este caso AO, debe ser el suficiente como para permitir cargar una concentración de OMC apropiada que permita cumplir de manera efectiva su actividad fotoprotectora. Por ello, fue necesario encontrar un compromiso entre estas dos consideraciones y, en consecuencia, la formulación MEI3 fue el sistema elegido para su posterior carga con OMC. MEI3 contiene 1,5 y 29,2 % (p/p) de AO y Smix, respectivamente. La misma presentó un óptimo tamaño de gota ($13,98 \pm 0,20$) nm y, además, registró el valor de PDI más bajo de la serie ($0,278 \pm 0,002$), siendo la formulación que más se acercó a un sistema monodisperso. Por otro lado, el pH de MEI3 ($5,73 \pm 0,02$) resultó apropiado para presentaciones de uso tópico (pH entre 4 y 7). Finalmente, como se mencionó anteriormente, MEI3 demostró ser estable a temperatura ambiente a lo largo del tiempo.

De esta manera, MEI3 fue cargada con distintas concentraciones del filtro químico solar OMC (2,5; 5,0 y 7,5 % (p/p); sección 2.3.2.3). Como es de esperar, una mayor concentración de OMC brindará una mayor protección a la radiación solar. Sin embargo, el aumento de carga en la fase oleosa del sistema ocasionó una variación significativa en los parámetros fisicoquímicos, principalmente Z y PdI. Por lo tanto, una carga con un 5,0 % (p/p) de OMC resultó apropiada y esta formulación, denominada MEI-OMC, fue la seleccionada para posteriores estudios. La Tabla 2.6 muestra un resumen de la composición de la formulación y de los valores correspondientes a los principales parámetros fisicoquímicos estudiados.

2.4.3.2 Selección y carga de MEII

En el caso de las formulaciones conteniendo AEA como fase oleosa (MEII), todas las muestras (MEII1-MEII6) fueron cargadas con OMC en una concentración de 1,5 % (p/p). Como puede verse en la Tabla 2.1, la concentración de AEA fue creciente de MEII1 a MEII6 (6,0 a 10,0 % (p/p)). Sin embargo, el aumento de fase oleosa en el sistema ocasionó una variación significativa en los parámetros fisicoquímicos, principalmente Z y PdI. Como puede verse en la Tabla 2.4 en el caso de MEII5-OMC y MEII6-OMC, Z aumentó significativamente (19,71 y 23,27 nm, respectivamente) así como el PdI que fué de 0,619 y 0,703, respectivamente. Por ello, aunque en ambos casos el tamaño sigue estando dentro de los parámetros que definen a una ME, el PdI corresponde a sistemas altamente polidispersos. En el caso de MEII1-OMC a MEII4-OMC, los valores de Z estuvieron más próximos a las respectivas MEs sin cargar (Tabla 2.3), aunque los valores de PdI se variaron desde 0,389 a 0,527, respectivamente. De este análisis, podemos concluir que MEII1-OMC es la formulación más adecuada, ya que es la única formulación de la serie que se aproxima a un sistema monodisperso. Por otro lado, esta formulación contiene la menor proporción de Smix (23% (p/p)) y,

Capítulo 2. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MEs PORTADORAS DE OMC

además, presentó un pH adecuado (4,91) para una formulación tópica (Tabla 2.4). Por ello, esta formulación fue seleccionada para continuar con los estudios de carga de OMC.

Tabla 2.4 Caracterización fisicoquímica de formulaciones MEII cargadas con 1,5% de OMC. Las determinaciones de los parámetros estudiados se realizaron por triplicado. Cada valor se expresa con su correspondiente desviación estándar.

Sistemas	Z (nm)	Pdl	C (m $\text{\$}$ cm $^{-1}$)	pH	RI
MEII1-OMC	12,60 \pm 0,10	0,389 \pm 0,042	0,045 \pm 0,003	4,91 \pm 0,03	1,37 \pm 0,01
MEII2-OMC	15,20 \pm 0,20	0,420 \pm 0,010	0,028 \pm 0,002	4,70 \pm 0,03	1,38 \pm 0,01
MEII3-OMC	13,70 \pm 0,20	0,523 \pm 0,070	0,019 \pm 0,001	5,14 \pm 0,05	1,38 \pm 0,02
MEII4-OMC	14,50 \pm 0,01	0,527 \pm 0,081	0,033 \pm 0,002	4,81 \pm 0,01	1,39 \pm 0,03
MEII5-OMC	19,71 \pm 0,41	0,619 \pm 0,052	0,009 \pm 0,002	4,75 \pm 0,10	1,39 \pm 0,02
MEII6-OMC	23,27 \pm 0,63	0,703 \pm 0,046	0,011 \pm 0,002	4,77 \pm 0,05	1,39 \pm 0,02

A continuación, se variaron las concentraciones de OMC al sistema MEII, incorporando al mismo una concentración final de 1,0 y 2,0 % (p/p) del filtro químico solar. Los resultados de la caracterización fisicoquímica de los nuevos sistemas junto con la correspondiente a la carga con 1,5 % (p/p) de OMC se muestran en la Tabla 2.5.

Tabla 2.5 Caracterización fisicoquímica de las formulaciones MEII cargadas con diferentes concentraciones de OMC. Las determinaciones de los parámetros se realizaron por triplicado. Cada valor se expresa con su correspondiente desviación estándar.

MEII (% p/p)				Z (nm)	Pdl	pH
AEA	OMC	$\text{\$}_{\text{mix}}$	agua			
6,0	1,0	27,0	66,0	11,51 \pm 0,07	0,372 \pm 0,005	4,69 \pm 0,01
6,0	1,5	29,0	63,5	12,60 \pm 0,10	0,389 \pm 0,042	4,91 \pm 0,03
6,0	2,0	32,0	60,0	13,09 \pm 0,06	0,609 \pm 0,006	4,52 \pm 0,01

Como puede observarse, los valores de Z y Pdl fueron similares para las MEs cargadas con 1,0 y 1,5 % (p/p) de OMC. Sin embargo, en el caso de la ME cargada con 2,0 % (p/p) de OMC, el Pdl aumentó significativamente (0,609 \pm 0,006), indicando la presencia de gotas de tamaños muy variables. Con respecto al pH, todos los valores fueron aceptables, aunque la ME con un 1,5 % (p/p) de OMC presentó el valor más alto

(4,91±0,03), lo que resulta apropiado. Por ello, en virtud de todo lo expuesto, la formulación MEIII cargada con 1,5 % (p/p) de OMC, denominada de aquí en más MEII-OMC, fue la seleccionada para continuar con los estudios. La Tabla 2.6 muestra un resumen de la composición de MEII-OMC y los resultados de su caracterización fisicoquímica.

Tabla 2.6 Composición y caracterización fisicoquímica de las formulaciones MEI y MEII cargadas con OMC y seleccionadas como sistemas óptimos.

	S_{mix} (%)	fase interna OA (%)	fase interna AEA (%)	Agua (%)	OMC (%)
MEI-OMC	29,2	1,5	-	64,3	5,0
MEII-OMC	29,0	-	6,0	63,5	1,5

	Z(nm)	PdI	C (m ³ cm ⁻¹)	pH	IR
MEI-OMC	11,91 ± 0,09	0,191 ± 0,029	0,116 ± 0,02	5,72 ± 0,04	1,35 ± 0,02
MEII-OMC	12,60 ± 0,10	0,389 ± 0,042	0,045 ± 0,03	4,91 ± 0,03	1,37 ± 0,01

2.4.4 Morfología de MEI-OMC y MEII-OMC

El estudio por TEM permitió observar que ambas formulaciones presentaron una morfología esférica y un tamaño de gota en un orden nanométrico, corroborando, además, los resultados obtenidos por la técnica DLS. Las fotografías obtenidas pueden observarse en la Fig. 2.8.

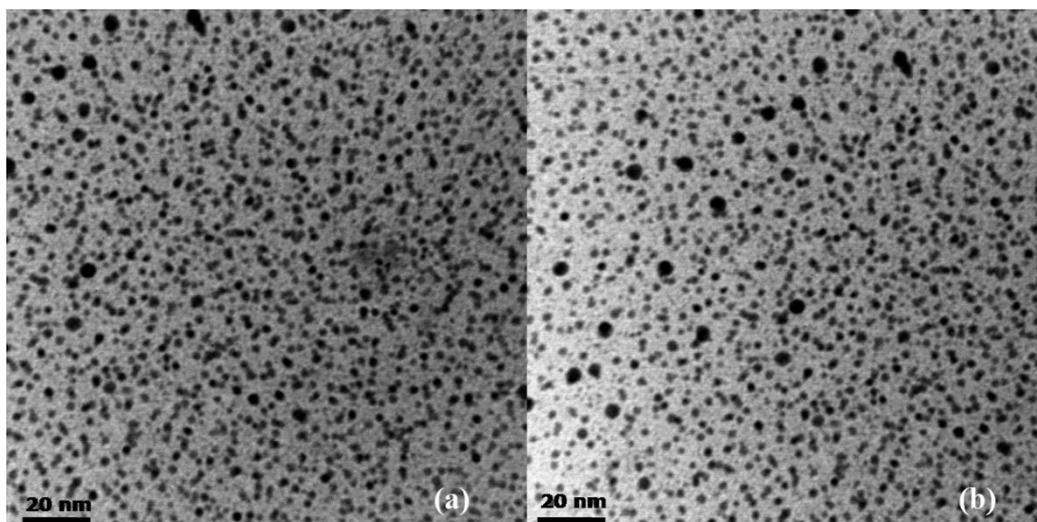


Figura 2.8 Fotografía TEM (270.000x) de los sistemas de MEs (a) con fase interna AO (MEI-OMC) y (b) con fase interna AEA (MEII-OMC). Como puede verse, en ambos casos se corrobora una morfología esférica.

2.4.5 Estudios de estabilidad de MEI-OMC y MEII-OMC

En el proceso de comercialización, una formulación puede ser sometida a distintas variables físicas durante las etapas de almacenamiento y distribución. Es necesario tener en cuenta que estas condiciones no deben modificar el estado de agregación del sistema y por ende afectar sus propiedades fisicoquímicas. En el caso de las formulaciones propuestas, ambas no presentaron cambios de fase luego del proceso de centrifugación a alta velocidad, demostrando la estabilidad termodinámica de los sistemas. Por otro lado, tanto MEI-OMC como MEII-OMC tuvieron un óptimo comportamiento cuando fueron sometidas a períodos con una temperatura de refrigeración (4 °C) así como a períodos con una temperatura ambiente relativamente alta (40 °C). Además, se observó un comportamiento óptimo durante los sucesivos cambios de temperatura, tanto de 4 a 40 °C como de 40 a 4 °C. En todos los casos, no se observó separación de fases, ni opalescencia en las formulaciones, demostrando que los sistemas permanecieron estables frente al cambio de las variables físicas estudiadas.

2.4.6 Determinación del Factor de Protección Solar

La eficacia como protector solar de los sistemas propuestos se evaluó mediante la determinación del respectivo FPS. En la Tabla 2.7, se puede observar el factor de protección calculado a cada longitud de onda, utilizando como factor de corrección un valor de 10. La sumatoria de los valores a cada longitud de onda dio como resultado el FPS de cada formulación, resultando 7,75 y 2,77 para MEI-OMC y MEII-OMC, respectivamente. Teniendo en cuenta que, mientras más alto es el FPS, más efectivo es el producto para prevenir daños en la piel, la formulación MEI-OMC demostró ser la más efectiva.

Tabla 2.7 Determinación *in vitro* del factor de protección solar (FPS) para las formulaciones MEI-OMC y MEII-OMC. EE representa el efecto eritemogénico de la radiación de longitud de onda λ y I la intensidad de la radiación solar en la longitud de onda λ . Además, se utilizó un factor de corrección de 10, el cual es el apropiado para este tipo de estudio ^[105].

λ (nm)	EE (λ) x I (λ) x 10	A	MEI-OMC	A	MEII-OMC
290	0,0150	0,66821	0,1002	0,2520	0,0378
295	0,0817	0,72016	0,5884	0,2600	0,2124
300	0,2874	0,75718	2,1761	0,2700	0,7759
305	0,3278	0,78760	2,5818	0,2830	0,9276
310	0,1864	0,81887	1,5264	0,2910	0,5424
315	0,0839	0,77954	0,6540	0,2730	0,2290
320	0,0180	0,67161	0,1209	0,2310	0,0415
FPS			7,7478		2,7669

Sin embargo, ambos resultados pueden considerarse óptimos, teniendo en cuenta que las formulaciones propuestas contienen un único filtro químico solar en su composición. Además, los valores fueron satisfactorios si se los compara con los valores correspondientes a otros sistemas propuestos que contienen OMC ^[106 107], o incluso con

¹⁰⁵ MANSUR J. S., BREDER M. N. R., MANSUR M. C. A., AZULAY R. D., Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria, *Anais Brasileiros de Dermatologia* 1986, 61, 121-124.

¹⁰⁶ DUTRA E. A., OLIVEIRA D. A. G. C., HACKMANN E. R. M. K., SANTORO M. I. R. M. Determination of sun protection factor (SPF) of sunscreens by ultraviolet spectrophotometry, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2004, 40, 3, 381-385.

productos comerciales, los cuales contienen en su composición varios filtros UV, como ser, butilmetoxidibenzoilmetano, octil salicilato y benzofenona-3 (Tabla 2.8).

Tabla 2.8 Valores de FPS correspondiente a formulaciones publicadas en bibliografía y comerciales que contienen OMC.

Formulación	FPS	Filtros UV
Formulación A [®]	8	octil p-metoxicinamato
	15	octil p-metoxicinamato, butilmetoxidibenzoilmetano, 3-benzophenone
Formulación B [®]	8	octil p-metoxicinamato
	15	octil p-metoxicinamato, butilmetoxidibenzoilmetano
[105]	8	octil p-metoxicinamato, 3-benzophenone
	15	octil p-metoxicinamato, octil salicilato, 3-benzophenone
[106]	20	octil p-metoxicinamato, butilmetoxidibenzoilmetano
MEI-OMC	8	octil p-metoxicinamato
MEII-OMC	3	octil p-metoxicinamato

2.4.7 Composición del AEA utilizado para la obtención de MEII

Tal como se definieron anteriormente, los aceites esenciales son mezclas complejas de compuestos orgánicos volátiles que se generan como metabolitos secundarios en las plantas. Estas mezclas están compuestas por hidrocarburos tales como terpenos y compuestos oxigenados como alcoholes, ésteres, éteres, aldehídos, cetonas, fenoles y éteres fenólicos [108]. En particular, las propiedades medicinales y biocidas del AEA, como la actividad antiinflamatoria y la repelente de insectos, se basan en la presencia de varios de estos compuestos bioactivos y volátiles [109, 110]. Por

¹⁰⁷ HOUNG S. P., ANDRIEU V., REYNEIR J. P., ROCHER E., FOURNERON J. D., The photoisomerization of the sunscreen ethylhexyl p-methoxycinnamate and its influence on the sun protection factor, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2007, 186, 1, 65-70.

¹⁰⁸ GUENTHER E., The essential oils, Florida, Ed. Krieger Publishing Company, 1972.

¹⁰⁹ RODRIGUES L. B., MARTINS A. O., CESARIO F. R., CASTRO F. F., ALBUQUERQUE T. R., FERNANDES M. N., SILVA B. A., QUINTANS L. J., COSTA J. G., COUTINHO H. D., BARBOSA R., MENEZES I. R., Anti-inflammatory and antiedematogenic activity of the ocimum basilicum essential oil and its main compound estragole: in vivo mouse models, *Chemico-Biological Interactions* 2016, 257, 14-25.

lo tanto, para identificar y estimar la presencia de estos compuestos en el AEA utilizado para la obtención de MEs, y predecir su posible actividad antiinflamatoria y biocida, se realizó un análisis mediante GC-MS. Como se puede observar en la Tabla 2.15, se separaron e identificaron quince compuestos, los cuales representaron un 97,79% del total. El principal componente del AEA estudiado fue el estragol (1-alil-4-metoxibenceno), con una abundancia del 93,2%. El estragol es un fenilpropanoide que presenta comprobadas propiedades antiinflamatorias ^[111]. El proceso de inflamación es un mecanismo de defensa caracterizado por dolor, edema e infiltración de leucocitos, luego, por ejemplo, de alguna agresión externa, como las quemaduras solares debidas a la exposición a la radiación UVB ^[112]. Rodrigues y col. (2016) comprobaron la actividad antiinflamatoria del AEA con un contenido de 60,9% de estragol en su composición química, mediante pruebas *in vitro* tanto de inflamación aguda como crónica en ratones.

Por otro lado, el aceite esencial AEA presenta actividad repelente de insectos. Los repelentes son compuestos químicos que, aplicados sobre la piel, interfieren en receptores químicos específicos de los insectos e impiden que estos se fijen a la misma para realizar la picadura. Los bioensayos con aceites esenciales sintetizados a partir de diferentes plantas aromáticas demostraron actividad repelente contra diferentes subgéneros de mosquitos como *Anopheles* sp., *Culex* sp. y *Aedes* sp. ^[113 114]. En los

¹¹⁰ NERIO L. S., OLIVERO-VERBEL J., STASHENKO E., Repellent activity of essential oils: A review, *Bioresource Technology* 2010, 101, 372-378.

¹¹¹ SILVA-COMAR F. M., WIIRZLER L. A., SILVA-FILHO S. E., KUMMER R., PEDROSO R. B., SPIRONELLO R. A., SILVA E. L., BERSANI-AMADO C. A., CUMAN R. K., Effect of estragole on leukocyte behaviour and phagocytic activity of macrophages, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2014, 2014, 1-7.

¹¹² SILVA M. A., TREVISAN G., HOFFMEISTER C., ROSSATO M. F., BOLIGON A. A., WALKER C. I., KLAFKE J.Z., OLIVEIRA S. M., SILVA C. R., ATHAYDE M. L., FERREIRA J., Anti-inflammatory and antioxidant effects of *Aloe saponaria* haw in a model of UVB-induced paw sunburn in rats, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 2014, 133, 47-54.

¹¹³ BABA G., LAWAL A. O., SHARIFF H. B., Mosquito repellent activity and phytochemical characterization of essential oils from *Striga hermonthica*, *Hyptis spicigera* and *ocimum basilicum* leaf extracts, *British Journal of Pharmacology and Toxicology* 2012, 3, 43-48.

últimos años, el control de *Aedes aegypti*, en regiones subtropicales y tropicales de Argentina y América Latina, es particularmente importante debido al aumento de enfermedades relacionadas con este vector como lo son el dengue, el zika y la fiebre chikungunya ^[115]. En este sentido, Prajapati y col. (2005) demostraron la actividad repelente del aceite esencial AEA contra *Aedes aegypti* ^[116]. Es importante tener en cuenta que la actividad repelente de los diferentes aceites esenciales se basa en la presencia de monoterpenos como linalol, cineol, α -terpineol, α -pineno, β -pineno, entre otros, y sesquiterpenos como β -cariofileno, que es un fuerte repelente contra *Aedes aegypti* ^[117]. Como se puede ver en la Tabla 2.9, en el AEA analizado se encontraron siete componentes con actividad repelente de insectos: linalol, cineol, α -terpineol, acetato de bornil, β -pineno, α -pineno y β -cariofileno, cuya abundancia fue de 2,81%, 0,57%, 0,17%, 0,06%, 0,05%, 0,03% y 0,02%), respectivamente. Aunque la abundancia de los componentes aislados es relativamente baja, existe un efecto sinérgico entre los componentes con un aumento demostrado de la bioactividad ^[118].

Finalmente, la abundancia de los demás componentes del aceite esencial analizado incluyeron α -bergamoteno (0,35%), T-cadinol (0,26%) y carveol (0,10%), entre otros.

¹¹⁴ CHOKECHAIJAROENPORN O., BUNYAPRAPHATSARA N., KONGCHUENSIN S., Mosquito repellent activities of *Ocimum volatile oils*, *Phytomedicine* 1994, 1, 135–139.

¹¹⁵ PATTERSON J., SAMMON M., GARG M., Dengue, zika, chikungunya: Emerging arboviruses in the new world, *The Western Journal of Emergency Medicine* 2016, 6, 671-679.

¹¹⁶ PRAJAPATI V., TRIPATHI A. K., AGGARWALK. K., KHANUJA S. P. S., Insecticidal, repellent and oviposition-deterrent activity of selected essential oils against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*, *Bioresource Technology* 2005, 96,16, 1749-1757.

¹¹⁷ JAENSON T. G. T., PÅLSSON K., BORG-KARLSON A. K., Evaluation of extracts and oils of mosquito (dipteran: culicidae) Repellent plants from Sweden and Guinea-Bissau, *Journal of Medical Entomology* 2006, 41, 1, 113-119.

¹¹⁸ SILVA-COMAR F. M., WIIRZLER L. A., SILVA-FILHO S. E., KUMMER R., PEDROSO R. B., SPIRONELLO R. A., SILVA E. L., BERSANI-AMADO C. A., CUMAN R. K., Effect of estragole on leukocyte behaviour and phagocytic activity of macrophages, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2014, 2014, 1-7.

Tabla 2.9 Resultado del análisis mediante GC-MS del aceite esencial de albahaca utilizado en la obtención de MEII (PM: peso molecular; TR: tiempo de retención).

Componente	PM	Formula	TR(min)	%
Estragol	148,09	C ₁₀ H ₁₂ O	22,77	93,239
Cineol	154,14	C ₁₀ H ₁₈ O	15,00	0,572
β-pineno	136,12	C ₁₀ H ₁₆	12,46	0,051
Linalol	154,14	C ₁₀ H ₁₈ O	18,38	2,806
α-pineno	136,12	C ₁₀ H ₁₆	10,59	0,027
cis-oxido linalol	170,13	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	17,45	0,045
α-terpineol	154,14	C ₁₀ H ₁₈ O	22,44	0,171
l-mentol	156,15	C ₁₀ H ₂₀ O	21,77	0,075
Carveol	152,12	C ₁₀ H ₁₆ O	22,05	0,097
Ursodiol	392,29	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	21,91	0,036
Acetado de bornil	196,15	C ₂₄ H ₂₀ O ₂	25,07	0,065
Azuleno	204,19	C ₁₅ H ₂₄	26,89	0,018
α-bergamoteno	204,19	C ₁₅ H ₂₄	27,87	0,353
β -cariofileno	204,19	C ₁₅ H ₂₄	28,64	0,023
T-cadinol	222,19	C ₁₅ H ₂₆ O	30,77	0,263

PM: peso molecular; TR: tiempo de retención.

2.5 Conclusiones parciales

En esta etapa de la Tesis se logró con éxito obtener dos sistemas nanoestructurados del tipo de las microemulsiones o/w como portadores del filtro químico solar OMC. Las mismas estuvieron compuestas por materiales aceptables, biocompatibles y aptos para una futura aplicación tópica. Ambas formulaciones requirieron un tiempo de preparación de solo 5 min, bajo agitación magnética y a temperatura ambiente. MEI-OMC Y MEII-OMC fueron sistemas monodispersos, con un pH adecuado para uso tópico, que presentaron concentraciones relativamente bajas de surfactante:cosurfactante y resultaron estables a lo largo del tiempo, y en un amplio rango de temperaturas.

MEI-OMC presentó un valor óptimo de FPS (7,7478), incluso en comparación con otras formulaciones comerciales que contienen dos o más filtros químicos solares. Además, la presencia de AO como fase oleosa podría contribuir a la recuperación de la

piel inflamada por acción de la radiación UV debido a su comprobada acción antiinflamatoria. En el caso de MEII-OMC, el FPS fue menor (2,7669) debido a la menor capacidad de carga del sistema. Sin embargo, el valor obtenido es cercano al presente en determinadas formulaciones comerciales disponibles en el mercado. Además, MEII-OMC podría proporcionar actividad antiinflamatoria y repelente de insectos debido a la composición del aceite esencial de albahaca utilizado en la fase oleosa. En ambas formulaciones, las concentraciones del filtro UV se eligieron considerando el nivel máximo permitido en productos cosméticos considerando la legislación internacional vigente, Food and Drug Administration (7,5%) y la Unión Europea (10%).

Capítulo 3

ESTUDIO DE FOTODEGRADACIÓN DE OCTIL P-METOXICINAMATO CARGADO EN MICROEMULSIONES

Capítulo 3. ESTUDIO DE FOTODEGRADACIÓN DE OCTIL P-METOXICINAMATO CARGADO EN MICROEMULSIONES

3.1 Objetivos

Evaluar la capacidad de los sistemas organizados propuestos para proteger de la fotodegradación al filtro químico solar OMC. Analizar la cinética del proceso de fotodegradación del filtro químico OMC cuando se encuentra cargado en las microemulsiones obtenidas previamente, y comparar dicho proceso respecto del OMC en un medio no organizado. Para ello, se propone desarrollar un sistema automático de flujo continuo con detección fluorescente para monitorear la fotodegradación del OMC en línea y así obtener información en tiempo real. Los datos espectrales obtenidos en función del tiempo serán analizados con algoritmos quimiométricos de segundo orden a fin de obtener las correspondientes constantes cinéticas del proceso en cuestión.

3.2 Introducción

Los estudios de estabilidad son una herramienta indispensable en las fases de desarrollo y comercialización de PPCPs. El propósito de un estudio de estabilidad es monitorear una sustancia a lo largo del tiempo bajo la influencia de una serie de factores ambientales tales como temperatura, humedad y/o radiación. De esta manera, se apunta a evaluar una posible disminución de la concentración del principio activo en la formulación, la pérdida de su eficacia y/o la aparición de productos de descomposición que podrían ser potencialmente tóxicos.

Según la IUPAC, una reacción fotoquímica es una reacción química provocada por la absorción de radiación ultravioleta, visible, o infrarroja ^[119]. El proceso de fotodegradación es la transformación fotoquímica de una molécula a otra, generalmente de menor peso molecular, usualmente bajo un proceso oxidativo. Es un término utilizado para señalar la oxidación de un compuesto por efecto de la radiación UV. Dentro de las principales reacciones fotoquímicas que puede sufrir un principio activo en una formulación se encuentran los procesos de fotodegradación directa e indirecta.

Los procesos de fotodegradación directa se refieren a la absorción de la radiación por un compuesto a las longitudes de onda que corresponde al espectro de absorción del mismo, ocasionando una transformación química. Por otro lado, un proceso de fotodegradación indirecta, la energía de la radiación es absorbida por otros constituyentes de la formulación permitiendo la formación de especies reactivas como radicales hidroxilos, que reacciona con el compuesto de interés originando una transformación química.

¹¹⁹ VERHOEVEN J. W., Glosary of terms used photochemistry, *Pure and Applied Chemistry* 1996, 68, 2223-2286.

En el caso particular del OMC, estudios previos han demostrado que la fotodegradación directa en medio acuoso produce su fotoisomerización, en la cual el *trans*-OMC se transforma en *cis*-OMC (Fig. 3.1), según ^[120]:

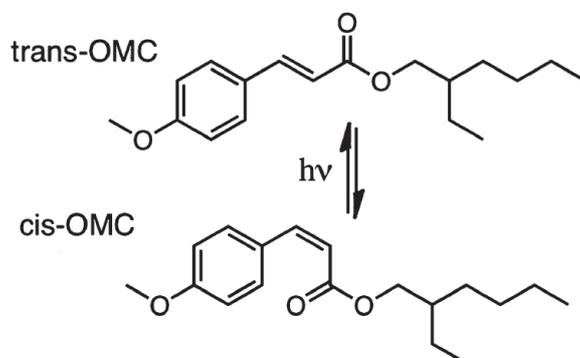


Figura 3.1 Fotoisomerización del OMC bajo los efectos de la radiación UV. Estructura molecular de los isómeros *trans*-OMC y *cis*-OMC.

El isómero *trans*-OMC tiene un máximo de absorción de radiación a una longitud de onda de 291 nm, mientras que el isómero *cis*-OMC presenta un máximo a 310 nm. Como puede verse, ambos isómeros tienen similar longitud de onda de absorción; sin embargo, sus coeficientes de absorción molar (ϵ) difieren significativamente entre sí, ya que el valor de ϵ para el isómero *cis*-OMC ($\epsilon_{cis} = 12,600 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) es marcadamente más bajo que el correspondiente valor para el isómero *trans*-OMC ($\epsilon_{trans} = 24,000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), a sus respectivas longitudes de onda. Por lo tanto, este hecho genera una reducción significativa de la eficiencia del OMC como filtro químico solar ^[121].

La fotoisomerización del OMC continúa con un proceso de fotodegradación y fotodimerización (Fig. 3.2), en el cual se generan diversos subproductos, como 4-

¹²⁰ PATTANAARGSON S., MUNHAPOL T., HIRUNSUPACHOT P., LUANGTHONGARAM P., Photoisomerization of octyl methoxycinnamate, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2004, 161, 269-274.

¹²¹ TARRAS-WAHLBERG N., STENHAGEN G., LARKO O., ROSÉN A., WENNERBERG A. M., WENNERSTROM O., Changes in ultraviolet absorption of sunscreens after ultraviolet irradiation, *The Journal of Investigative Dermatology* 1999, 113, 547-553.

metoxibenzaldehído (4-MBA), 2-etilhexanol (2-EH), ciclodímeros y un producto de degradación obtenido a partir de la hidrólisis de los ciclodímeros ^[122].

¹²² MACMANUS-SPENCER L. A., TSE M. L., KLEIN J. L., KRACUNAS A. E., Aqueous Photolysis of the Organic Ultraviolet Filter Chemical Octyl Methoxycinnamate, *Environmental Science and Technology* 2011, 45, 9, 3931-3937.

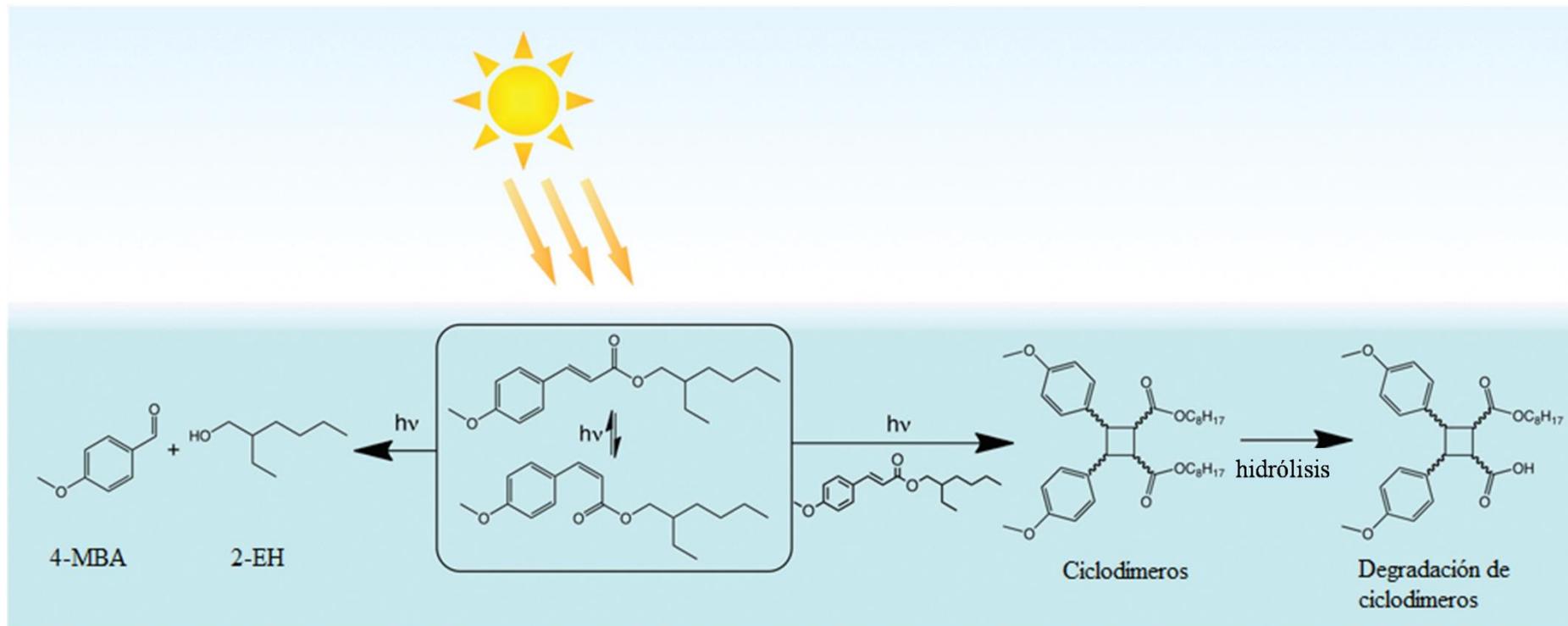


Figura 3.2 Esquema de la fotólisis directa del OMC y sus productos de fotodegradación y fotoisomerización. Adaptado de Pattanaargson y col.^[118]. Seguido al proceso de fotoisomerización se generan subproductos como 4-metoxibenzaldehído (4-MBA), 2-etilhexanol (2-EH), ciclodímeros y un producto de degradación obtenido a partir de la hidrólisis de los ciclodímeros.

MacManus-Spencer y col. (2011) estudiaron la cinética y la eficacia cuántica de la fotólisis directa de OMC y su dimerización en solución acuosa ^[123]. Por otro lado, Pattanaargson y col. (2001) ^[124] y Hanson y col. (2015) ^[125] monitorearon la fotodegradación de OMC en soluciones diluidas y en suspensiones coloidales. Además, Krishnan y col. (2006) estudiaron las propiedades espectrales de fluorescencia del OMC y otros filtros químicos solares adsorbidos en nanoesferas dieléctricas ^[126].

Como se ha mencionado en capítulos anteriores (sección 1.5), las MEs son sistemas apropiados para proteger moléculas sensibles a los efectos de ciertas variables como la radiación UV. Por ello, resulta de interés el estudio analítico del proceso de fotodegradación del OMC cargado en las nuevas formulaciones propuestas (MEI-OMC y MEII-OMC), ya que como hemos citado, el mismo genera una reducción significativa de la eficiencia del OMC como filtro químico solar ^[127]. Para abordar este estudio, es necesario monitorear la cinética del proceso, para luego obtener las correspondientes constantes cinéticas de fotodegradación. Desde el punto de vista experimental, es útil el empleo de técnicas que generen gran cantidad de datos en breves períodos de tiempo y, además, posibiliten el estudio en línea, de manera de poder monitorear de forma continua y a lo largo del tiempo dicho proceso. Sin embargo, los datos cinéticos generados requieren la aplicación de modelos estadísticos más complejos, que permitan el análisis de un gran volumen de datos. Por otro lado, las técnicas analíticas a emplear

¹²³ MACMANUS-SPENCER L. A., TSE M. L., KLEIN J. L., KRACUNAS A. E., Aqueous Photolysis of the Organic Ultraviolet Filter Chemical Octyl Methoxycinnamate, *Environmental Science and Technology* 2011, 45, 9, 3931-3937.

¹²⁴ PATTANAARGSON S., LIMPHONG P., Stability of octyl methoxycinnamate and identification of its photo-degradation product, *International Journal of Cosmetic Science* 2001, 23, 3, 153-160.

¹²⁵ HANSON K. M., NARAYANAN S., NICHOLS V. M., BARDEEN C. J., Photochemical degradation of the UV filter octyl methoxycinnamate in solution and in aggregates, *Photochemical and Photobiological Sciences* 2015, 14, 1607-1616.

¹²⁶ KRISHNAN R., PRADHAN S., TIMARES L., KATIYAR S. K., ELMETS C. A., NORDLUND T. M., Fluorescence of sunscreens adsorbed to dielectric nanospheres: parallels to optical behavior on haCAT cells and skin., *Photochemistry and Photobiology* 2006, 82, 6, 1557-1565.

¹²⁷ HERZOG B., AMORÓS-GALICIA L., SOHN M., HOFER M., QUASS K., GIESINGER J., Analysis of photokinetics of 2-ethylhexyl-4-methoxycinnamate in sunscreens, *Photochemical and Photobiological Sciences* 2019, 18, 7, 1773-1781.

deben ser capaces de aportar información confiable respecto de las especies en estudio, aun cuando éstas formen parte de sistemas organizados como son las MEs.

3.2.1 Espectroscopia de fluorescencia molecular

Los avances en la investigación de PPCPs requieren el uso de técnicas analíticas sensibles, selectivas, rápidas y robustas. La fluorescencia molecular es una técnica de gran aplicación en Química Analítica ya que reúne, en muchos casos, las características antes descritas, resultando apropiada tanto para la determinación de un gran número de especies químicas ^[128] como para el monitoreo de diversos procesos que ocurren a lo largo del tiempo ^[129].

Como es sabido, la fluorescencia molecular es un proceso luminiscente en el que una especie química es excitada por medio de la absorción de fotones y durante el proceso de relajación hacia el estado fundamental emite radiación a una longitud de onda mayor ($\lambda_{\text{emisión}}$) que la correspondiente longitud de onda de excitación ($\lambda_{\text{excitación}}$).

En la Fig. 3.3 se muestra el diagrama parcial de niveles de energía para una especie molecular fotoluminiscente.

¹²⁸ STOKES R. P., DIFFEY B. L., The feasibility of using fluorescence spectroscopy as a rapid, non-invasive method for evaluating sunscreens performance, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 1999, 50, 2, 137-143.

¹²⁹ WEBER G., Fluorescence methods in kinetic studies, *Methods in Enzymology* 1969, 16, 380-394.

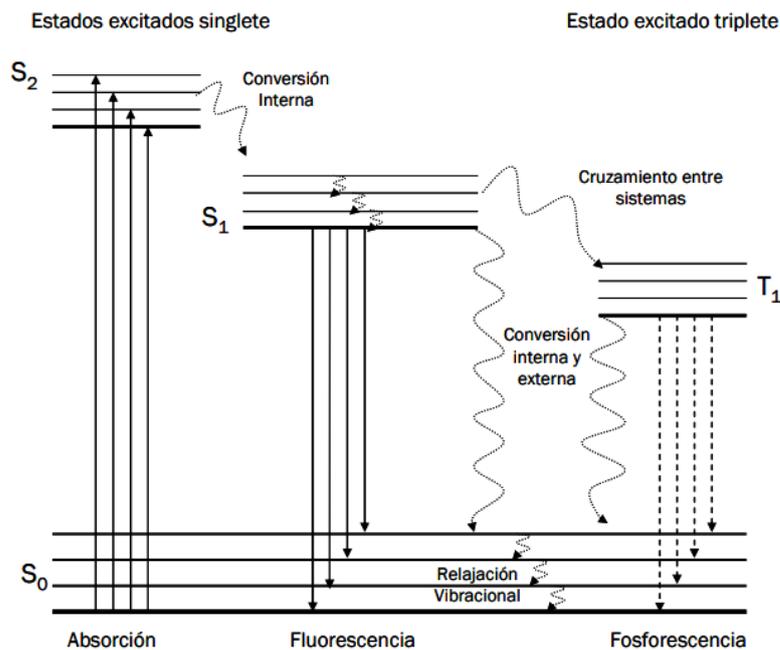


Figura 3.3 Diagrama parcial de niveles de energía para un sistema fotoluminiscente. Adaptado de [130].

Con respecto a la instrumentación, la técnica de fluorescencia molecular requiere de un equipamiento relativamente simple y económico, tal como se muestra en la Fig. 3.4.

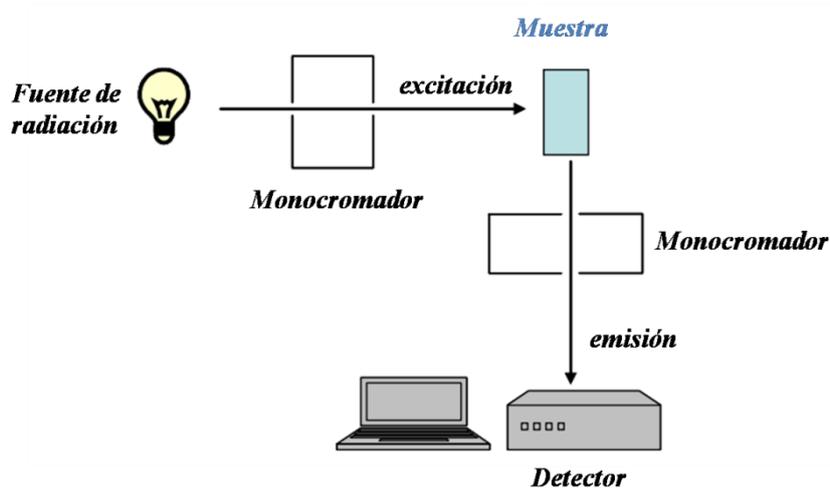


Figura 3.4 Esquema básico de los componentes de un espectrofluorímetro.

¹³⁰ SKOOG D. A., WEST D. M., HOLLER F. J., Fundamentos de Química Analítica, 8va Edición, Ed. Thomson, 2000.

Por otro lado, tanto la estructura molecular como el entorno químico van a influir en que una especie sea o no fluorescente. Estos factores también determinan la intensidad de emisión cuando tiene lugar la fotoluminiscencia. Con respecto a la estructura molecular, en general, en las especies químicas que presentan estructuras aromáticas con transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ se favorece la emisión de fluorescencia, aunque este hecho está condicionado a la presencia de ciertos sustituyentes que pueden estar presentes en el anillo, así como de la rigidez que presenta la estructura de la molécula, entre otros. En cuanto al entorno, la viscosidad del medio es una variable importante ya que medios poco viscosos disminuyen la emisión de fluorescencia debido a la pérdida de energía por conversión externa (Fig 3.3). El mismo efecto se produce por aumento de la temperatura. El pH es una variable importante principalmente cuando la molécula presenta sustituyentes ácidos o básicos en su estructura.

Particularmente, en lo que respecta al filtro químico solar OMC, tanto el isómero *cis*-OMC como el isómero *trans*-OMC presentan fluorescencia molecular, con un máximo de excitación a 354 nm. En la Fig. 3.5 se observan los espectros de fluorescencia de ambos isómeros en un medio etanol:agua (1:1) a pH 6 (25 °C), cuando la muestra se excita a dicha longitud de onda. Como puede observarse, el máximo de emisión para el isómero *cis*-OMC es 405 nm, mientras que el correspondiente al isómero *trans*-OMC es 410 nm.

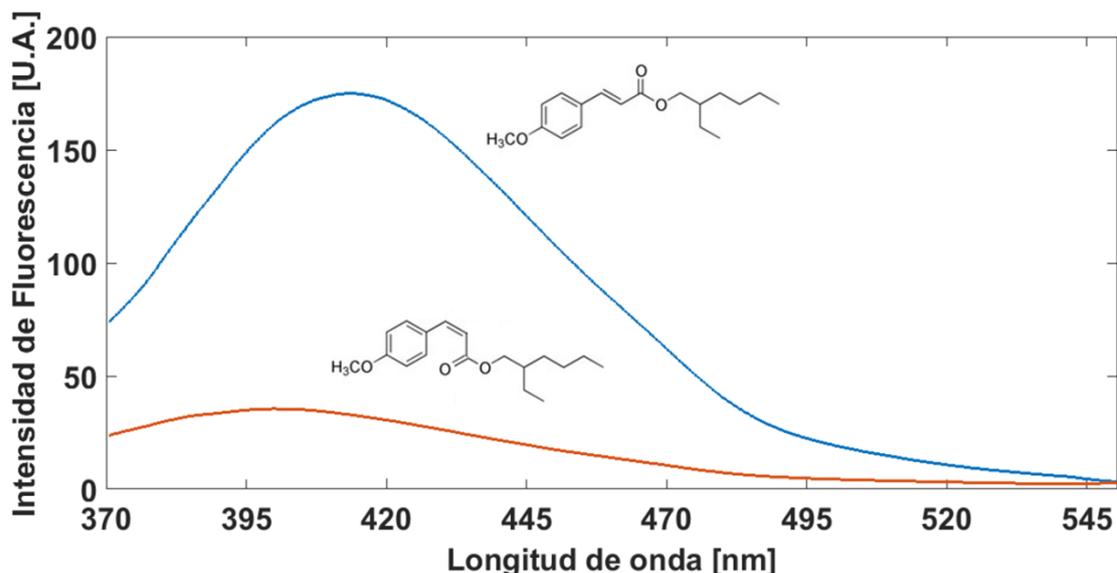


Figura 3.5 Espectros de fluorescencia a 25 °C (pH = 6) correspondientes a los isómeros del OMC en un medio etanol:agua (1:1). El isómero *cis*-OMC está representado en color naranja mientras que isómero *trans*-OMC está representado en color azul. El valor máximo de emisión en cada caso es de 405 y 410 nm, respectivamente.

Este comportamiento resulta de gran utilidad ya que puede ser un punto de partida para monitorear el proceso de fotoisomerización del OMC, principalmente cuando se encuentra cargado en las formulaciones propuestas. Sin embargo, como hemos mencionado anteriormente, el monitoreo mediante técnicas ópticas a lo largo del tiempo genera gran cantidad de datos, los cuales, en general, deben ser analizados mediante modelos matemáticos relativamente complejos.

3.2.2 Análisis de datos mediante algoritmos de segundo orden

Resolución multivariada de curvas optimizada mediante mínimos cuadrados alternados (MCR-ALS) permite explotar la denominada *ventaja de segundo orden*. Esta ventaja se refiere a la capacidad que presentan ciertos algoritmos de segundo orden de poder predecir la concentración de los componentes de una muestra en presencia de un gran número de interferencias.

MCR-ALS consiste en la descomposición matemática de la señal analítica en las contribuciones debidas a los componentes puros del sistema, las cuales pueden representarse como un modelo bilineal, como sigue:

$$\mathbf{D} = \mathbf{C}\mathbf{S}^T + \mathbf{E} \quad \text{Ecuación 3.1}$$

donde \mathbf{D} es la matriz experimental de datos espectrales, \mathbf{C} es la matriz que describe los cambios en la concentración de las especies presentes en el sistema en estudio, \mathbf{S}^T es la matriz que contiene los espectros de dichas especies (perfiles espectrales) y \mathbf{E} es la matriz de residuales.

La primera parte del análisis de datos consiste en seleccionar el número de componentes que produce las variaciones en los espectros (rango químico). En el siguiente paso, el algoritmo ALS requiere de una estimación inicial ya sea de los perfiles de concentración \mathbf{C} o de los perfiles de respuestas \mathbf{S}^T , para comenzar la optimización. Se puede aplicar el método SIMPLISMA (del inglés, *simple-to-use interactive self-modelling mixture analysis*), el cual permite hallar las variables más puras en el conjunto de datos experimentales. Este método trabaja sobre variables reales y el mismo se basa en la evaluación de la desviación estándar relativa para cada columna de la matriz de datos. A continuación, se selecciona la columna con mayor desviación estándar relativa, la cual se normaliza, obteniéndose de esta manera la primera variable pura. En consecuencia, las variables puras halladas serán aquellas que posean la mayor desviación estándar relativa y una mínima correlación con la primera variable. El valor del determinante calculado tendrá un valor más alto en la medida que las variables no estén correlacionadas, mientras que para variables correlacionadas dará un valor cercano a cero. De esta manera, \mathbf{C} y \mathbf{S}^T se calculan repetidamente hasta que se

logra la convergencia o hasta alcanzar una diferencia previamente establecida entre las iteraciones ^[131].

Por lo tanto, MCR-ALS es una metodología con un amplio potencial para el análisis y modelado de datos en la monitorización de procesos químicos. Este algoritmo permite obtener los perfiles de concentración en función del tiempo y los perfiles de concentración puros a partir de los espectros correspondientes a una mezcla conteniendo distintas especies. Esto hace que esta metodología sea útil para evaluar el perfil cinético de un determinado proceso químico y permita el análisis de sistemas de multicomponentes ^[132], sin recurrir a técnicas analíticas separativas y aplicando restricciones que ayudan a la resolución. Entre las restricciones más aplicadas se encuentran: no negatividad, unimodalidad, selectividad, igualdad, entre otras.

Por otro lado, la aplicación de técnicas de análisis multivariado a datos de origen espectroscópico, se puede llevar a cabo mediante modelos duros o suaves. Los métodos de modelado duro (en inglés, *hard modelling*) requieren que se asuma un modelo cinético para la reacción en estudio, y el objetivo es extraer los parámetros básicos que definen al mismo. La elección correcta, cuando no se dispone de un conocimiento químico profundo del sistema o en el caso en que existan especies que contribuyan a la señal y que no se encuentren contempladas en el modelo propuesto, depende de largos procedimientos basados en prueba y error. Por otra parte, los métodos de modelado suave (en inglés, *soft modelling*) se utilizan en los casos donde no es necesario postular un modelo cinético que describa el comportamiento del sistema en estudio. Además, se

¹³¹ GARRIDO M., M. S. LARRECHI; F. X. RIUS, Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares (MCR-ALS) applied to spectroscopic data from monitoring chemical reactions processes, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2008, 390, 2059-2066.

¹³² RAZUC M. F., GRÜNHUT M., SAIDMAN E., GARRIDO M., BAND B. F., Green method based on a flow-batch analyzer system for the simultaneous determination of ciprofloxacin and dexamethasone in pharmaceuticals using chemometric approach, *Talanta* 2013, 115, 314-322.

pueden modelar las señales originadas por analitos que no siguen un esquema de reacción bien definido, o que no participan del proceso estudiado.

El modelado híbrido (en inglés, *hybrid soft and hard-modelling*) constituye una combinación del modelado duro y suave e incorpora restricciones para forzar a los perfiles de concentración a cumplir un modelo cinético propuesto. En cada iteración, los perfiles de concentración obtenidos mediante modelado suave pasan a través de una rutina de ajuste no lineal con el fin de que dichos perfiles de concentración se ajusten al modelo cinético preestablecido, permitiendo modelar contribuciones no relacionadas con el proceso de reacción estudiado mientras que, gracias al modelado duro, es posible obtener las constantes cinéticas del proceso ^[133].

En esta parte del trabajo de Tesis plantea analizar mediante un estudio cinético la capacidad de las MEs obtenidas de proteger de la fotodegradación al filtro químico solar OMC. Para ello, se desarrolló en el laboratorio un sistema automático para monitorear en tiempo real el proceso de fotodegradación del OMC libre y cargado en las formulaciones propuestas (MEI-OMC y MEII-OMC) empleando la espectrometría de fluorescencia molecular como técnica de detección en línea y analizando los datos de segundo orden mediante MCR-ALS.

3.3 Parte Experimental

3.3.1 Materiales

Todos los reactivos empleados fueron de calidad analítica. Las soluciones se prepararon usando agua ultra pura (18M Ω cm). El medio no organizado (NO) estuvo conformado por una mezcla etanol:agua (1:1).

¹³³ RAZUC M. F., GARRIDO M., CARO Y. S., TEGLIA C. M., GOICOECHEA H. C., BAND B. F., Hybrid hard-and soft-modeling of spectrophotometric data for monitoring of ciprofloxacin and its main photodegradation products at different pH values, *Spectrochimica Acta part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 2013, 106, 146-154.

- ✚ Decaetilenglicol mono-dodecil éter (Sigma)
- ✚ Etanol absoluto (Dorwil)
- ✚ Ácido oleico (Applichem)
- ✚ Octil-p-metoxicinamato (Sigma)
- ✚ Aceite esencial de albahaca (Euma)

Las formulaciones analizadas fueron las microemulsiones sin cargar (MEI y MEII) y MEI-OMC y MEII-OMC, éstas dos últimas conteniendo un 5,0 y 1,5 % (p/p) del filtro químico solar OMC, respectivamente. Todas las formulaciones fueron obtenidas tal como se describió en el Capítulo II, sección 2.4.3.

3.3.2 Métodos

3.3.2.1 Sistema automático en línea para el estudio de fotodegradación

El estudio de fotodegradación del OMC en las muestras indicadas anteriormente se realizó en un sistema automático en línea con detección fluorescente (Fig. 3.6), el cual fue diseñado y desarrollado en el laboratorio.

Como puede verse, el sistema estuvo constituido por un fotorreactor, el cual estuvo conformado por un tubo de PTFE (0,5 mm d.i.) de 12 m de longitud (volumen del reactor: 9,42 mL) enrollado helicoidalmente en una lámpara de mercurio Philips® UVB (15 W). Las muestras fueron propulsadas en el sistema mediante una bomba peristáltica marca Gilson®, modelo Minipuls 3 a un caudal de 0,78 mL min⁻¹. De esta forma, el tiempo de permanencia en el fotorreactor fue de 12 min. A continuación, las muestras se dirigieron hacia una celda de flujo de cuarzo (90°, 150 µL), marca Hellma®, ubicada en el espectrofluorímetro. La señal analítica se registró de forma continua y, finalmente, las muestras fueron propulsadas a un reservorio de desechos. El estudio se realizó a temperatura ambiente (25 °C).

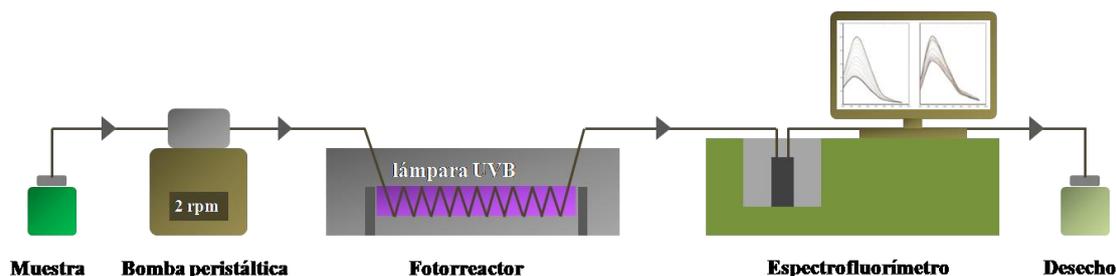


Figura 3.6 Esquema del sistema de flujo continuo utilizado para el estudio de fotodegradación de OMC. Las flechas indican la dirección del flujo (caudal: $0,78 \text{ mL min}^{-1}$).

3.3.2.2 Adquisición de datos

Los datos fueron adquiridos en un espectrofluorímetro marca JASCO®, modelo FP6500, equipado con una lámpara de descarga de xenón (150W). Se utilizó un ancho de ranura de 3 nm para ambos monocromadores (excitación y emisión). La longitud de onda de excitación fue de 354 nm y los espectros de emisión se registraron entre 370 y 550 nm. La velocidad de barrido fue de 500 nm min^{-1} , y el voltaje del tubo fotomultiplicador fue de 600 V. El intervalo de adquisición y el tiempo de integración se fijaron en 0,1 nm y 1,0 s, respectivamente. De esta manera, los espectros de fluorescencia de las muestras se registraron cada 30 s, lo que representó un total de 24 espectros por muestra. Debido a que las señales de emisión de fluorescencia se registraron cada 0,1 nm, cada espectro estuvo conformado por 1800 variables.

3.3.2.3 Análisis de datos

Considerando el número de espectros obtenidos por muestra (24) y el número de variables por espectro (1800), se obtuvieron por cada muestra una matriz de datos de 24×1800 . El análisis de datos mediante MCR-ALS fue llevado a cabo usando la rutina MCR-ALS_GUI_2.0 ^[134] la cual se ejecutó mediante el programa MatLab®, versión 2010.a.

¹³⁴ MULTIVARIATE CURVE RESOLUTION HOMEPAGE. Disponible en: <http://www.mcrals.info/>

Por otro lado, para el proceso de optimización de MCR-ALS se aplicó como restricción la no negatividad, tanto a los perfiles espectrales como a los perfiles de concentración. Además, el algoritmo requirió información adicional como, por ejemplo: las concentraciones iniciales de cada especie, un vector indicando los tiempos de reacción y un valor estimativo de las constantes cinéticas en cada caso.

3.4 Resultados y Discusión

3.4.1 Sistema automático en línea

Los parámetros del sistema automático en línea se optimizaron por el método univariado. El criterio utilizado fue un compromiso entre sensibilidad y reproducibilidad de la señal analítica. En la Tabla 3.1 se muestran los intervalos de los valores estudiados y los valores óptimos seleccionados.

Tabla 3.1 Optimización de los parámetros del sistema automático en línea.

Parámetros sistema en línea	Intervalo estudiado	Valor óptimo
Caudal (mL min ⁻¹)	0,50-1,00	0,78
Volumen de muestra (mL)	-	9,42
Longitud del fotorreactor (m)	10-15	12
Tiempo de permanencia (min)	-	12

El tipo y longitud del fotorreactor resultaron apropiados para el monitoreo del OMC frente a la influencia de la radiación UVB. Por otro lado, el caudal seleccionado como óptimo permitió estudiar el proceso de fotodegradación durante 12 min. A partir de ese tiempo, la señal analítica se hizo constante, probablemente debido a fotodegradación total del *trans*-OMC, por lo que no fue necesario extender el tiempo de estudio bajo las condiciones establecidas.

3.4.2 Estudio de fotodegradación

El estudio de fotodegradación se realizó a fin de evaluar el posible efecto protector que pueden ejercer los sistemas portadores propuestos sobre el OMC, cuando las formulaciones son sometidas a los efectos de la radiación UV, particularmente UVB.

Los espectros de fluorescencia obtenidos correspondientes a las formulaciones MEI-OMC y MEII-OMC se pueden observar en las Fig. 3.7 (a) y Fig. 3.8 (a), respectivamente. En ambos casos la intensidad de la señal fluorescente registrada entre 370 y 490 nm disminuye en función del tiempo. Este hecho está relacionado principalmente con el proceso de fotoisomerización del OMC, es decir, la transformación del isómero *trans*-OMC al isómero *cis*-OMC por acción de la radiación UV. Este proceso de fotoisomerización también queda demostrado a partir del corrimiento de la longitud de onda del máximo de emisión que muestran los espectros, puntualmente de 410 a 405 nm. Por otra parte, la disminución de la señal de fluorescencia se debe a la disminución de la eficiencia cuántica (Φ) del isómero *cis*-OMC respecto del isómero *trans*-OMC, de manera análoga a lo que ocurre con los respectivos coeficientes de absortividad molar (ϵ), tal como se explicó en la sección 3.2 [135 136].

Adicionalmente, se realizó un estudio de fotólisis de los sistemas organizados sin cargar, a fin de evaluar el comportamiento espectral de los componentes de las MEs propuestas frente a la radiación UV. La Fig. 3.7 (b) y la Fig. 3.8 (b) muestran los espectros de fluorescencia de MEI y MEII en el rango de longitudes de onda estudiado, respectivamente. Las señales obtenidas en cada caso están asociadas a la presencia de

¹³⁵ MACMANUS-SPENCER L. A., TSE M. L., KLEIN J. L., KRACUNAS A. E., Aqueous Photolysis of the Organic Ultraviolet Filter Chemical Octyl Methoxycinnamate, *Environmental Science and Technology* 2011, 45, 9, 3931-3937.

¹³⁶ HANSON K. M., NARAYANAN S., NICHOLS V. M., BARDEEN C. J., Photochemical degradation of the UV filter octyl methoxycinnamate in solution and in aggregates, *Photochemical and Photobiological Sciences* 2015, 14, 1607-1616.

ciertos componentes de las MEs, como: productos de oxidación de la fase interna (AO) en el caso de MEI, con picos alrededor de 445 y 475 nm ^[137], y a los compuestos que constituyen el AEA en MEII, tales como: fenoles y tocoferoles (entre 300 y 390 nm), y vitamina E (525 nm), entre otros ^[138 139 140]. Por otra parte, la radiación UV aplicada a estos sistemas disminuyó la señal fluorescente a lo largo del tiempo, sugiriendo que hay un proceso de fotodegradación de los componentes de las MEs.

Finalmente, se realizó un estudio de fotólisis sobre muestras de OMC preparadas en un medio no-organizado. Estas muestras fueron preparadas con las mismas concentraciones de OMC que las formulaciones propuestas, esto es 5,0 y 1,5% de OMC (NOI-OMC y NOII-OMC, respectivamente). El medio no organizado estuvo conformado por una mezcla etanol:agua (1:1), debido a la alta lipofilia del filtro químico en estudio.

Como es de esperar, cuando se analizan los espectros de fluorescencia del OMC en un medio no-organizado (Fig. 3.7 (c) y Fig. 3.8 (c)) se observa una disminución en la señal correspondiente a los espectros de fluorescencia en función del tiempo debido, como hemos mencionado, al proceso de fotoisomerización del OMC.

Cuando se compara MEI-OMC y NOI-OMC (Fig 3.7 (a) y 3.7 (c)) se puede observar que en ambos casos las señales de fluorescencia se hacen constantes a medida que nos acercamos al tiempo máximo de fotodegradación (12 min), tal como se explicó en la sección 3.4.1. Sin embargo, en el sistema NOI-OMC, puede advertirse a simple

¹³⁷ MILANEZ K. D. T. M., NÓBREGA T. C. A., NASCIMENTO D. S., INSAUSTI M., BAND B. S. F., PONTES M. J. C., Multivariate modeling for detecting adulteration of extra virgin olive oil with soybean oil using fluorescence and UV-Vis spectroscopies: A preliminary approach, *LWT – Food Science and Technology* 2017, 85, 9-15.

¹³⁸ GUZMÁN E., BAETEN V., PIERNA J. A., GARCÍA-MESA J. A., Evaluation of the overall quality of olive oil using fluorescence spectroscopy, *Food Chemistry* 2015, 173, 927-634.

¹³⁹ SIKORSKA E., KHMELINSKII I., SIKORSKI M., Analysis of olive oils by fluorescence spectroscopy: Methods and applications, Ed. In Boskou Dimitrios, 2012, Capítulo 4, páginas 63-88.

¹⁴⁰ ZANDOMENEGHI M., CARONARO L., CAFFARATA C. Fluorescence of vegetable oils: Olive Oils, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005, 53, 759-766.

vista que la velocidad de fotodegradación del OMC es mayor respecto al sistema MEI-OMC.

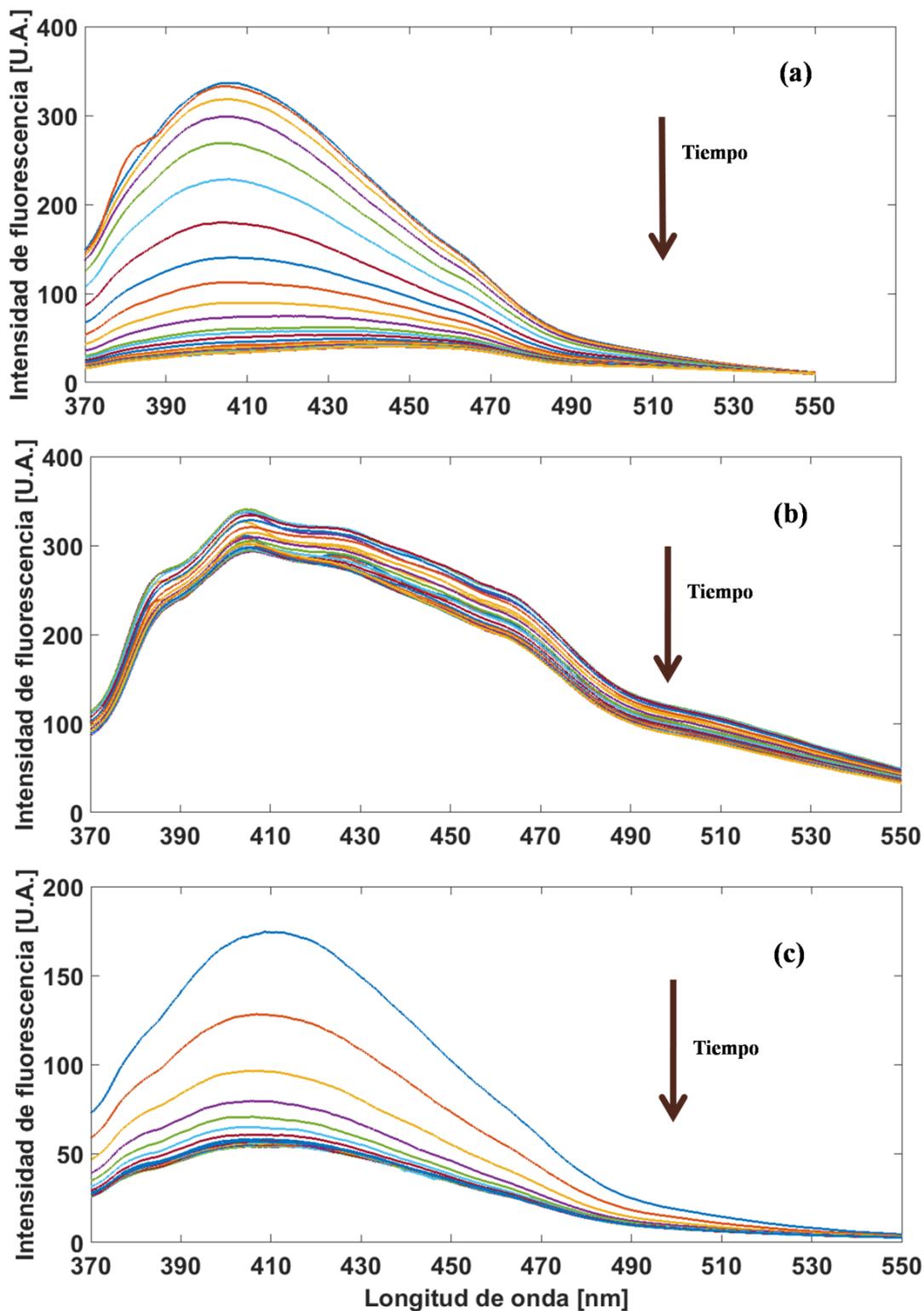


Figura 3.7 Espectros de fluorescencia en función del tiempo de fotodegradación (12 min) correspondientes a las muestras (a) MEI-OMC (b) MEI y (c) NOI-OMC. En total se registraron 24 espectros por muestra. La flecha indica el aumento en el tiempo de fotodegradación.

Análogamente, cuando se compara MEII-OMC y NOII-OMC (Fig. 3.8 (a) y 3.8 (c), respectivamente) se puede observar el decaimiento de la señal de fluorescencia a lo largo del tiempo de fotodegradación. En este caso, las diferencias entre las muestras MEII-OMC y NOII-OMC son más sutiles. Sin embargo, al analizar las intensidades de las señales de fluorescencia se observa que la velocidad de fotodegradación del OMC en la muestra NOII-OMC es mayor respecto al sistema MEI-OMC.

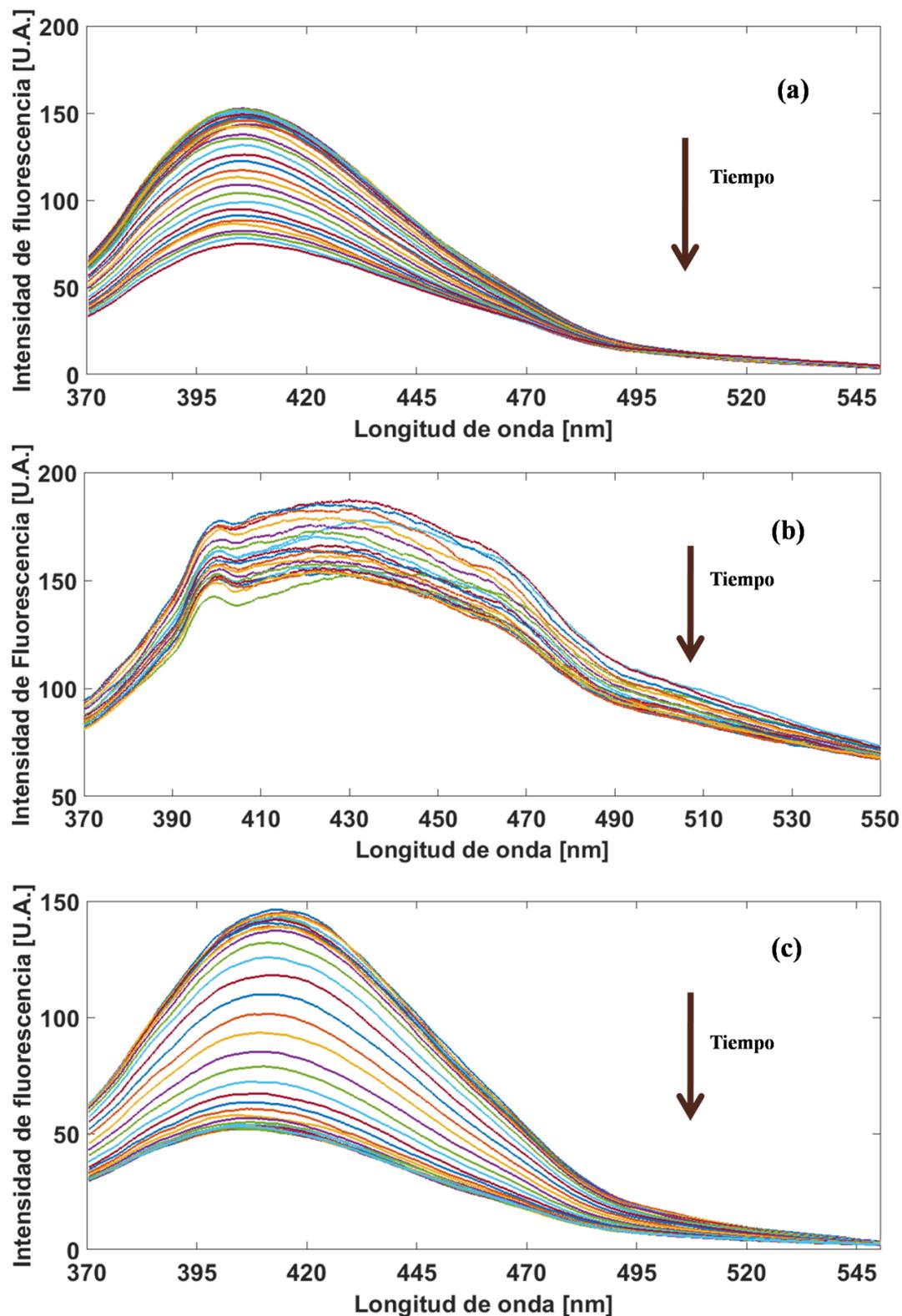


Figura 3.8 Espectros de fluorescencia en función del tiempo de fotodegradación (12 min) correspondiente a las muestras (a) MEII-OMC (b) MEII y (c) NOII-OMC. En total se registraron 24 espectros por muestra. La flecha indica el aumento en el tiempo de fotodegradación.

A partir de este análisis espectral, puede concluirse a priori que la disminución de la señal de fluorescencia a lo largo del tiempo de fotodegradación, tanto para las formulaciones propuestas como para los sistemas no-organizados, se debe principalmente al proceso de fotoisomerización del OMC, bajo las condiciones estudiadas.

3.4.3 Análisis de datos mediante MCR-ALS

Los datos espectrales recolectados correspondientes al proceso de fotodegradación contienen valiosa información sobre las especies involucradas en el proceso.

La matriz de datos espectrales fue descompuesta en los espectros puros correspondientes a los constituyentes de las muestras y, lo más importante para el estudio cinético, la evolución de los perfiles de concentración de las especies en función del tiempo de fotodegradación.

En el caso del estudio de MEI-OMC, los perfiles de concentración obtenidos correspondientes a las muestras NOI-OMC y MEI-OMC se muestran en la Fig. 3.9 (a) y en la Fig. 3.9 (b), respectivamente. Como puede observarse, se obtuvieron tres perfiles de concentración. El perfil de color azul puede interpretarse como una disminución en la concentración de una especie a lo largo del tiempo de fotodegradación. Este hecho es compatible con la desaparición de *trans*-OMC, el cual se isomeriza a *cis*-OMC, éste último representado ahora por el perfil de color amarillo, el cual aumenta de concentración a lo largo del tiempo. A su vez, se puede advertir la presencia de una tercer especie (perfil de color naranja punteado), la cual podría corresponder a un intermediario de fotodimerización, tal como se comentó en la sección 3.2 ^[141 142].

¹⁴¹ MACMANUS-SPENCER L. A., TSE M. L., KLEIN J. L., KRACUNAS A. E., Aqueous Photolysis of the Organic Ultraviolet Filter Chemical Octyl Methoxycinnamate, *Environmental Science and Technology* 2011, 45, 9, 3931-3937.

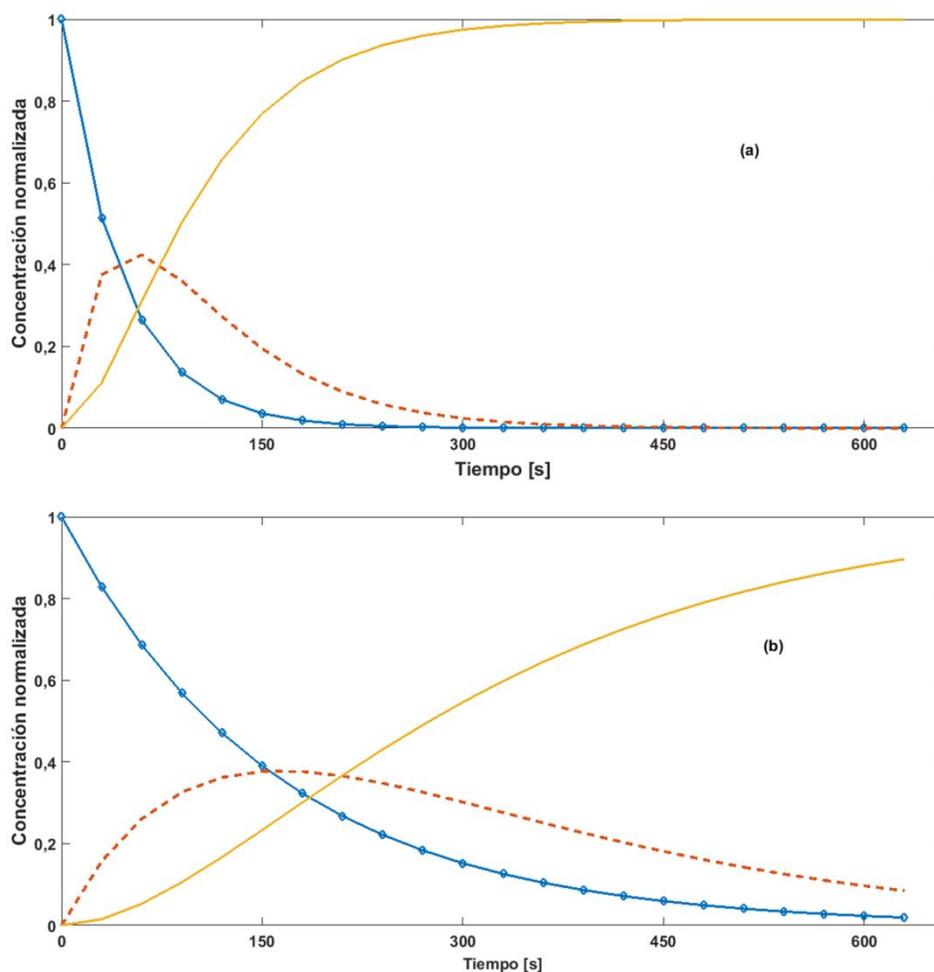


Figura 3.9 Perfiles de concentración correspondientes a la fotodegradación de OMC: a) en un medio no-organizado (NOI-OMC) y b) cargado en la MEI (MEI-OMC). Las líneas azules con puntos representan al isómero (*trans*-OMC), las líneas amarillas continuas (al isómero *cis*-OMC) y las líneas naranjas punteadas corresponden a un intermediario, posiblemente un fotodímero.

Con respecto al estudio de MEII-OMC, la Fig. 3.10 (a) y la Fig. 3.10 (b) muestran los perfiles de concentración obtenidos correspondientes a las muestras NOI-OMC y MEII-OMC, respectivamente.

Como puede verse, el comportamiento de los perfiles de concentración en ambas muestras es similar al caso anterior, donde el fotoisómero *trans*-OMC va disminuyendo

¹⁴² STEIN H. V., BERG C. J., MAUNG J. N., O'CONNOR L. E., PAGANO A. E., LAURA A. MACMANUS-SPENCER L. A., PAULICK M. G., Photolysis and cellular toxicities of the organic ultraviolet filter chemical octyl methoxycinnamate and its photoproducts, *Environmental Science: Processes and Impacts* 2017, 19, 6, 851-860.

su concentración al mismo tiempo que va apareciendo *cis*-OMC. Paralelamente, puede apreciarse la evolución de otra especie, probablemente un fotodímero.

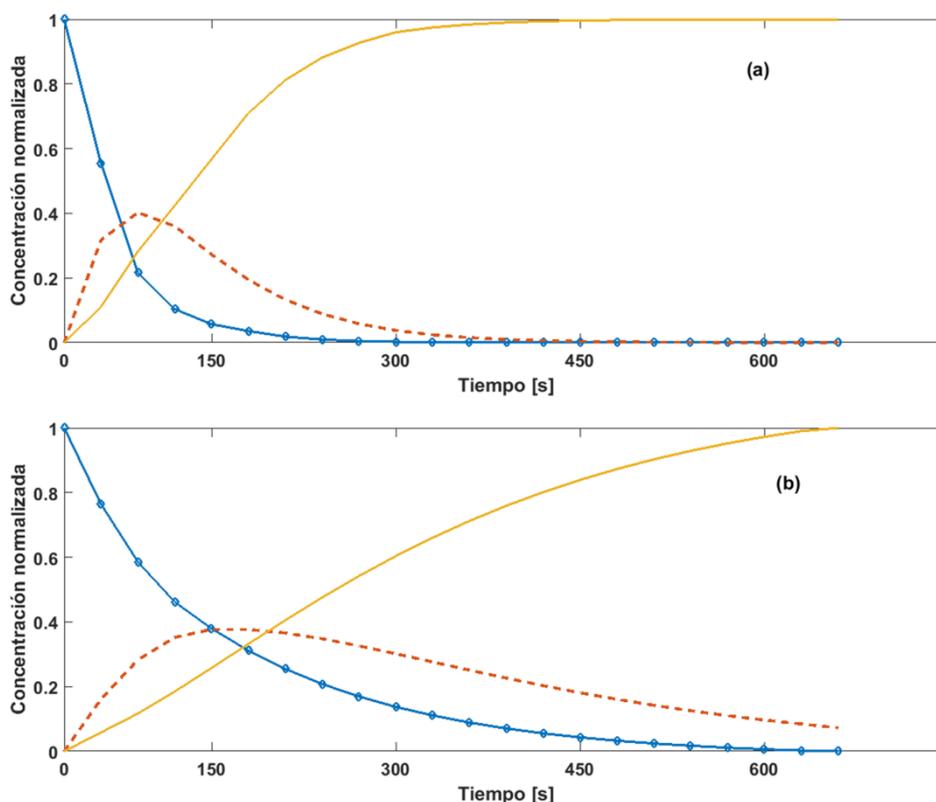


Figura 3.10 Perfiles de concentración correspondientes a la fotodegradación de OMC: a) en un medio no-organizado (NOII-OMC), y b) cargado en la MEII (MEII-OMC) Las líneas azules con puntos representan al isómero *trans*-OMC), las líneas amarillas continuas al isómero *cis*-OMC) y las líneas naranjas punteadas corresponden a un intermediario, posiblemente un fotodímero.

Por ello, el mecanismo de reacción considerado para el proceso de fotodegradación de OMC tanto en NOI-OMC y MEI-OMC como para NOII-OMC y MEII-OMC fue $A \rightarrow B$ y $B \rightarrow C$, en donde primeramente se produce la fotoisomerización del OMC seguido de un proceso de fotodimerización, el cual genera un subproducto.

3.4.4 Obtención de las constantes cinéticas

Las constantes cinéticas de fotodegradación (K_f) de los sistemas estudiados se calcularon utilizando los correspondientes perfiles de concentración (Fig. 3.9 y Fig. 3.10). Como puede verse, las curvas mostraron una reducción en la tasa de fotoisomerización a lo largo del tiempo. Así, la disminución de la concentración de *trans*-OMC en función del tiempo siguió una cinética de primer orden:

$$\ln [(C_t - C_{inf}) / (C_0 - C_{inf})] = kt \quad \text{Ecuación 3.2}$$

donde C_t es la concentración de *trans*-OMC en el tiempo t , C_{inf} es la concentración de *trans*-OMC a tiempo infinito, C_0 es la concentración inicial de *trans*-OMC, t es el tiempo de fotoisomerización en segundos, y k es la constante cinética.

Las curvas obtenidas luego de aplicar el modelo cinético propuesto se pueden observar en la Fig. 3.11.

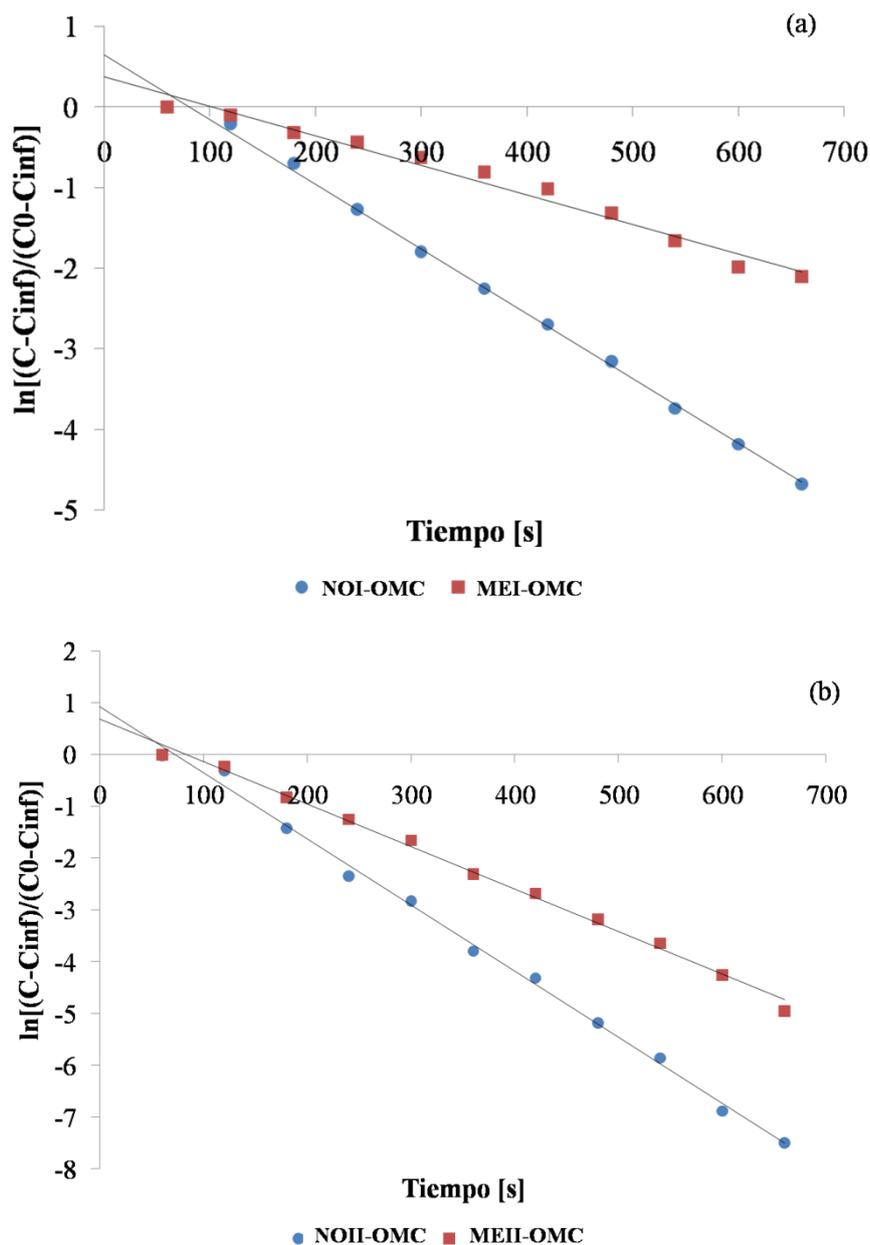


Figura 3.11 Curvas obtenidas aplicando una cinética de primer orden a los perfiles de concentración de cada muestra analizada. (a) NOI-OMC (círculos azules) y MEI-OMC (cuadrados rojos) y (b) NOII-OMC (círculos azules) y MEII-OMC (cuadrados rojos).

Los modelos presentaron un óptimo ajuste y a partir de los mismos se extrajeron las correspondientes constantes de fotodegradación (K_f) para todos los sistemas, es decir, tanto para NOI-OMC y MEI-OMC como para NOII-OMC y MEII-OMC (Tabla 3.2).

Tabla 3.2 Constantes cinéticas de fotodegradación (K_f) a 25 °C calculadas para los distintos sistemas estudiados. El proceso siguió en todos los casos una cinética de primer orden.

Sistemas	NOI-OMC	MEI-OMC	NOII-OMC	MEII-OMC
K_f (s^{-1})	0,0131±0,0007	0,0049±0,0004	0,0045±0,0003	0,00172±0,0012
r^2 (primer orden)	0,978	0,997	0,995	0,996
Varianza explicada (%)	99,38	99,97	98,60	99,30

Al analizar los valores de K_f , en primer lugar, podemos ver que la tasa de fotoisomerización para OMC en un medio no organizado (NOI-OMC y NOII-OMC) es significativamente mayor ($n=3$, $t_{(n-1,0,95)}$) respecto de un medio organizado (MEI-OMC y MEII-OMC). Esto indicaría que la MEs propuestas protegen de cierta manera al filtro químico solar OMC de la fotoisomerización inducida por la radiación UVB, en las condiciones estudiadas. En un estudio adicional (Fig. 3.12), se muestra como varía el FPS a distintos tiempos de fotodegradación para el caso de la formulación MEII-OMC. Se seleccionó este sistema ya que el mismo presenta un FPS relativamente bajo (aproximadamente 2,8), con lo que la disminución de la eficacia como protector debido a la fotoisomerización del OMC impactaría de forma importante en el grado de protección. Como puede verse, el FPS disminuyó a valores cercanos a 2 por efecto de la radiación UVB para luego mantenerse constante, bajo las condiciones estudiadas. Esto es un indicio más del efecto de fotoprotección que ejerce el sistema organizado al filtro OMC.

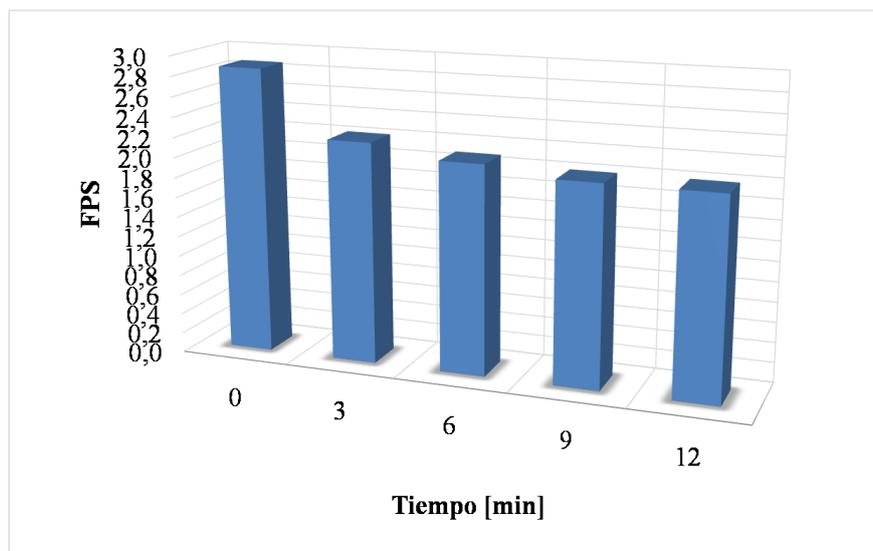


Figura 3.12 Representación del FPS correspondiente a la formulación MEII-OMC para diferentes tiempos de fotodegradación.

Por otro lado, Carlotti y col. (2007) desarrollaron nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) de octil p-metoxicinamato (OMC) para mejorar la fotoestabilidad de este principio activo ^[143]. Los mismos comprobaron que la tasa de fotodegradación del OMC depende significativamente de su concentración inicial y de la formulación utilizada. Cuando se compararon diferentes formulaciones, se descubrió que el OMC se fotodegradaba más rápidamente cuando el mismo estaba presente en un medio que contenía menos concentración de surfactantes.

En nuestro caso, MEII-OMC contiene menos concentración de surfactante que MEI-OMC (MEI-OMC: 29,2% Smix 3:1; MEII-OMC: 29,0% Smix 2:1) por lo que se esperaría una mayor K_f en el caso de MEII-OMC. Sin embargo, como se mencionó, la cinética de fotodegradación también depende de las concentraciones de filtro presente y como puede verse MEII-OMC tiene menos cantidad de OMC (1,5% (p/p)) con respecto a MEI-OMC (5,0% (p/p)), lo que justificaría su menor K_f (Tabla 3.2).

¹⁴³ CARLOTTI M. E., SAPINO S., VIONE D., MINERO C., TROTTA M., GALLARATE M., Photostability of octyl-p-methoxy cinnamate in o/w emulsion and in SLNs vehicled in the emulsions, *Journal of Dispersion Science and Technology* 2007, 28, 7, 1034-1043.

3.5 Conclusiones Parciales

En esta etapa del trabajo de tesis, se logró abordar exitosamente un estudio de fotodegradación con el fin de evaluar el comportamiento frente a la radiación UVB de las formulaciones propuestas. La espectrometría de fluorescencia molecular detectó la presencia de al menos dos componentes, *trans*-OMC y su fotoisómero *cis*-OMC. La evolución de dichas especies en función del tiempo fue evaluada mediante MCR-ALS quien, utilizando la denominada *ventaja de segundo orden*, permitió obtener los perfiles de concentración correspondientes. De esta manera, se pudo observar que, bajo las condiciones estudiadas, la fotodegradación de *trans*-OMC generaba su fotoisomerización a *cis*-OMC. Además, se observó la aparición de un tercer componente, probablemente un fotodímero. Por lo tanto, el análisis quimiométrico permitió corroborar los mecanismos de fotodegradación del OMC, que incluyeron un paso de fotoisomerización y la formación de un intermediario. La evolución de los perfiles de concentración de los fotoisómeros se ajustó a una cinética de primer orden. Las constantes de fotodegradación obtenidas demostraron que el OMC se fotoisomeriza más rápidamente en un medio no-organizado (etanol-agua) respecto de las formulaciones propuestas (MEI-OMC y MEII-OMC). A su vez, la velocidad de fotodegradación fue mayor en MEI-OMC respecto de MEII-OMC, probablemente debido a la concentración significativamente mayor de OMC que presenta la primera. Por ello, podemos decir que los sistemas portadores propuestos ejercen un efecto de fotoprotección al OMC, lo cual prolonga la efectividad del filtro químico solar en el tiempo cuando el mismo es sometido a la radiación UVB.

Por otro lado, el sistema automático en línea facilitó de manera significativa el estudio, permitiendo monitorear de forma precisa y en tiempo real dicho proceso. El

sistema es económico y de fácil implementación en cualquier laboratorio que lleve a cabo este tipo de estudios.

Capítulo 4

**ESTUDIO DE PERMEACIÓN DE OCTIL P-
METOXICINAMATO CARGADO EN
SISTEMAS DE MICROEMULSIONES**

Capítulo 4. ESTUDIO DE PERMEACIÓN DEL OCTIL P-METOXICINAMATO CARGADO EN SISTEMAS DE MICROEMULSIONES.

4.1 Objetivos

En esta parte de la tesis el objetivo principal es desarrollar una metodología analítica alternativa, de fácil implementación y bajo costo, para evaluar la cinética de permeación de las formulaciones propuestas. Para ello, se propone automatizar el tradicional método de difusión de Franz y acoplar a los mismos sistemas de detección fluorescente y UV-Vis que permitan monitorear el proceso de permeación en tiempo real. Los resultados serán validados por una técnica de frecuente uso en este tipo de estudios como es la cromatografía gaseosa.

4.2 Introducción

Actualmente, existe un constante desarrollo de PPCPs que incluyen diversas especies absorbentes (UVA y UVB) capaces de aportar distinto grado de protección solar. Como parte del control de calidad que se realiza sobre estos nuevos productos, están incluidos una serie de estudios que permiten obtener información acerca del posible comportamiento y propiedad de absorción de los mismos ^[144]. Las bajas tasas de permeación son un factor esencial en cualquier formulación cosmética segura, incluidos los protectores solares. En este caso, el grado de permeación dependerá principalmente de las propiedades fisicoquímicas del compuesto (peso molecular, coeficiente de partición (log P) y punto de fusión) ^[145], la naturaleza del portador en el que se encuentra el protector solar y de las condiciones de realización del experimento (membrana, dosis y tiempo de exposición).

En particular, las formulaciones que contienen filtros químicos solares se aplican superficialmente y, en general, sobre grandes áreas de la piel. Los filtros químicos tienen la capacidad de adherirse a la piel formando una película protectora, demostrando una alta afinidad por el estrato córneo y una baja penetración a través de la piel ^[146]. Por ello, el análisis de la cinética de permeación de nuevas formulaciones de filtros químicos solares es de suma importancia, ya que este parámetro está íntimamente relacionado con la eficacia del mismo una vez aplicado y a lo largo del tiempo.

Tradicionalmente, este tipo de estudio se realiza utilizando la celda de difusión de Franz. Esta celda consiste en un compartimiento donador y uno aceptor, que están

¹⁴⁴ BENECH-KIEFFERA F., WEGRICH A., SCHWARZENBACH R., KLECAK G., WEBER T., J. LECLAIRE J., SCHAEFER H., Percutaneous Absorption of Sunscreens in vitro: Interspecies Comparison, Skin Models and Reproducibility Aspects. *Skin Pharmacology Applied Skin Physiology* 2000, 13, 324–335.

¹⁴⁵ WATKINSON A. C., BRAIN K. R., WALTERS K. A., HADGRAFT J., Prediction of the percutaneous penetration of ultraviolet filters used in sunscreen formulations, *International Journal of Cosmetic Science* 1992, 14, 265–275.

¹⁴⁶ TANNER P. R., Sunscreens product formulation, *Dermatologic Clinics* 2006, 24, 1, 53–62.

Capítulo 4. ESTUDIO DE PERMEACIÓN DEL OMC CARGADO EN SISTEMAS DE MEs

separados entre sí por una membrana (Fig. 4.1). El compartimento donador contiene la formulación con el principio activo y el compartimento aceptor contiene un medio receptor que simula, en este caso, las condiciones fisiológicas de la piel ^[147].

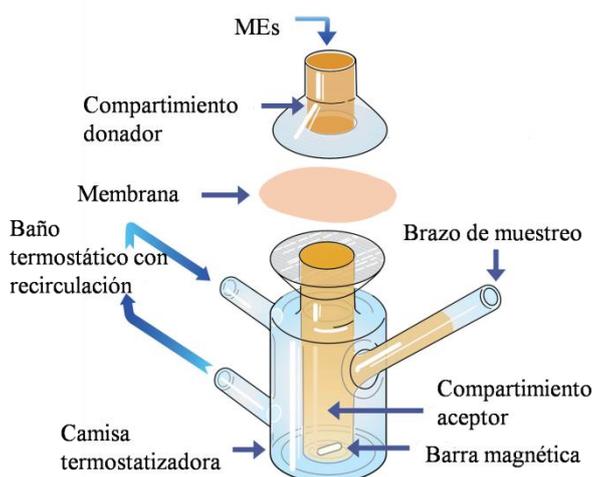


Figura 4.1 Representación esquemática de una celda de difusión de Franz utilizada para realizar estudios de permeación.

Como puede verse, durante un experimento de permeación, la membrana separa físicamente ambos compartimentos y la misma debe comportarse de manera similar al tejido en estudio, en nuestro caso la piel, permitiendo que el componente activo se difunda al medio receptor.

Houng y col. (2009) clasificaron a las membranas utilizadas en estudios de permeación en dos grandes grupos: *naturales* (piel humana y modelos animales: cerdo, conejo, rata, ratón sin pelo, conejillo de indias, entre otros) y *sintéticas* (acetato de celulosa, poliamida, polietileno, nylon, entre otras). Este último grupo es actualmente el más utilizado para estudios de absorción *in vitro* de filtros UV ^[148, 149, 150].

¹⁴⁷ NG S. F., ROUSE J., SANDERSON D., ECCLESTON G., A comparative study of transmembrane diffusion and permeation of ibuprofen across synthetic membranes using Franz diffusion cells, *Pharmaceutics* 2010, 2, 209-223.

¹⁴⁸ HOUNG S. P., BUN H., FOURNERON J. D., REYNIER J.P., ANDRIEU V., Use of various models for *in vitro* percutaneous absorption studies of ultraviolet filters, *Skin Research and Technology* 2009, 15, 253-261.

Los ensayos de permeación utilizando membranas naturales son ideales para realizar los estudios *in vitro*, pero debido a las dificultades para obtenerlas y conservarlas en condiciones óptimas, existen numerosos estudios que avalan el uso de membranas sintéticas que no necesitan de un almacenamiento especial, ni requieren pretratamientos complicados y presentando, además, un costo adecuado.

Los ensayos realizados en celdas de difusión de Franz utilizan una solución receptora, la cual se mantiene en todo momento bajo agitación para garantizar la uniformidad de difusión y la homogeneidad de la solución. Además, la solución receptora se mantiene a una temperatura constante mediante un baño de agua termostatzado ^[151]. De esta manera, el estudio de permeación se completa tomando distintas alícuotas del medio receptor durante determinados intervalos de tiempo a partir del tubo de muestreo de la celda de Franz (Fig. 4.1). Estas muestras son entonces analizadas mediante alguna técnica analítica, en general cromatográfica, ya sea GC (del inglés, *gas chromatography*) ^[152] o HPLC (del inglés, *high performance liquid chromatography*) ^[153]. Finalmente, con los datos obtenidos se calculan las respectivas constantes de permeación, las cuales aportan información valiosa sobre la cinética de difusión de los principios activos de interés luego de atravesar una membrana que representa el tejido de interés.

¹⁴⁹ DEBANDI M. V., FRANÇOIS N. J., DARAIO M. E., Evaluation of different membranes for in vitro release of anticellulitic actives, *Avances en Ciencias e Ingeniería ER* 2011, 2, 97-105.

¹⁵⁰ NG S. F., ROUSE J., SANDERSON D., ECCLESTON G., A comparative study of transmembrane diffusion and permeation of ibuprofen across synthetic membranes using franz diffusion cells, *Pharmaceutics* 2010, 2, 209-223.

¹⁵¹ FRANZ T. J., Percutaneous absorption. On the relevance of in vitro data, *Journal of Investigative Dermatology* 1975, 64, 190-5.

¹⁵² XIA X. R., BAYNES R. E., MONTEIRO-RIVIERE N. A., LEIDY R. B., DAMIAN SHEA D., RIVIERE J. E., A Novel in-vitro technique for studying percutaneous permeation with a membrane-coated fiber and Gas Chromatography/Mass Spectrometry: Part I. Performances of the technique and determination of the permeation rates and partition coefficients of chemical mixtures, *Pharmaceutical Research* 2003, 20, 275-282.

¹⁵³ DE PAULA D., MARTINS C. A., LOPES M. V., BENTLEY B., Development and validation of HPLC method for imiquimod determination in skin penetration studies, *Biomedical Chromatography* 2008, 22, 1416-1423.

Como hemos mencionado, esta metodología es frecuentemente utilizada para realizar este tipo de estudio. Sin embargo, hay aspectos que pueden mejorarse significativamente. Uno de los puntos más relevantes está relacionado con el muestreo, el cual como se describió, se realiza manualmente desde el tubo de muestreo de la celda y a diferentes intervalos de tiempo. De esta manera, cada muestra obtenida a intervalos regulares es analizada tiempo después por una técnica apropiada según la/s especie/s en estudio. Además, en cada muestreo debe reponerse el volumen extraído con la correspondiente solución receptora, lo que se efectúa también de forma manual.

La implementación de un sistema en línea, tanto para la etapa de muestreo como de reposición, es una alternativa que puede mejorar significativamente el procedimiento convencional que suele ser laborioso y, además, aumenta los errores en los resultados. Por otra parte, un sistema en línea puede estar acoplado a un detector, por ejemplo, espectrométrico, lo que permite monitorear el proceso de difusión en tiempo real. De esta manera, se obtiene una mayor frecuencia de muestreo, lo que se traduce en la posibilidad de obtener mayor cantidad de información. Se han propuesto métodos automáticos para realizar estudios de liberación en distintas formulaciones farmacéuticas ^[154]. Klimundová y col. (2006) ^[155] y Alves y col. (2016) ^[156] propusieron un método automático de análisis para la evaluación de la permeación de distintos fármacos mediante la celda de difusión de Franz utilizando cromatografía convencional.

¹⁵⁴ PIMENTA A. M., MONTENEGRO M. C. B. S. M., ARAÚJO A. N., CALATAYUD J. M., Application of sequential injection analysis to pharmaceutical analysis, *Journal of pharmaceutics and Biomedical Analysis* 2006, 40, 1, 16-34.

¹⁵⁵ KLIMUNDOVÁ J., ŠATINSKÝ D., SKLENÁŘOVÁ H., SOLICH P., Automation of simultaneous release tests of two substances by sequential injection chromatography coupled with Franz cell, *Talanta* 2006, 69, 3, 730-735.

¹⁵⁶ ALVES, A. C., RAMOS I. I., NUNES C., MAGALHÃES L. M., SKLENÁŘOVÁ H., SEGUNDO M. A., LIMA J. L. F. C., REIS S., On-line automated evaluation of lipid nanoparticles transdermal permeation using Franz diffusion cell and low-pressure chromatography, *Talanta* 2016, 146, 1, 369-374.

Por otro lado, Solich y col. (2003) ^[157] y Klimundová y col. (2005-2006) ^[158, 159] presentaron un sistema de análisis de inyección secuencial (SIA) para el estudio de permeación de principios activos en formulaciones tópicas utilizando técnicas espectroscópicas de detección (fluorescencia molecular y absorción molecular UV-Vis).

Por otra parte, las metodologías comúnmente empleadas para la determinación de filtros químicos solares en PPCPs involucran técnicas cromatográficas ^[160], ya que las muestras suelen estar compuestas por un gran número de componentes y, por ende, es necesario un procedimiento separativo. Sin embargo, la utilización de este tipo de técnicas dificulta la obtención de información en tiempo real, ya que los tiempos de análisis suelen ser mayores que los intervalos de tiempo de muestreo en la celda. Por ello, una vez más las técnicas espectroscópicas representan una alternativa de interés cuando se desea monitorear un proceso en línea.

En particular, la espectroscopia UV-Vis es una técnica muy empleada para el análisis cualitativo y cuantitativo de una gran variedad de especies tanto inorgánicas como orgánicas. Es bien conocido que la absorción de radiación electromagnética en la región entre 180 y 780 nm por parte de compuestos orgánicos es el resultado de las interacciones entre los fotones y los electrones que participan directamente en la formación de enlaces, es decir, electrones compartidos (electrones σ o π) y electrones no compartidos, no enlazantes, que están localizados alrededor de átomos como el oxígeno,

¹⁵⁷ SOLICH P., SKLENÁŘOVÁ H., HUCLOVÁ J., ŠATINSKÝ D., SCHAEFER U. F., Fully automated drug liberation apparatus for semisolid preparations based on sequential injection analysis, *Analytica Chimica Acta* 2003, 499, 1, 9-16.

¹⁵⁸ KLIMUNDOVÁ J., SKLENÁŘOVÁ H., SCHAEFER U. F., SOLICH P., Automated systems for release studies of salicylic acid based on a SIA method, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2005, 37, 5, 893-898.

¹⁵⁹ KLIMUNDOVÁ J., MERVARTOVÁ K., SKLENÁŘOVÁ H., SOLICH P., POLÁŠEK M., Automated sequential injection fluorimetric set-up for multiple release testing of topical formulation, *Analytica Chimica Acta* 2006, 573, 366-370.

¹⁶⁰ Alberto CHISVERT A., PASCUAL-MARTÍ M. C., SALVADOR A., Determination of UV-filters in sunscreens by HPLC, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 2001, 369, 638-641.

azufre, nitrógeno y halógenos (electrones n). La cuantificación de especies absorbentes se realiza aplicando la ley de Beer, la cual como es sabido, relaciona linealmente la concentración de un analito con la correspondiente señal de absorbancia. Sin embargo, esta ley presenta ciertas limitaciones tanto propias, como relacionadas con la forma en la que se realizan las medidas de absorbancia o bien con cambios químicos, éstas últimas conocidas como desviaciones instrumentales y desviaciones químicas, respectivamente ^[161]. Además, debido a la gran cantidad de especies absorbentes, esta técnica es de difícil aplicación en el análisis de muestras complejas, sobre todo cuando se desea realizar medidas directas, sin pasos previos de derivatización y/o separación.

En este sentido, y tal como fue descrito en el capítulo anterior, la espectroscopia de fluorescencia molecular (EF), es una técnica espectroscópica de amplio uso, resulta ser en muchos casos más selectiva y sensible que la espectrometría UV-Vis. Además, esta técnica presenta una variante que puede mejorar la resolución de los espectros de fluorescencia, denominada espectroscopia de fluorescencia sincrónica (EFS).

La EFS se ha aplicado con éxito en la determinación de especies presentes en sistemas de multicomponentes, y se basa en el barrido simultáneo de las longitudes de onda de excitación (λ_{exc}) y emisión (λ_{emi}) manteniendo una diferencia constante entre ambas longitudes de onda ($\Delta\lambda$). De esta manera, en muchos casos es posible reducir el solapamiento de los espectros de fluorescencia, mejorando por ende la resolución ^[162].

¹⁶¹ SKOOG D. A., HOLLER F. J., NIEMAN T. A., Principios de análisis instrumental, 5ta edición, Ed. McGraw-Hill/Interamericana de España, S.A.U, Madrid, 2001.

¹⁶² RUBIO S., GOMEZ-HENS A., VALCARCEL M., Analytical applications of synchronous fluorescence spectroscopy, *Talanta* 1986, 33, 633-640.

Las principales ventajas de la EFS son la formación de bandas más finas y definidas, produciendo mayor selectividad gracias al estrechamiento de las bandas espectrales y la simplificación del espectro (Fig. 4.2).

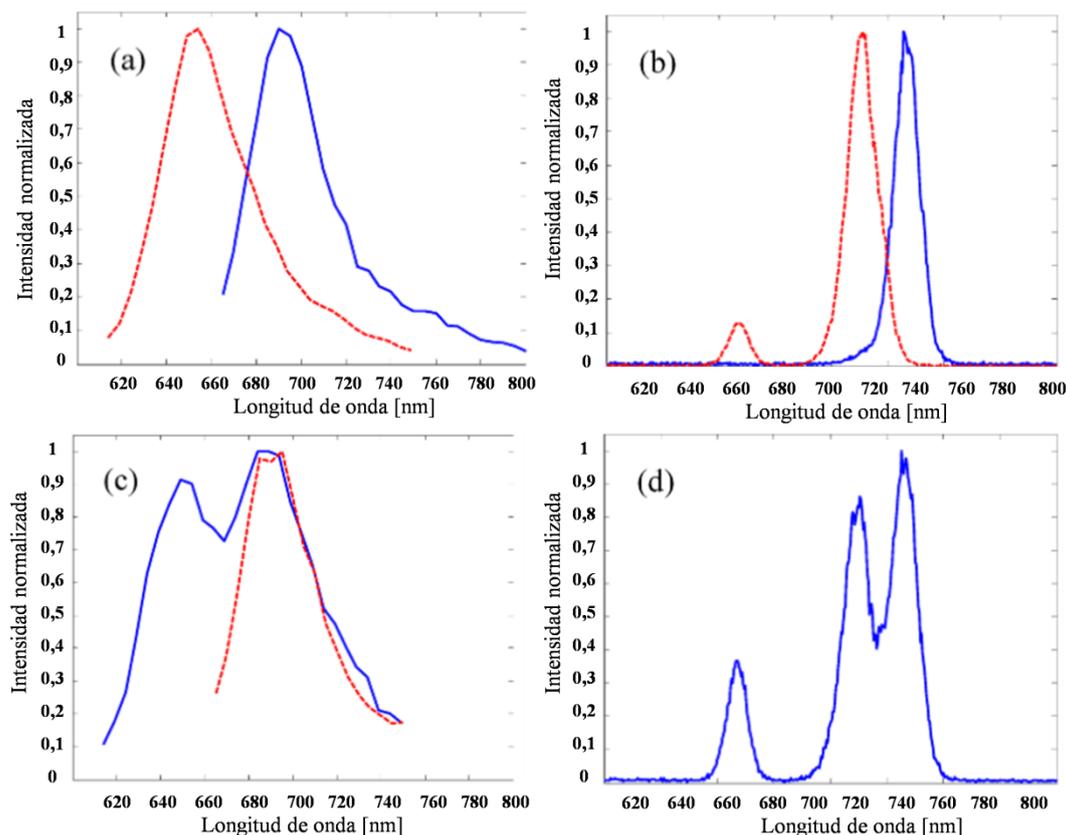


Figura 4.2 Espectros de fluorescencia EF y EFS de los estándares de azul de metileno, oxazina 170 y de la mezcla de los mismos. (a) espectros de emisión de EF de azul de metileno (línea azul continua) y oxazina 170 (línea roja punteada); (b) espectros de EFS de azul de metileno (línea azul continua) y oxazina 170 (línea roja punteada); (c) espectros de EF de la mezcla de azul de metileno (línea azul continua, $\lambda_{exc}=614$ nm) y oxazina 170 (línea roja punteada, $\lambda_{exc}=655$ nm) y (d) espectros de EFS de la mezcla de azul de metileno y oxazina 170 ($\Delta\lambda=20$ nm). Adaptado de ^[163].

Dependiendo del tipo de barrido hay tres variantes de EFS ^[164]:

✚ Si la velocidad de barrido es constante para ambos monocromadores, se mantiene constante la diferencia entre excitación y emisión $\Delta\lambda$. En este caso, la técnica

¹⁶³ ZHANG X., FALES A., VO-DINH T., Time-Resolved Synchronous Fluorescence for Biomedical Diagnosis, *Sensors* 2015, 15, 21746-21759.

¹⁶⁴ PATRA D., MISHRA A., Recent developments in multi-component synchronous fluorescence scan analysis, *Trends in Analytical Chemistry* 2002, 21, 787 – 798.

es conocida como EFS de longitud de onda constante. Esta técnica es muy simple y es la más utilizada dentro de la EFS.

✚ La longitud de onda de excitación y de emisión varían simultáneamente, manteniendo constante una diferencia de frecuencia ($\Delta\nu$). Esta variante se la conoce como EFS a energía constante.

✚ La longitud de onda de emisión y excitación varían simultáneamente pero a diferentes velocidades. Esto permite la construcción de planos a 45° y 90° que permiten explorar intensidades de fluorescencia máximas y mínimas, evitando bandas espectrales debidas a la dispersión de la radiación, lo que se traduce en una mayor selectividad. Esta técnica se conoce como EFS de ángulo variable.

Desde el punto de vista práctico, el análisis de muestras complejas sin ningún paso de pretratamiento es extremadamente útil. Como vimos, la EFS puede ser una alternativa importante para el análisis de este tipo de muestras debido a su alta sensibilidad y mayor selectividad con respecto a la fluorescencia tradicional.

Sin embargo, cuando la resolución no es completa o bien existe algún tipo de interferencia, la combinación de EFS con herramientas quimiométricas puede resultar atractiva, ya que las propiedades inherentes a cada técnica permiten, en muchos casos, generar óptimos modelos de calibración, capaces de determinar de manera simultánea de dos o más compuestos, aún en presencia de interferentes ^[165]. Una herramienta quimiométrica de amplio uso para la generación de modelos de calibración utilizando datos de primer orden es la regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS), la cual es una técnica que combina las características del análisis de componentes principales (PCA) y la regresión lineal múltiple (MLR). Este algoritmo utiliza la información

¹⁶⁵ INSAUSTI M., ROMANO C., PISTONESI M. F., BAND B. S. F., Simultaneous determination of quality parameters in biodiesel/diesel blends using synchronous fluorescence and multivariate analysis, *Microchemical Journal* 2013, 108, 32-37.

contenida en la matriz de datos y la información contenida en la matriz de la propiedad a determinar (matriz **Y**, por ejemplo, concentración), para obtener variables auxiliares, denominadas variables latentes, factores o componentes. Antes de realizar la descomposición en factores, las matrices **X** e **Y** se centran o autoescalan, como en el caso del PCA. De esta manera, es posible eliminar cierta información redundante o reducir la contribución del ruido.

Entonces, cada una de las matrices se descompone simultáneamente en una suma de a factores de forma que:

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E} = \sum_{i=1}^a \mathbf{t}_i \mathbf{p}_i^T + \mathbf{E} \quad \text{Ecuación 4.1}$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{UQ}^T + \mathbf{F} = \sum_{i=1}^a \mathbf{u}_i \mathbf{q}_i^T + \mathbf{F} \quad \text{Ecuación 4.2}$$

donde **T** es la matriz de *scores*, **P** la matriz de *loadings* y **E** la matriz de residuos para la matriz de datos (**X**); **U** es la matriz de *scores*, **Q** la matriz de *loadings* y **F** la matriz de residuos para la matriz de la propiedad a determinar (**Y**).

De esta manera, las matrices presentan la siguiente dimensionalidad: **TU** ($m \times a$), **PT** ($a \times k$) y **QT** ($a \times p$). Donde tenemos m muestras, a factores, k variables y p analitos.

La descomposición de ambas matrices no es independiente, sino que se realiza de forma simultánea, estableciendo una relación interna entre los *scores* de los bloques **X** e **Y**, de manera que para cada componente a , se cumpla que:

$$\hat{\mathbf{u}}_a = \mathbf{b}_a \mathbf{t}_a \quad \text{Ecuación 4.3}$$

donde el símbolo $\hat{}$ indica que es un valor calculado y \mathbf{b}_a es el coeficiente de regresión para cada uno de los componentes. A partir de esta relación se calcula el valor de **Y**.

$$\mathbf{Y} = \mathbf{TBQ}^T + \mathbf{F} \quad \text{Ecuación 4.4}$$

donde \mathbf{B} es la matriz de los coeficientes de regresión \mathbf{b}_a , de dimensiones $(a \times a)$, y \mathbf{F} la matriz de los residuales de \mathbf{Y} .

Una vez establecido el modelo de calibración se puede realizar la predicción de la propiedad modelada en un nuevo conjunto de muestras según la siguiente expresión:

$$\mathbf{y}_i^T = \mathbf{b}_o^T \mathbf{x}_i^T \mathbf{B} \quad \text{Ecuación 4.5}$$

De esta manera, \mathbf{x}_i es el vector que define la señal analítica de la muestra, \mathbf{y}_i es el vector de concentraciones o propiedades a determinar, y \mathbf{b}_o^T un vector que permite realizar la predicción de una muestra sin necesidad de descomponerla en matrices de *scores* y *loadings* ^[166].

A continuación, el paso para elegir el mejor número de variables latentes utilizadas en cada modelo se puede realizar mediante un proceso de validación cruzada (en inglés, *full cross validation*) ^[167]. La evaluación de los modelos PLS obtenidos se puede realizar calculando el error cuadrático medio de predicción (RMSEP) y el coeficiente de determinación (R^2).

$$\text{RMSEP} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n_{\text{prev}}} (y_{i,\text{prev}} - \hat{y}_{i,\text{prev}})^2}{n_{\text{prev}}}} \quad \text{Ecuación 4.6}$$

donde n_{prev} es el número de muestras del conjunto de predicción, e $y_{i,\text{prev}}$ es el valor del parámetro de interés de la i -ésima muestra del conjunto de predicción, e $\hat{y}_{i,\text{prev}}$ es el valor del parámetro estimado por el modelo.

Además, para evaluar la calidad analítica de cada modelo se calcula, para cada analito, el error relativo de predicción (REP) y la sensibilidad (SEN).

¹⁶⁶ WOLD S., SJÖSTRÖM M., ERIKSSON L., PLS-regression: a basic tool of chemometrics, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 2001, 58, 109-130.

¹⁶⁷ AGUILERA A. M., ESCABIAS M., PEDA C., SAPORTA G., Using basis expansions for estimating functional PLS regression: Applications with chemometric data, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 2010, 104, 289-305.

$$REP = \frac{100}{c_{med}} \left[\frac{\sum_{n=1}^n (c_{nom} - c_{pred})^2}{n} \right]^{1/2} \quad \text{Ecuación 4.7}$$

donde c_{nom} es la concentración nominal, c_{pred} la concentración predicha por el modelo y c_{med} es la concentración media.

$$SEN_k = \frac{1}{\|b_k\|} \quad \text{Ecuación 4.8}$$

donde $\| \cdot \|$ indica la norma Euclidiana y b_k es el vector de coeficientes de regresión apropiado para el componente k ^[168].

En esta parte de la tesis se propone un sistema automático basado en el uso de la celda de difusión de Franz para evaluar la cinética de permeación del OMC cargado en las diferentes MEs propuestas utilizando como modelo de piel una membrana sintética de poliamida. El monitoreo del proceso de permeación en tiempo real se llevará a cabo en línea mediante espectroscopía de fluorescencia sincrónica. Los datos de primer orden obtenidos serán analizados por mínimos cuadrados parciales. De esta manera, se obtendrán los correspondientes perfiles cinéticos de concentración y, con ello, las correspondientes constantes de permeabilidad para el OMC en las formulaciones propuestas.

4.3 Parte Experimental

4.3.1 Materiales

Todos los reactivos empleados fueron de calidad analítica y las soluciones se prepararon usando agua ultra pura (18MΩ cm).

-  Decaetilenglicol mono-dodecil éter (Sigma)
-  Etanol absoluto (Dorwil)

¹⁶⁸ MILLER J.C., MILLER J. N., *Estadística y quimiometría para química analítica*, 4ta edición, Pearson Education, Madrid, 2002.

- ✚ Ácido oleico (Applichem)
- ✚ Octil-p-metoxicinamato (Sigma)
- ✚ Aceite esencial de albahaca (Euma)
- ✚ Metanol (grado HPLC, Sigma)

Las formulaciones analizadas fueron MEI-OMC y MEII-OMC, conteniendo un 5,0 y 1,5 % (p/p) del filtro químico solar OMC, respectivamente. Todas las formulaciones fueron obtenidas tal como se describió en el Capítulo II, sección 2.4.3.

Una muestra comercial denominada Emulsión Hidratante de Día, de una marca líder del mercado, que contiene OMC en su composición, fue adquirida en una farmacia de la ciudad de Bahía Blanca. La preparación de la muestra para su posterior análisis fue realizada, disolviendo 0,5000g de la misma en 50 mL de etanol. A continuación, la muestra se filtró a través de un papel de filtro cuantitativo (Whatman®). Se tomó 1 mL del filtrado y se diluyó el mismo nuevamente con etanol hasta un volumen de 50 mL.

La solución receptora (SR) utilizada fue una mezcla de agua y etanol absoluto en proporción 1:1 (v/v). Las soluciones estándar de OMC y AEA se prepararon disolviendo 0,060 g de OMC y 0,060 g de AEA en 10,00 mL de SR, respectivamente. Las soluciones de trabajo se prepararon mediante la dilución apropiada de la solución estándar con SR. Se utilizó una membrana de poliamida (PA) marca Whatman® con un tamaño de poro de 0,45 μm .

4.3.2 Métodos

4.3.2.1 Sistema automático en línea para el estudio de permeación

El estudio de permeabilidad del OMC en las formulaciones propuestas (MEI-OMC y MEII-OMC) se realizó utilizando un sistema automático de flujo continuo acoplado a una celda de difusión de Franz tradicional y con detección en línea (Fig. 4.3). La celda de difusión de Franz utilizada fue construida en el Taller de Vitroplastia, Departamento de Química, Universidad Nacional del Sur, y presentó un área de difusión de 3,14 cm². La membrana sintética de PA se colocó entre los compartimentos donador y aceptor. La misma fue sumergida en la SR durante 24 h previo a cada experimento.

Entonces, el compartimento aceptor se llenó completamente con 25 mL de SR. Esta solución se agitó durante el experimento por medio de un agitador magnético (Hanna Instruments, HL190M) a 300 rpm.

La celda de difusión de Franz fue termostatzada con un baño de agua (Cole Parmer® BT-15) para asegurar una temperatura de $(32,0 \pm 0,5)$ °C en la superficie de la membrana de PA. Además, la celda fue cubierta con papel de aluminio para evitar la fotodegradación del OMC.

Una masa de 0,1000g de muestra fue colocada en el compartimento donador en contacto con la membrana de PA. En ese momento comenzó el muestreo, a través del tubo muestreador, el cual se llevó a cabo aspirando un volumen de 100 µL de SR mediante una bomba peristáltica (Gilson®, Minipuls 3). La misma operó a 13 rpm y utilizó un tubo de Tygon® de 0,50 mm d.i., generando un caudal en la línea de 0,25 mL min⁻¹. El muestreo se realizó a intervalos de 5 min y el tiempo total de análisis fue de 90 min. Entonces, las muestras fueron dirigidas hacia el detector correspondiente, UV-Vis y fluorescencia molecular en caso de la formulación MEI-OMC y fluorescencia

Capítulo 4. ESTUDIO DE PERMEACIÓN DEL OMC CARGADO EN SISTEMAS DE MEs

sincrónica en el caso de MEII-OMC. Es importante destacar que la celda de difusión de Franz debe mantener el volumen total constante durante el proceso, por lo que el sistema contó con una línea de flujo por la cual se recuperó con SR el mismo volumen utilizado en cada punto del muestreo (100 μL).

La automatización del procedimiento se realizó mediante electrónica Arduino®. El programa controló la bomba peristáltica, el agitador magnético y la adquisición de los espectros en cada caso.

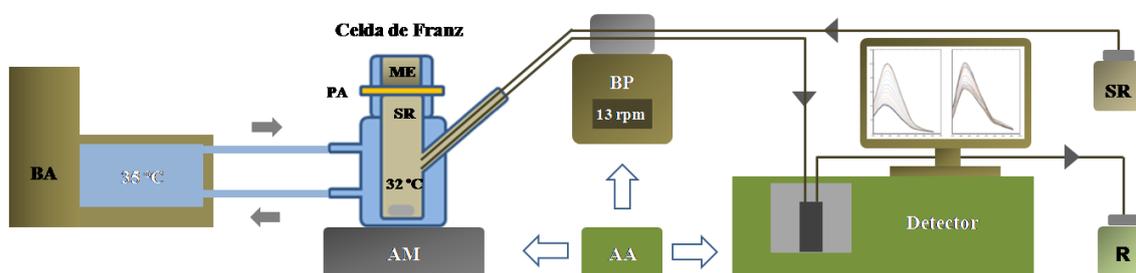


Figura 4.3 Sistema de flujo continuo para el estudio de permeabilidad in vitro del OMC con detección en línea. AA: accionador Arduino®; SR: solución receptora; ME: microemulsión; AM: agitador magnético; PA: membrana de poliamida; BP: bomba peristáltica; R: residuos; BA: baño de agua. El flujo fue de 0,25 mL min^{-1} y en cada muestreo se tomaron 100 μL de muestra los cuales se recuperaron con SR.

4.3.2.2 Adquisición y tratamiento de datos

Parte A. Formulación MEI-OMC

IA. Detección y cuantificación de OMC mediante espectroscopía UV-Vis

Las formulaciones MEI-OMC fueron analizadas mediante espectrofotometría UV-Vis. Las medidas de absorción molecular fueron realizadas en un espectrofotómetro UV-Vis Agilent®, modelo 8453. El espectrómetro estuvo equipado con una celda de flujo de cuarzo (Hellma®, 178-712-QS) con un volumen interno de 18 μL y paso óptico de 1 cm. Los espectros se registraron en el rango de 190 e 1100 nm, con resolución de 1 nm.

La cuantificación de OMC se realizó mediante regresión lineal univariada, para lo cual se utilizaron las señales analíticas registradas a 340 nm. Para ello, se preparó una serie de testigos en un medio de SR, en concentraciones entre 6 y 60 mg L⁻¹ de OMC.

IIA. Detección y cuantificación de OMC mediante espectrometría de fluorescencia molecular

Las formulaciones MEI-OMC también fueron analizadas mediante espectroscopía de fluorescencia molecular. Las medidas fueron realizadas en un espectrofluorímetro JASCO®, modelo FP6500, equipado con una lámpara de descarga de xenón (150 W) y una celda de flujo de cuarzo (Hellma® 176-752-QS) de 150 µL.

Los espectros de fluorescencia se obtuvieron excitando a 366 nm y registrando la emisión entre 380 y 600 nm. El ancho de ranura tanto para el monocromador de excitación como para el de emisión fue de 5 nm. La velocidad de barrido fue de 2000 nm min⁻¹ y el voltaje del tubo fotomultiplicador (PMT) fue de 500 V. El intervalo de adquisición y el tiempo de integración se fijaron en 0,1 nm y 1,0 s, respectivamente.

La cuantificación de OMC se realizó mediante regresión lineal univariada, para lo cual se utilizaron las señales analíticas registradas a 390 nm. Para ello, se preparó una serie de testigos en un medio de SR, en concentraciones entre 6 y 36 mg L⁻¹ de OMC.

Parte B. Formulación MEII-OMC

IB. Detección de OMC mediante espectrometría de fluorescencia molecular sincrónica

En el caso de las formulaciones MEII-OMC se utilizó EFS con el fin de mejorar la resolución de las bandas de fluorescencia obtenidas de manera convencional en este tipo de muestras. Los espectros se registraron en el rango de 370-690 nm, manteniendo un $\Delta\lambda$ fijo (diferencia entre la excitación y la longitud de onda de emisión) de 60 nm. Se obtuvo una señal cada 0,5 nm, con lo cual cada espectro presentó 641 variables. La

Capítulo 4. ESTUDIO DE PERMEACIÓN DEL OMC CARGADO EN SISTEMAS DE MEs

velocidad de barrido fue de 2000 nm min⁻¹ y el PMT operó a 550 V. El intervalo de adquisición y el tiempo de integración se fijaron en 0,5 nm y 0,5 s, respectivamente.

IIB. Cuantificación de OMC mediante PLS

En el caso de la cuantificación de OMC en la formulación MEII-OMC, fue necesaria la aplicación de PLS, ya que el AEA (fase oleosa) presentó fluorescencia en la región estudiada y esto generó interferencias en la señal del OMC. Por ello, para la etapa de calibración se planteó la utilización de un diseño experimental factorial completo 3² (n^k ; donde n son niveles y k los factores estudiados). De esta manera, diferentes mezclas con concentraciones de OMC entre 6 - 60 mg L⁻¹ y de AEA entre 24 - 240 mg L⁻¹ fueron preparadas en SR, según se muestra en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1 Diseño factorial completo 3² empleado para la cuantificación de OMC en la formulación MEII-OMC.

N° de Experimentos	OMC (mg L ⁻¹)	AEA (mg L ⁻¹)
1	6	24
2	6	120
3	6	240
4	30	24
5	30	120
6	30	240
7	60	24
8	60	120
9	60	240

Los datos obtenidos mediante EFS fueron suavizados mediante el algoritmo de Savitzky-Golay, con un polinomio de segundo orden y una ventana de 7 puntos ^[169]. Posteriormente, se aplicó el algoritmo PLS, usando el paquete de rutinas PLS_toolbox ^[170] la cual se ejecutó mediante el programa MatLab®, versión 2010.a.

¹⁶⁹ SAVITZKY A. GOLAY M.J.E., Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures, *Analytical Chemistry* 1964, 36, 1627-1639.

¹⁷⁰ PLS_Toolbox. Eigenvector Research, Inc., Manson, WA USA 98831; Disponible en: www.eigenvector.com

4.3.2.3 Validación de la metodología propuesta

4.3.2.3.1 Análisis mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas.

El estudio de validación de la metodología propuesta para las muestras MEI-OMC y MEII-OMC se realizó mediante la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS, del inglés *gas chromatography mass spectrometry*). Las medidas se realizaron en un cromatógrafo de gases con columna capilar (Agilent® 7890B) acoplado a un espectrómetro de masas (Agilent® 5977A). La columna cromatográfica utilizada fue de sílice fundida (HP-5MS, 30 m; 0,25 mm d.i.; 0,25 µm de espesor de capa).

Un microlitro de la muestra se inyectó en modo splitless a 230 °C. Se utilizó helio como gas portador a un caudal constante de 1,0 mL min⁻¹. El programa de temperatura fue de 100 °C durante 2 min, luego 3 °C min⁻¹ hasta 280 °C, donde se mantuvo constante durante 5 min y el tiempo de retención para el OMC fue de 17,4 min. El espectrómetro de masas fue operado en modo EIM (del inglés, *electron impact mode*, 70 eV). Los fragmentos del analito fueron monitoreados en modo SIM (del inglés, *selected ion monitoring mode*). Los iones (m/z) utilizados en el análisis del compuesto de interés fueron 290, 178 y 161. La calibración del método se realizó mediante la preparación de una serie de soluciones estándares de OMC de concentraciones comprendidas entre 6 - 48 mg L⁻¹. Cada punto de la recta de calibración se realizó por triplicado.

4.3.2.3.2 Análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución

Para el estudio de validación de la muestra comercial se empleó un cromatógrafo HPLC marca Thermo Fisher Scientific® con detector UV/VIS, modelo Ultimate 3000-

MSQ PLUS. La separación se realizó en una columna C18 (ACCLAIM 120, 2.1 mm x 150 mm de diámetro, tamaño de partícula de 3 μm).

El volumen de muestra inyectado fue de 20 μL y a la velocidad de flujo fue de 0,2 mL min^{-1} . La determinación se realizó en modo isocrático, utilizando una mezcla 85:15 (v/v) de metanol y agua como fase móvil. La columna se termostató a 25 $^{\circ}\text{C}$ y las señales registraron a 311 nm.

El tiempo de retención para OMC fue de 16 min.

La calibración del método se realizó mediante la preparación de una serie de soluciones estándares de OMC de concentraciones comprendidas entre 6 - 60 mg L^{-1} preparadas en una mezcla 1:1 (v/v) de agua y etanol absoluto. Cada punto de la recta de calibración se realizó por triplicado.

4.4 Resultados y Discusión

4.4.1. Sistema automático en línea

Un punto a tener en cuenta es que la celda de difusión de Franz fue fácilmente acoplada al sistema de flujo, sin necesidad de ninguna modificación en su diseño (Fig. 4.3). Una vez montado el sistema, se optimizaron las variables hidrodinámicas inherentes al mismo. El caudal correspondiente a la toma de muestra (100 μL), la cual se realizó cada 5 min, se estudió entre 0,10 y 0,40 mL min^{-1} , determinándose como valor óptimo 0,25 mL min^{-1} . Caudales menores a éste disminuyeron la velocidad de muestreo mientras que caudales mayores generaron sobrepresión en el sistema a lo largo del tiempo, debido a que la viscosidad de las formulaciones es significativamente mayor a la del agua. Asimismo, el mismo caudal (0,25 mL min^{-1}) fue establecido para la línea correspondiente al paso de reposición con SR.

El sistema automático propuesto ofrece una serie de ventajas como el uso de técnicas de detección accesibles y rápidas (espectrometría UV-Vis y espectrometría de fluorescencia molecular) que permitieron el monitoreo en tiempo real. A su vez, el sistema presentó control de temperatura, el cual es necesario para emular las condiciones fisiológicas del tejido en estudio, y la disminución en la intervención humana, lo cual disminuye los errores y el tiempo de análisis.

4.4.2 Cuantificación de OMC cargado en las formulaciones

Parte A. Formulación MEI-OMC

IA.1 Cuantificación de OMC mediante espectroscopía UV-Vis

En la Fig. 4.4 se muestran los espectros de absorción molecular UV-Vis de los componentes puros de la formulación MEI-OMC, es decir, la fase oleosa (AO) y el filtro químico de interés (OMC). Como puede observarse, hay una fuerte absorción alrededor de 280 nm para AO y a 340 nm para OMC. Sin embargo, a longitudes de onda en torno a 340 nm, AO prácticamente no absorbe radiación, no habiendo superposición espectral entre ambas especies.

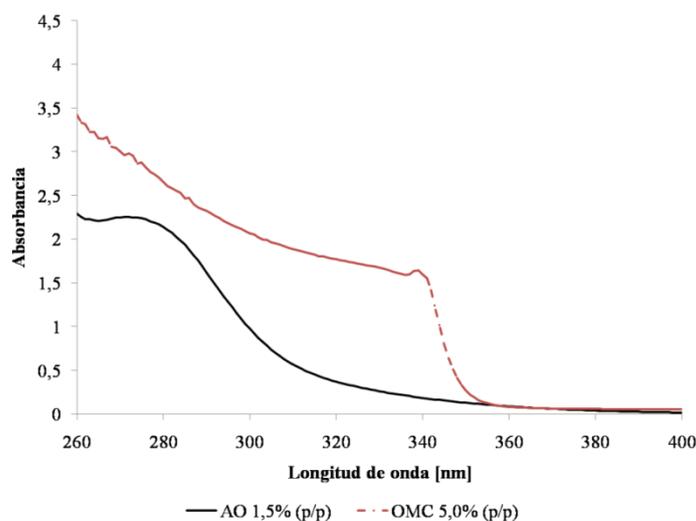


Figura 4.4 Espectros de absorción molecular UV-Vis de los componentes puros de la formulación MEI-OMC

De esta manera, se procedió a la cuantificación de OMC mediante calibración lineal univariada, registrando las señales de los testigos a 340 nm. La Fig. 4.5 (a) muestra el espectro de absorción molecular correspondiente a una solución testigo de OMC (30 mg L^{-1}).

La ecuación de la recta de calibración obtenida fue $A = (0,096 \pm 0,001) [\text{OMC} (\text{mg L}^{-1})] + (0,085 \pm 0,003)$ (Fig. 4.6 (b)). Se corroboró un rango lineal entre $6,0 - 60,0 \text{ mg L}^{-1}$ y el R^2 obtenido fue de 0,993. El LOD y el LOQ fueron de $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ y $0,14 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente. Los mismos fueron estimados a partir de la desviación estándar de una serie de medidas del blanco multiplicado por un factor de 3,3 y 10, respectivamente ^[171].

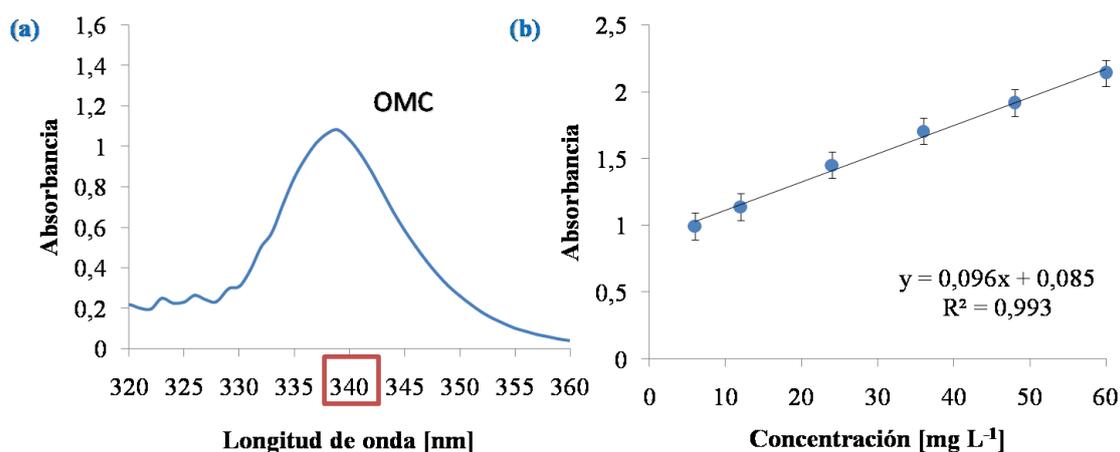


Figura 4.5 Espectro de la solución estándar de OMC: (a) máxima absorción del OMC en 340 nm mediante espectrometría UV-Vis y (b) recta de calibración del OMC en un rango de concentración entre $6,0 - 60,0 \text{ mg L}^{-1}$. Cada medida se realizó por triplicado.

IIA.2 Cuantificación de OMC mediante espectroscopía de fluorescencia molecular

En la Fig. 4.6 (a) se presenta el espectro de fluorescencia correspondiente a una solución estándar de OMC (30 mg L^{-1}), en el cual puede observarse el máximo característico a 390 nm. En este caso, cabe destacar que el AO no presenta fluorescencia

¹⁷¹ MILLER J. C., MILLER J. N., Estadística para química analítica, 2da edición. Ed. Addison-Wesley Iberoamericana, S.A., E.U.A, Wilmington, 1993, Capítulo 5.

a la longitud de onda de trabajo, con lo cual se pudo proceder a la cuantificación de OMC mediante regresión lineal univariada.

Para la serie de testigos analizados, la ecuación de la recta de calibración obtenida fue $I = (2,728 \pm 0,019) [\text{OMC mg L}^{-1}] + (226,4 \pm 0,020)$, (Fig. 4.7 (b)). El coeficiente de determinación (R^2) obtenido fue de 0,995 y el rango lineal del método fue 6,0 - 36,0 mg L^{-1} . Los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) fueron 0,08 mg L^{-1} y 0,24 mg L^{-1} , respectivamente.

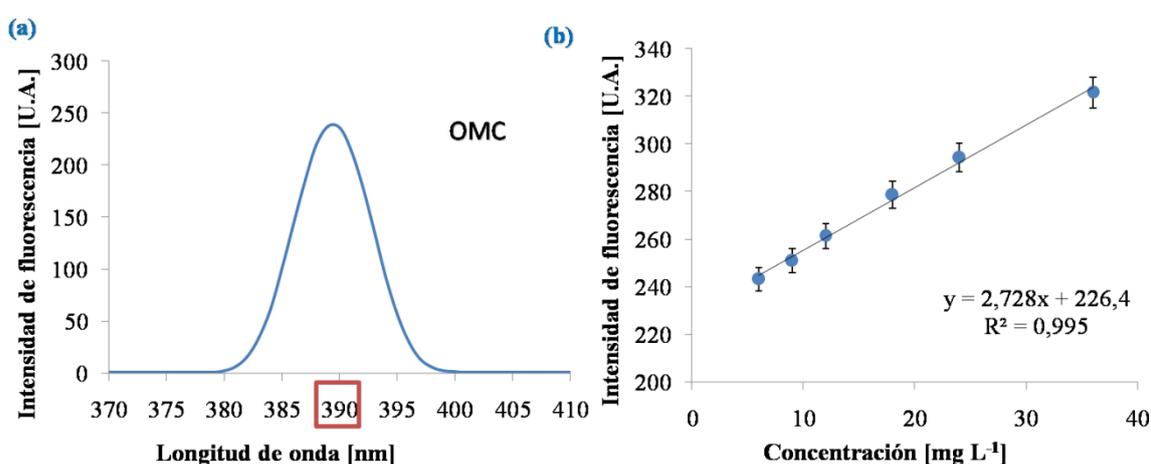


Figura 4.6 Espectro de fluorescencia molecular de una solución testigo de OMC (30 mg L^{-1}) cuya máxima intensidad de fluorescencia se registró a 390 nm. **(b)** recta de calibración del OMC en un rango de concentración entre 6,0 – 36,0 mg L^{-1} . Cada medida se realizó por triplicado.

Parte B. Formulación MEII-OMC

IIB.1 Evaluación de la espectrometría UV-Vis como técnica de detección

La Fig. 4.7 muestra los espectros de absorción molecular UV-Vis correspondientes a los componentes puros de la formulación MEII-OMC, esto es AEA (fase oleosa) y OMC. Como puede verse, existe un importante solapamiento espectral entre ambas especies a lo largo de la región analizada. Por ello, no fue posible cuantificar OMC por esta técnica debido a la fuerte interferencia que presentó AEA en torno a los 340 nm.

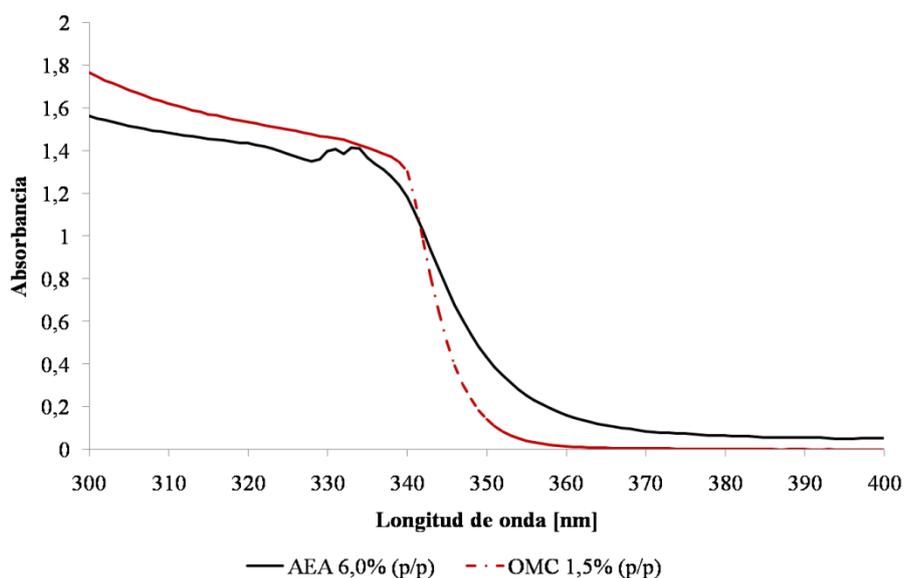


Figura 4.7 Espectros de absorción UV-Vis de los componentes puros de la formulación MEII-OMC.

Para modelar la interferencia del AEA en la señal del OMC, sin la aplicación de una técnica previa de separación, se optó por la utilización de la espectrometría de fluorescencia molecular sincrónica combinada con un método de calibración multivariada, particularmente PLS.

IIB.2 Cuantificación de OMC mediante espectrometría de fluorescencia sincrónica

En la Fig. 4.8 pueden observarse los espectros de EFS obtenidos para una mezcla de calibración (experimento número 9, Tabla 4.1) a lo largo del tiempo de permeación (90 min). Cabe aclarar que, aunque el estudio se realizó durante 90 min, se muestran los espectros registrados hasta los 60 min ya que luego de este tiempo las señales se mantuvieron constantes. Los incrementos en la señal de fluorescencia en las regiones entre 370-420 nm y 570 y 650 nm corresponden a OMC y AEA, respectivamente. Se pudo corroborar que la intensidad de fluorescencia del OMC sufre una disminución en presencia del AEA, comparada con la señal correspondiente en

Capítulo 4. ESTUDIO DE PERMEACIÓN DEL OMC CARGADO EN SISTEMAS DE MEs

ausencia de este último. Por lo tanto, esta interferencia hizo necesaria la aplicación de PLS para poder calcular las concentraciones de OMC durante el proceso de permeación.

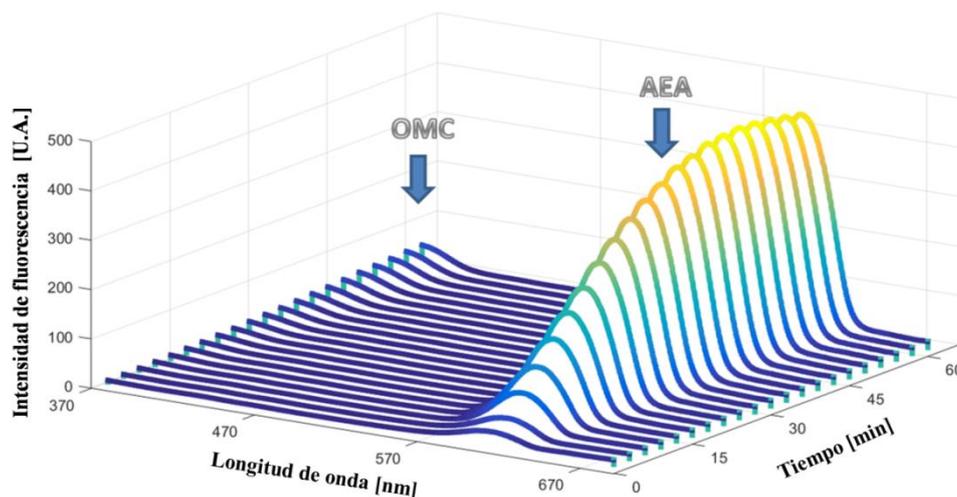


Figura 4.8 Espectros de fluorescencia molecular sincrónica registrados en función del tiempo de permeación para una mezcla de calibración conteniendo 60 mg L^{-1} de OMC y 240 mg L^{-1} de AEA (experimento número 9, Tabla 4.1)

Entonces, la calibración se llevó a cabo mediante PLS aplicando la técnica de validación cruzada. El número óptimo de variables latentes para cada especie se determinó utilizando el criterio de Haaland y Thomas ^[172].

La Fig. 4.9 presenta el gráfico de *loading* de la primera variable latente obtenida mediante PLS. En la misma se pueden corroborar las bandas correspondientes a OMC y AEA y la interferencia resultante en la muestra conteniendo ambos componentes.

¹⁷² HAALAND D.M., THOMAS E.V. Partial least-squares methods for spectral analyses. 1. Relation to other quantitative calibration methods and the extraction of qualitative information, *Analytical Chemistry* 1988, 60, 1193–1202.

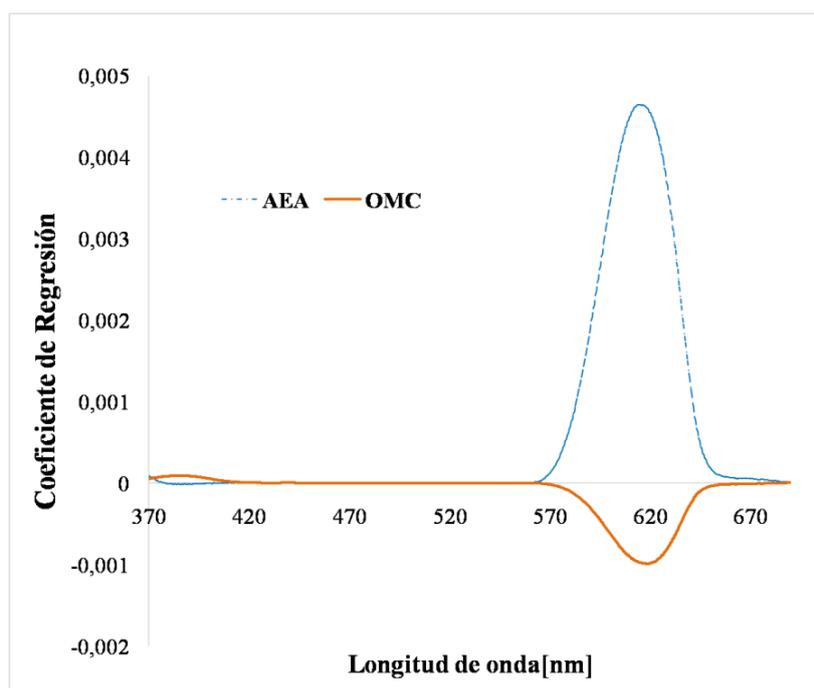


Figura 4.9 Gráfico de *loading* de la primera variable latente obtenida mediante PLS.

La calibración de AEA requirió dos variables latentes para explicar el 98,4% de la varianza. Sin embargo, en la calibración del OMC fueron necesarias tres variables latentes para explicar el 97,5% de la varianza. En este caso, el uso de más variables se debió probablemente a que la señal del AEA es significativamente de mayor intensidad que la del OMC, por lo que al modelo le fue más difícil explicar el comportamiento de este último.

En la Tabla 4.2 se detallan los parámetros analíticos correspondientes a los modelos de calibración para OMC y AEA. Para la interpretación de los resultados se calcularon para cada componente, el valor de RMSEP, el cual es un estimador del error absoluto de predicción, y el error relativo de predicción, REP. Como puede observarse, todos los valores de RMSEP, REP y R^2 fueron satisfactorios para los dos componentes estudiados. A su vez, la tabla proporciona valores óptimos de SEN, LOD y LOQ.

Capítulo 4. ESTUDIO DE PERMEACIÓN DEL OMC CARGADO EN SISTEMAS DE MEs

Tabla 4.2 Parámetros analíticos correspondientes a los modelos PLS obtenidos para la cuantificación de OMC y AEA.

	OMC	AEA
Rango espectral (nm)	370-650	
Concentración (mg L ⁻¹)	6-60	24-240
Variables latentes	3	2
RMSEP (mg L ⁻¹)	3,52	17,9
REP (%)	6,51	8,30
R ²	0,975	0,959
LOD (mg L ⁻¹)	1,31	2,79
LOQ (mg L ⁻¹)	3,97	8,48
SEN (L mg ⁻¹)	1,98	4,12

4.4.3 Validación de las metodologías propuestas mediante GC-MS

La Fig. 4.10 (a) muestra el cromatograma correspondiente a una solución testigo de OMC (30 mg L⁻¹). El tiempo de retención para el OMC fue de 17,4 min. La recta de calibración se muestra en la Figura 4.10 (b) y la ecuación de la recta obtenida fue $A = (63267 \pm 0,039) [\text{OMC mg L}^{-1}] - (5 \times 10^{-6} \pm 0,050)$ y el $R^2 = 0,993$.

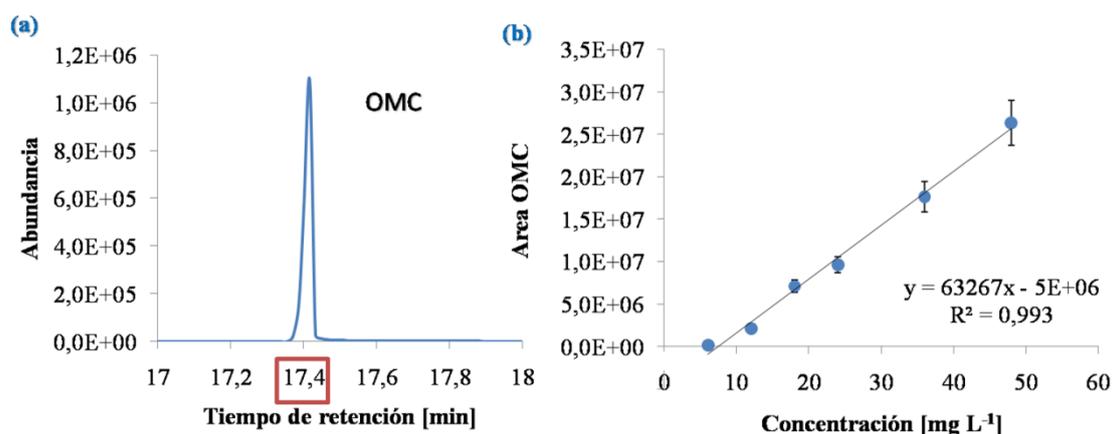


Figura 4.10 (a) Cromatograma de una solución testigo de OMC (30 mg L^{-1}) con un tiempo de retención de 17,4 min. (b) Recta de calibración del OMC en un rango de concentración entre $6,0$ - $48,0 \text{ mg L}^{-1}$.

4.4.4 Obtención de los perfiles de permeación

Los modelos de calibración definidos para la cuantificación de OMC en cada tipo de formulación (MEI-OMC y MEII-OMC) permitieron calcular las concentraciones de OMC en la SR a lo largo del proceso de permeación.

Cabe recordar que las concentraciones de OMC en las formulaciones MEI-OMC y MEII-OMC fueron 5,0 y 1,5 % (p/p), respectivamente. Una vez iniciado el proceso de permeación, el OMC cargado en las respectivas MEs difundió a través de la membrana de PA y se diluyó en la SR. A medida que transcurrió el tiempo, el OMC se fue concentrando en la SR hasta un momento en que la concentración fue máxima para luego hacerse constante (60 min).

Los perfiles de permeación obtenidos a partir de las concentraciones de OMC calculadas por los métodos propuestos y el método de referencia (GC-MS) para las formulaciones MEI-OMC (UV-Vis y EF) y MEII-OMC (EFS) son mostrados en las Fig. 4.11 (a) y 4.11 (b), respectivamente.

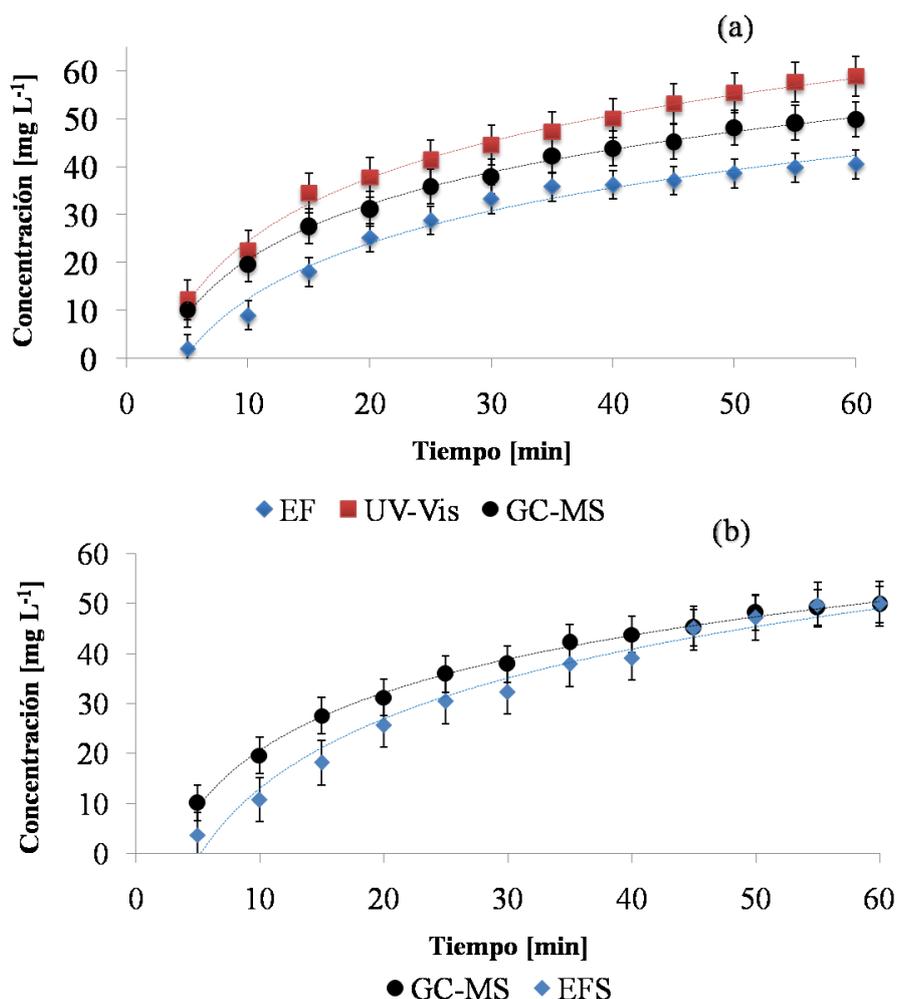


Figura 4.11 Perfiles de permeación de OMC obtenidos mediante los métodos propuestos y su comparación con una metodología de referencia. (a) MEI-OMC con detección GC-MS; (círculo negro); MEI-OMC con detección EF (rombo azul) y MEI-OMC con detección UV-Vis (cuadrado rojo). (b) MEII-OMC con detección GC-MS (círculo negro) y MEII-OMC con detección EFS (rombo azul).

Como se puede observar, las formulaciones exhibieron una fase inicial de mayor permeación del filtro UV, seguida de una permeabilidad sostenida. Sin embargo, en todos los casos, la evolución del perfil de permeación del OMC posee un patrón de liberación lento, lo que conduce a la difusión lenta del filtro químico desde la fase interna de la formulación.

En la Tabla 4.3 se observan las ecuaciones de ajuste para los distintos perfiles de permeación de ambas formulaciones y los correspondientes valores de R^2 . Estos

Capítulo 4. ESTUDIO DE PERMEACIÓN DEL OMC CARGADO EN SISTEMAS DE MEs

resultados indican que los perfiles de permeación de OMC en las formulaciones propuestas siguieron, en todos los casos, una cinética de orden cero.

Tabla 4.3 Modelos de ajuste para los perfiles de permeación obtenidos por los distintos métodos propuestos.

	Ecuación de ajuste	R ²
	CG-MS	
	$y = (17,32 \pm 0,02) \ln(x) - (19,50 \pm 0,04)$	0,991
	EF	
MEI-OMC	$y = (37,59 \pm 0,02) \ln(x) - (9,26 \pm 0,01)$	0,991
	UV-Vis	
	$y = (18,91 \pm 0,01) \ln(x) - (18,96 \pm 0,03)$	0,994
	CG-MS	
	$y = (9,76 \pm 0,02) \ln(x) - (0,56 \pm 0,01)$	0,976
MEII-OMC	EFS	
	$y = (21,39 \pm 0,02) \ln(x) - (36,64 \pm 0,01)$	0,952

(x) = [OMC mg L⁻¹]; cinética de orden cero y n=3.

Definidos los modelos y establecida la cinética, se calcularon las respectivas constantes cinéticas de permeabilidad (Kp) para OMC utilizando la ecuación (4.7):

$$Kp = \frac{Q}{A_t (C_0 - C_i)} \quad \text{Ecuación 4.7}$$

donde Q (mg) es la cantidad de compuesto difundido a través de la membrana en el tiempo t (min), A es el área expuesta de la membrana expresada en cm², y C₀ (mg L⁻¹) y C_i (mg L⁻¹) son las concentraciones del compuesto en el compartimento donador yceptor. En general, C₀ se considera la concentración del donador y C_i como 0.

Los valores de Kp obtenidos para las formulaciones estudiadas y mediante las distintas metodologías propuestas se pueden ver en la Tabla 4.4.

Capítulo 4. ESTUDIO DE PERMEACIÓN DEL OMC CARGADO EN SISTEMAS DE MEs

Tabla 4.4 Constantes cinéticas de permeabilidad (K_p) para OMC en las formulaciones estudiadas obtenidas mediante las metodologías propuestas y el método de referencia.

<i>MEI-OMC</i>	Técnicas de detección		
	<i>CG-MS</i>	<i>EF</i>	<i>UV-Vis</i>
K_p (cm min⁻¹)	$1,14 \times 10^{-4} \pm 1,38 \times 10^{-5}$	$1,65 \times 10^{-4} \pm 3,29 \times 10^{-5}$	$1,21 \times 10^{-4} \pm 1,76 \times 10^{-6}$
t calculado ^a	-	3,03	1,07
t crítico ^b	-	3,18	-
<i>MEII-OMC</i>	<i>CG-MS</i>	<i>EFS</i>	<i>UV-Vis</i>
K_p (cm min⁻¹)	$2,07 \times 10^{-4} \pm 1,47 \times 10^{-5}$	$2,98 \times 10^{-4} \pm 5,33 \times 10^{-5}$	-
t calculado ^a	-	3,12	-
t crítico ^b	-	3,18	-

Adicionalmente, para la formulación MEII-OMC fue posible obtener el perfil de permeación correspondiente al AEA (fase oleosa), ya que EFS asistida por PLS permitió calcular la concentración de AEA en la SR a lo largo del tiempo de permeación. El perfil de permeación correspondiente fue ajustado por la ecuación $y = (90,88 \pm 0,030) \ln [\text{AEA mg L}^{-1}] - (134,2 \pm 0,040)$; ($R^2 = 0,967$), determinando una cinética de permeación de orden cero, siendo la K_p $4,82 \times 10^{-4}$ cm min⁻¹. Esta información resulta de gran utilidad teniendo en cuenta las potenciales propiedades que presenta el AEA en la formulación propuesta, y que fueron descritas en el Capítulo 2, como ser actividad repelente^[173], antiinflamatoria^[174], entre otras^[175, 176].

Por otro lado, la veracidad de los diferentes métodos propuestos se verificó contrastando los valores obtenidos para ambas formulaciones con los correspondientes

¹⁷³ CHOKECHAIJAROENPORN O., BUNYAPRAPHATSARA N., KONGCHUENSIN S., Mosquito repellent activities of ocimum volatile oils, *Phytomedicine* 1994, 1, (1994) 135-139.

¹⁷⁴ RODRIGUES L. B., MARTINS A.O.B.P.B., CESÁRIO F.R.A.S., CASTRO F.F., ALBUQUERQUE T.R., FERNANDES M.N.M., SILVA B.A.F., JÚNIOR L.J.Q., COSTA J.G.M., COUTINHO H.D.M., BARBOSA R., MENEZES I.R.A., Anti-inflammatory and antiedematogenic activity of the Ocimum basilicum essential oil and its main compound estragole: In vivo mouse models. *Chemico-Biological Interactions* 2016, 257, 14-25.

¹⁷⁵ KOROCHA A. R., SIMON J. E., JULIANI H. R., Essential oil composition of purple basil, their reverted green varieties (*Ocimum basilicum*) and their associated biological activity. *Industrial Crops and Products* 2017, 107, 526-530.

¹⁷⁶ LEE S. J., UMANO K., SHIBAMOTO T., LEE K. G., Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties, *Food Chemistry* 2005, 91, 131-137.

Capítulo 4. ESTUDIO DE PERMEACIÓN DEL OMC CARGADO EN SISTEMAS DE MEs

al método de validación (GC-MS). Como puede observarse en la Tabla 4.4, a partir de la prueba de significación t [177], podemos decir que no existen diferencias significativas entre los valores de Kp obtenidos mediante los métodos propuestos respecto del método de referencia, con un nivel de confianza del 95% ($\alpha = 0,05$ y $n=3$).

4.4.5 Aplicación de los métodos propuestos a una muestra comercial

Los métodos espectrométricos UV-Vis y EF desarrollados, fueron aplicados a una emulsión comercial hidratante de día. Los valores de Kp para OMC obtenidos en cada caso (Tabla 4.5), se compararon con el método cromatográfico utilizado como referencia (HPLC).

Tabla 4.5 Constantes cinéticas de permeabilidad (Kp) para OMC en muestra real.

<i>Emulsión comercial</i>	Técnicas de detección		
	<i>HPLC</i>	<i>EF</i>	<i>UV-Vis</i>
R² (orden cero)	0,989	0,991	0,987
Kp (cm min⁻¹)	$1,38 \times 10^{-4} \pm 2,55 \times 10^{-5}$	$9,39 \times 10^{-5} \pm 8,5 \times 10^{-6}$	$8,97 \times 10^{-5} \pm 1,05 \times 10^{-5}$
t calculado ^a	-	2,82	2,89
t crítico ^b	-	3,18	3,18

Como puede verse, no existen diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos mediante los métodos propuestos y HPLC.

4.4.6 Ventajas del sistema propuesto

En la Tabla 4.6 se compara el método propuesto con respecto a diferentes métodos de análisis citados en bibliografía. El método desarrollado ofrece ventajas inherentes a los sistemas de flujo continuo empleando técnicas de detección económica y de fácil operación. La aplicación de herramientas estadísticas en el tratamiento de datos permitió monitorear dos compuestos (OMC y AEA) simultáneamente durante el

¹⁷⁷ MILLER J. C., MILLER J. N., Estadística para química analítica, 2da edición, Ed. Addison-Wesley Iberoamericana, E.U.A, Wilmington, Delaware, 1993, Capítulo 5.

proceso de permeación estudiado. Estas características están en concordancia con la llamada Química Analítica Verde. La química Verde incentiva el desarrollo de métodos analíticos que evitan o reducen el empleo de sustancias tóxicas, generan menor cantidad de desechos y poseen capacidad de determinación de varios analitos en forma simultánea con bajo consumo de energía. En este sentido, el método propuesto cumple con varios de estos principios, ya que no se requirió en el procedimiento el empleo de disolventes orgánicos, pretratamiento químico de muestra y técnicas separativas. De esta manera, se logró la reducción al mínimo de los desechos y tiempo de análisis. Además, se minimizaron los riesgos y la exposición directa del operador mediante el uso de un sistema cerrado y automático.

Capítulo 4. ESTUDIO DE PERMEACIÓN DEL OMC CARGADO EN SISTEMAS DE MEs

Tabla 4.6 Comparación entre varios métodos desarrollados para estudios de permeación *in vitro* utilizando la celda de difusión de Franz.

Método	Técnica de separación	Técnica de detección	Muestras	Método automatizado	Compuesto	Membrana	Medio receptor	Solvente
[178]	HPLC	UV (273 nm)	nanopartículas lipídicas	FIA	CF	Piel de cerdo	Buffer Hepes	ACN:agua (10:90 v/v)
[179]	-	EF (405 nm)	w/o emulsión	SIA	AS	Policarbonato	Buffer fosfato	-
[180]	HPLC	UV (310 nm)	o/w emulsión w/o emulsión nanocápsulas	-	OMC	Piel de cerdo	BF/NaCl 120 mM KCl 2.7 mM Oramix® 4.0%	ACN:agua (85:15 v/v)
[181]	HPLC	UV (310 y 360 nm)	o/w emulsión w/o emulsión	-	OMC BMBM	Celulosa	ET:agua (50:50 v/v)	ACN:agua (80:20 v/v)
[182]	-	UV (310 nm)	liposomas	-	OMC	Acetato de celulosa	Buffer fosfato Polisorbato 80:ET (70:30 v/v)	-
Método propuesto	-	EF (370-690 nm)	o/w MEs	SFC	OMC AEA	Poliamida	ET:agua (50:50 v/v)	-
Método propuesto	-	EF (390 nm)	microemulsión o/w	SFC	OMC	Poliamida	ET:agua (50:50 v/v)	-

¹⁷⁸ ALVES A. C., RAMOS II, NUNES C., MAGALHÃES L. M., SKLENÁŘOVÁ H., SEGUNDO M. A., LIMA J. L. F. C., REIS S., On-line automated evaluation of lipid nanoparticles transdermal permeation using Franz diffusion cell and low-pressure chromatography, *Talanta* 2016, 146, 369-374.

¹⁷⁹ KLIMUNDOVÁ J., MERVAROVÁ K., SKLENÁŘOVÁ H., SOLICH P., POLÁSEK M., Automated sequential injection fluorimetric set-up for multiple release testing of topical formulation, *Analytica Chimica Acta* 2006, 573, 366-370.

¹⁸⁰ JIMÉNEZ M. M., PELLETIER J., BOBIN M. F., MARTINI M. C., Influence of encapsulation on the *in vitro* percutaneous absorption of octyl methoxycinnamate, *International Journal of Pharmaceutics* 2004, 272, 45-55.

¹⁸¹ MONTENEGRO L., TURNATURI R., PARENTI C., PASQUINUCCI L., *In Vitro* Evaluation of Sunscreen Safety: Effects of the Vehicle and Repeated Applications on Skin Permeation from Topical Formulations, *Pharmaceutics* 2018, 10, 1-5.

¹⁸² MOTA A. C. V., FREITAS Z. M. F., JÚNIOR E. R., ORTIZ G. M. D., SANTOS-OLIVEIRA R., OZZETTI R. A., VERGNANINI A. L., RIBEIRO V. L., SILVA R. S., SANTOS E. P. D., *In vivo* and *in vitro* evaluation of octyl methoxycinnamate liposomes. *International Journal of Nanomedicine* 2013, 8, 4689-4701.

Capítulo 4. ESTUDIO DE PERMEACIÓN DEL OMC CARGADO EN SISTEMAS DE MEs

Método propuesto	UV (340 nm)	microemulsión o/w	SFC	OMC	Poliamida	ET:agua (50:50 v/v)	-
-----------------------------	----------------	----------------------	-----	-----	-----------	------------------------	---

FIA: análisis por inyección en flujo; SIA: análisis por inyección secuencial; SFC: sistema de flujo continuo; CF: cafeína; AS: ácido salicílico; OMC: octil p-metoxicinamato; BMBM: butil metoxidibenzoil metano; AEA: aceite esencial de albahaca; ACN: acetonitrilo.

4.5 Conclusiones Parciales

En esta parte de la tesis fue posible desarrollar exitosamente un sistema automático en línea para abordar el estudio de permeación de OMC presente en distintas muestras. La versatilidad del sistema permitió acoplar diferentes técnicas espectroscópicas de detección, las cuales variaron en función de la complejidad de la muestra, o más bien, de la presencia de componentes interferentes en la misma. Así, el estudio de permeación de la formulación MEI-OMC se realizó mediante espectroscopía UV-Vis y fluorescencia molecular utilizando calibración por mínimos cuadrados ordinarios. Mientras que en el caso de MEII-OMC, fue necesario utilizar espectroscopía de fluorescencia molecular sincrónica y análisis de datos mediante cuadrados mínimos parciales para resolver la interferencia causada por la fase oleosa (AEA). De esta manera, se evitó el uso de técnicas separativas, comúnmente empleadas en este tipo de ensayos (principalmente, GC y HPLC) lo que, en general, limita la obtención de información en tiempo real. Este es un punto de particular interés, sobre todo cuando se evalúan componentes fotosensibles como el OMC. Además, se pudo extender el análisis a una muestra comercial, conformada por una emulsión conteniendo el filtro OMC. En todos los casos, cada método fue validado con una técnica de referencia, no encontrándose diferencias significativas en los valores de las constantes de permeación (Kp). Por otro lado, los valores de Kp de OMC en MEI-OMC y MEII-OMC fueron comparables con el valor obtenido para la emulsión comercial, indicando que la permeabilidad de OMC en las formulaciones propuestas es similar a la de los productos encontrados en el mercado.

En resumen, podemos decir que el sistema automático propuesto presenta varias ventajas respecto de la metodología tradicional, como ser la reducción del tiempo de

Capítulo 4. ESTUDIO DE PERMEACIÓN DEL OMC CARGADO EN SISTEMAS DE MEs

análisis y el menor costo debido a las técnicas de detección empleadas. Además, el sistema es de fácil implementación y cumple con varios de los principios de la *Química Verde*, presentando un importante potencial para ser implementado en laboratorios de desarrollo y/o control de calidad de productos que contienen OMC.

Capítulo 5

**ESTUDIO DE CLASIFICACIÓN Y
CUANTIFICACIÓN DE OCTIL P-
METOXICINAMATO CARGADO EN
MICROEMULSIONES**

*Capítulo 5. ESTUDIO DE CLASIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE OCTIL
P-METOXICINAMATO CARGADO EN SISTEMAS DE MICROEMULSIONES*

5.1 Objetivos

En este trabajo se pretende obtener métodos de screening y cuantificación del filtro químico OMC cargado en una de las microemulsiones desarrolladas previamente utilizando el potencial de la técnica de espectroscopía Raman confocal (ERC). Los mapas espectrales así obtenidos serán analizados mediante distintas técnicas de análisis multivariado, de manera tal de obtener los correspondientes modelos de clasificación y cuantificación de OMC en este tipo de muestras.

5.2 Introducción

La determinación cuantitativa de compuestos activos como los filtros químicos solares como parte del control de calidad de productos que los contienen es absolutamente necesaria por dos motivos principales. Por un lado, los contenidos máximos autorizados por la ANMAT que corresponden con la distinta toxicidad que presentan dichas sustancias y, además, con la zona de aplicación del producto ^[183]. Por lo tanto, concentraciones superiores a lo establecido de este tipo de compuestos en el producto comercializado podría ocasionar problemas dermatológicos al consumidor. Los efectos secundarios más comunes asociados con OMC son irritación menor de la piel y el secado o endurecimiento de la misma. En raras ocasiones, las personas pueden desarrollar efectos secundarios de la piel más graves como ardor, escozor e hinchazón o erupción ^[184, 185]. Por otro lado, concentraciones del compuesto activo inferiores a lo declarado en el producto representa un riesgo importante a la salud del individuo, ya que no estaría asegurada la protección correspondiente frente a una exposición solar.

Como se ha mencionado anteriormente, el OMC es ampliamente utilizado en PPCPs y representa uno de los absorbentes liposolubles más comunes incorporados en las formulaciones de protección solar. Este compuesto suele estar presente en un rango de concentraciones de 0,1 a 10% (p/p) de acuerdo, en general, con las especificaciones técnicas de la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA, USA) ^[186] y de la

¹⁸³ ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA MÉDICA. Disponible en: http://www.anmat.gov.ar/webanmat/normativas_cosmeticos.asp

¹⁸⁴ NOHYNEK G. J., SCHAEFER H., Benefit and risk of organic ultraviolet filters, *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2001, 33, 285-299.

¹⁸⁵ Kimura K., Katoh T., Photoallergic contact dermatitis from the sunscreens ethylhexyl-p-methoxycinnamate (Parsol® MCX), *Contact Dermatitis Environmental and Occupational Dermatitis* 1995, 32, 304-305.

¹⁸⁶ FDA, Department of Health and Human Services, 21 CFR Parts 310, 352, 700 and 740, RIN 0910-AA01, Sunscreen Drug Products for the Over-the-Counter Human Use Final Monograph, Federal

Capítulo 5. ESTUDIO DE CLASIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE OMC CARGADO EN SISTEMAS DE ME_s

Unión Europea ^[187], quienes autorizan un nivel máximo de OMC de 7,5 y 10% (p/p), respectivamente.

Los métodos comúnmente aplicados para la determinación de OMC en diferentes formulaciones están basados en técnicas cromatográficas como HPLC ^[188, 189] y GC-MS ^[190] y técnicas espectroscópicas como espectroscopia de absorción UV-Vis ^[191], espectrometría de masas ^[192], espectroscopia de resonancia magnética nuclear ^[193], espectroscopia infrarrojo ^[194] y espectroscopia Raman ^[195]. Esta última fue aplicada en la determinación de diversos filtros UV en productos comerciales ^[196] y en la evaluación del comportamiento de los mismos en diferentes solventes ^[197]. Sin embargo, su aplicación ha sido hasta ahora limitada, encontrándose pocos trabajos que utilizan esta

Register, Rules and Regulations 1999, 64, 27666–27693. Disponible en: <https://www.govinfo.gov/content/pkg/FR-1999-05-21/pdf/99-12853.pdf>

¹⁸⁷ European Directive 76/768/EEC and its successive amendments, basic act 31976L0768. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/LSU/?uri=celex:31976L0768>

¹⁸⁸ CHISVERT A., PASCUAL-MARTÍ M. C., SALVADOR A., Determination of UV-filters in sunscreens by HPLC, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 2001, 369, 638–641.

¹⁸⁹ SCALIA S., Determination of sunscreen agents in cosmetic products by supercritical fluid extraction and high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* 2000, 870, 199–205.

¹⁹⁰ RUBIO L., VALVERDE-SOM L., SARABIA L. A., ORTIZ M. C., Improvement in the identification and quantification of UV filters and additives in sunscreen cosmetic creams by gas chromatography/mass spectrometry through three-way calibration techniques, *Talanta* 2019, 120156.

¹⁹¹ CHISVERT A., VIDAL M. T., SALVADOR A., Sequential injection analysis for benzophenone-4 and phenylbenzimidazole sulphonic acid in sunscreen sprays by solid-phase extraction coupled with ultraviolet spectrometry, *Analytica Chimica Acta* 2002, 464, 295–301.

¹⁹² HAUNSCHMIDT M., BUCHBERGER W., KLAMPFL C. W., HERTSENS R., Identification and semi-quantitative analysis of parabens and UV filters in cosmetic products by direct-analysis-in-real-time mass spectrometry and gas chromatography with mass spectrometric detection, *Analytical Methods* 2011, 3, 99–104.

¹⁹³ MORI K., ITOH K., SUZUKI S., NAKAMURA H., Analysis of ultraviolet absorbers in cosmetics by two dimension NMR spectroscopy, *Japanese Journal of Toxicology and Environmental Health* 1996, 42, 60–66.

¹⁹⁴ LIU X. H., LIANG X. Z., FANG X., ZHANG W. P., Preparation and evaluation of novel octylmethoxycinnamate-loaded solid lipid nanoparticles, *International Journal of Cosmetic Science* 2015, 37, 446–453.

¹⁹⁵ CHENG J., LI Y. S., ROBERTS L. R., WALKER G., Analysis of 2-ethylhexyl-p-methoxycinnamate in sunscreen products by HPLC and Raman spectroscopy, *Talanta* 1997, 44, 1807–1813.

¹⁹⁶ OLADEPO S. A., LOPPNOW G. R., Ultraviolet resonance Raman spectroscopy as a robust spectroscopic tool for in situ sunscreen analysis, *Analytica Chimica Acta* 2008, 628, 57–66.

¹⁹⁷ BEYERE L., YARASI S., LOPPNOW G. R., Solvent effects on sunscreen active ingredients using Raman spectroscopy, *Journal of Raman Spectroscopy* 2003, 34, 743–750.

técnica, principalmente, en matrices similares a las propuestas en este trabajo de tesis [198, 199].

La espectroscopía Raman (ER) es una técnica de alta resolución, de gran aplicación en el análisis químico y estructural de diversos tipos de compuestos y/o materiales, tanto de naturaleza orgánica como inorgánica. Esta técnica presenta importantes ventajas, tales como:

- ✚ Análisis *in situ*, ya que el mismo se realiza directamente sobre la muestra, sin tratamientos previos.
- ✚ Se trata de una técnica no destructiva.
- ✚ Se pueden analizar diferentes fases (de tamaño micrométrico) en un material.
- ✚ Permite analizar muestras sólidas, líquidas y soluciones acuosas.

Cuando un haz de radiación monocromática de frecuencia ν_0 incide sobre un conjunto de moléculas, parte de esta radiación es dispersada y posee la misma frecuencia que la radiación incidente (dispersión Rayleigh). Sin embargo, cuando una fracción pequeña de la radiación es dispersada a frecuencias diferentes, que difieren de la frecuencia de la radiación incidente ν_0 , este proceso es denominado dispersión inelástica o efecto Raman [200]. En este tipo de dispersión pueden darse dos fenómenos:

✚ Si el fotón dispersado tiene una frecuencia menor a la del incidente, se produce una transferencia de energía del fotón a la molécula que, después de saltar al nivel de energía no permitido, vuelve a uno permitido mayor que el que tenía inicialmente; el

¹⁹⁸ FLEISCHLI F. D., MATHES S., ADLHART C., Label free non-invasive imaging of topically applied actives in reconstructed human epidermis by confocal Raman spectroscopy, *Vibrational Spectroscopy* 2013, 68, 29-33.

¹⁹⁹ SOHN M., BUEHLER T., IMANIDI G., Repartition of oil miscible and water soluble UV filters in an applied sunscreen film determined by confocal Raman microspectroscopy, *Photochemical and Photobiological Sciences* 2016, 15, 861-871.

²⁰⁰ SKOOG D. A., HOLLER F. J., NIEMAN T. A., Principios de análisis instrumental, 5ta edición, Ed. McGraw-Hill/Interamericana de España, S.A.U, Madrid, 2001.

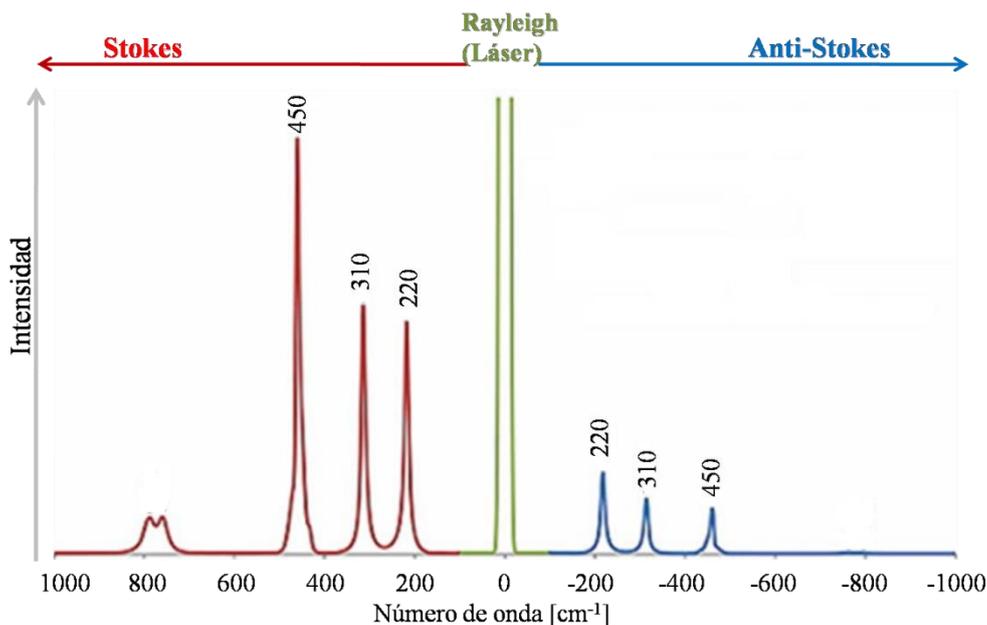


Figura 5.2 Ejemplo de un espectro Raman, con sus desplazamientos Stokes y anti-Stokes. El desplazamiento de las frecuencias Raman respecto de la frecuencia incidente.

El desplazamiento de las frecuencias Raman respecto de la frecuencia incidente ν_0 es independiente de esta última, y por ello suele tomarse como abscisa para representar los espectros Raman este desplazamiento, situando el centro de la banda Rayleigh como origen del eje (Fig. 5.3).

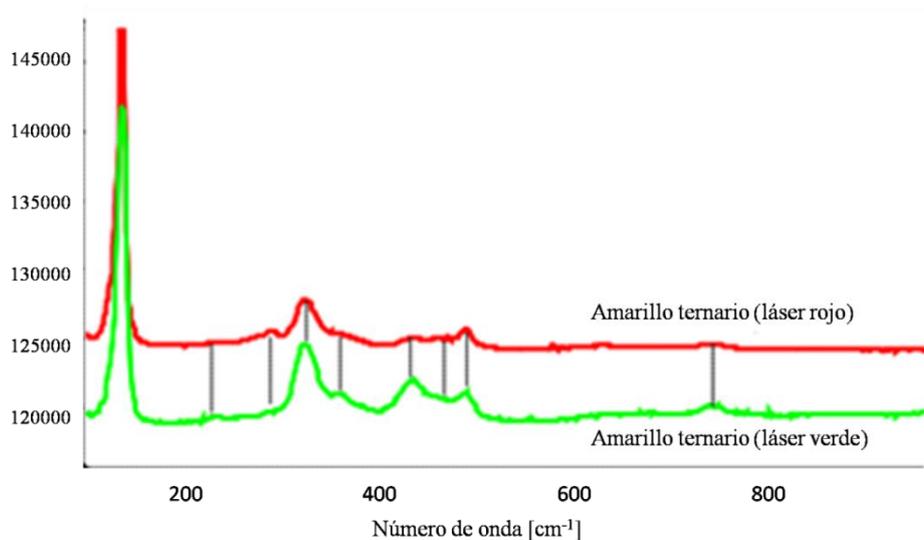


Figura 5.3 Espectros del amarillo ternario obtenidos con láser rojo y verde en los que vemos que las bandas Raman aparecen en las mismas posiciones frecuenciales en ambos casos.

A temperatura ambiente, según la ley de distribución de energías de Maxwell-Boltzman, el 99% de las moléculas se encuentra en el estado vibracional de menor energía y, por lo tanto, la probabilidad de que ocurran transferencias de energía que den lugar a la dispersión Raman Stokes es mucho mayor que la de la dispersión Raman anti-Stokes. Esto se traduce en que la intensidad de la dispersión Raman Stokes es del orden de 100 veces superior a la de la dispersión Raman anti-Stokes. Esta diferencia hace que se trabaje habitualmente midiendo sólo el efecto Stokes y por comodidad se sitúa el resultado en la parte positiva del eje.

Por otro lado, la espectroscopia Raman confocal (ERC) reúne la técnica de microscopía confocal con la técnica de espectroscopía Raman. En el primer caso, la confocalidad permite obtener imágenes de alta resolución y definición al tiempo que es posible obtener información tridimensional. El control de la confocalidad, permite seleccionar el plano focal de adquisición de la señal Raman procedente de zonas muy concretas de la muestra sin la contribución del entorno, aumentando así la resolución lateral con respecto a un microscopio convencional. La espectroscopía Raman se acopla al microscopio permitiendo, en cada pixel de una imagen, obtener un espectro Raman ^[201] (Fig 5.4).

²⁰¹ ASHTON L., HOLLYWOOD K. A., GOODACRE R., Making colourful sense of Raman images of single cells, *Analyst* 2015, 140, 1852-1858.

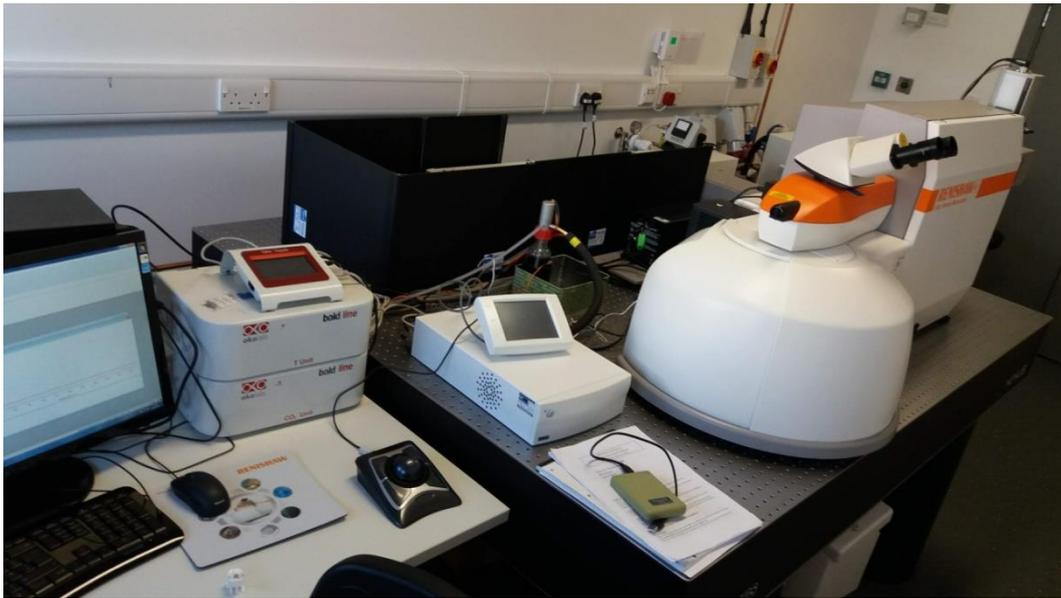


Figura 5.4 Fotografía de un microscopio Raman confocal, marca Renishaw Plc, modelo Wotton-Under-Edge, acoplado a un láser de longitud de onda de 532 nm y un microscopio con objetivo L50x. Este instrumento fue utilizado para el presente trabajo de tesis.

Las imágenes son tomadas punto a punto y línea por línea mientras la muestra es escaneada a través del láser de excitación (Fig. 5.5). De esta manera, la muestra puede ser analizada en segmentos a lo largo del eje óptico con la generación de las correspondientes imágenes ^[202].

²⁰² BALDOCK S. J., TALARI A. C. S., SMITH R., WRIGHT K. L., ASHTON L., Single-cell Raman microscopy of microengineered cell scaffolds, *Journal of Raman Spectroscopy* 2019, 50, 371-379.

ventajas en comparación con otras técnicas de imagen y espectroscopia, permitiendo realizar análisis rápidos y directos sobre la muestra, evitando pasos previos de pretratamiento.

Además, los datos obtenidos por ERC pueden analizarse mediante diversas herramientas quimiométricas, a fin de aprovechar al máximo la información del sistema químico en estudio. Breitreitz y col. (2018)^[204] y Paiva y col. (2018)^[205] emplearon ERC combinada con PLS para la caracterización de atorvastatina cálcica en emulsiones y la cuantificación de diversos polimorfos farmacéuticos, respectivamente. Por otro lado, Cordeiro y col. (2017)^[206] aplicaron la metodología MCR-ALS a datos de ERC para identificación y cuantificación de adulterantes en biocombustibles.

Teniendo en cuenta esto, los datos obtenidos por ERC pueden ser útiles para desarrollar modelos que permitan clasificar muestras de microemulsiones o bien permitan cuantificar uno o más componentes de las mismas.

En lo que respecta a estudios de clasificación, como se comentó en el Capítulo 1, sección 1.7.2, el análisis discriminante lineal (LDA) y modelado suave independiente por analogía de clases (SIMCA) son técnicas de reconocimiento de patrones que tienen la finalidad de identificar las similitudes y diferencias entre muestras basándose en determinadas propiedades químicas que las caracterizan, por ejemplo, pH, concentración, composición química, etc.

²⁰⁴ BREITKREITZ M. C., SABIN G. P., POLLA G., POPPI R. J., Characterization of semi-solid Self-Emulsifying Drug Delivery Systems (SEDDS) of atorvastatin calcium by Raman image spectroscopy and chemometrics, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2013, 73, 3-12.

²⁰⁵ PAIVA E. M., SILVA V. H., POPPI R. J., PEREIRA C. F., ROHWEDDER J. J. H., Comparison of macro and micro Raman measurement for reliable quantitative analysis of pharmaceutical polymorphs, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2018, 157, 107-115.

²⁰⁶ DANTAS W. F. C., ALVES J. C. L., POPPI R. J., MCR-ALS with correlation constraint and Raman spectroscopy for identification and quantification of biofuels and adulterants in petroleum diesel, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 2017, 169, 116-121.

El punto de partida de LDA es encontrar una función discriminante óptima, que sea una combinación lineal de las variables originales. Cuando aplicamos esta función a un nuevo conjunto de datos, nos indica a que clase pertenece ^[207]. Para un estudio que involucra c clases de objetos, el cuadrado de la distancia de Mahalanobis $r^2(\mathbf{x}, \boldsymbol{\mu}_k)$ entre un objeto \mathbf{x} y el centro de la k -ésima clase ($1, 2, \dots, c$) está definido por la ecuación 5.1:

$$\mathbf{r}^2(\mathbf{x}, \boldsymbol{\mu}_k) = (\mathbf{x} - \boldsymbol{\mu}_k)^T \boldsymbol{\Sigma}_k^{-1}(\mathbf{x} - \boldsymbol{\mu}_k) \quad \text{Ecuación 5.1}$$

donde $\boldsymbol{\mu}_k$ ($p \times 1$) y $\boldsymbol{\Sigma}_k$ ($p \times p$) pertenecen al vector media y a la matriz de covarianza para la clase k , respectivamente. En el caso en que los valores de la media y de la covarianza sean desconocidos, se pueden obtener estimaciones de estos valores, \mathbf{m}_k y S_k , respectivamente, a partir de un conjunto de entrenamiento con objetos de categorías conocidas. La función LDA estima una única matriz de covarianza conjunta S para todas las clases. A partir de estas estimaciones, el cuadrado de la distancia de Mahalanobis entre el objeto \mathbf{x} y el centro de la k -ésima clase es calculado por la ecuación 5.2:

$$\mathbf{r}^2(\mathbf{x}, \mathbf{m}_k) = (\mathbf{x} - \mathbf{m}_k)^T S^{-1}(\mathbf{x} - \mathbf{m}_k) \quad \text{Ecuación 5.2}$$

De esa manera, el objeto \mathbf{x} es considerado miembro de la clase k más cercana, para el cual se obtiene el menor cuadrado de la distancia de Mahalanobis $\mathbf{r}^2(\mathbf{x}, \mathbf{m}_k)$. Cuando el número de variables sea mayor que el número de clases, se podrán encontrar $c - 1$ funciones discriminantes.

Es importante destacar que el LDA es usualmente afectado por problemas de colinealidad, por lo que suele aplicarse a datos de pequeñas dimensiones o bien a datos previamente sometidos a algoritmos de selección de variables. En este último caso, un algoritmo de óptima aplicación para la selección de variables en conjuntos de datos de

²⁰⁷ DUDA R. O., HART P. E., STORK D., Patter Classification, 2da edición, Ed. Wiley, 2000.

naturaleza multivariada es el algoritmo de las proyecciones sucesivas (SPA, del inglés *successive projection algorithm*).

SPA es un algoritmo iterativo que realiza una secuencia de operaciones de proyecciones relacionadas a las columnas de una matriz X (K_c observaciones y j variables instrumentales), para generar subconjuntos con un número reducido de variables con información mínimamente redundante. SPA comienza con un vector x_0 (vector que corresponde a la variable inicial de selección) y calcula cuál de los vectores restantes tiene la mayor proyección sobre el plano S_0 ortogonal a x_0 . Este vector, que denominados x_1 , puede considerarse que contiene la mayor cantidad de información no incluida en x_0 (Fig. 5.6). En la siguiente iteración, SPA restringe el análisis al plano S_0 , tomando a x_1 como un vector de referencia. En cada iteración, una nueva variable es seleccionada para componer el subconjunto con un número de variables previamente establecido por el analista. Las proyecciones continúan sucesivamente siguiendo los pasos descritos anteriormente hasta que una cadena de variables es obtenida. De esta forma, se incorpora una nueva variable en cada iteración hasta alcanzar un determinado número N de variables. El mejor vector de inicio y el criterio de parada (número de variables a seleccionar) se pueden evaluar en base a una función de costo relacionada con el promedio de errores de clasificación de un conjunto de muestras utilizado para validación ^[208].

²⁰⁸ ARAUJO M. C. U., SALDANHA T. C. B., GALVÃO R. K. H., YONEYAMA T., CHAME H. C., VISANI V., *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 2001, 57, 65-73.

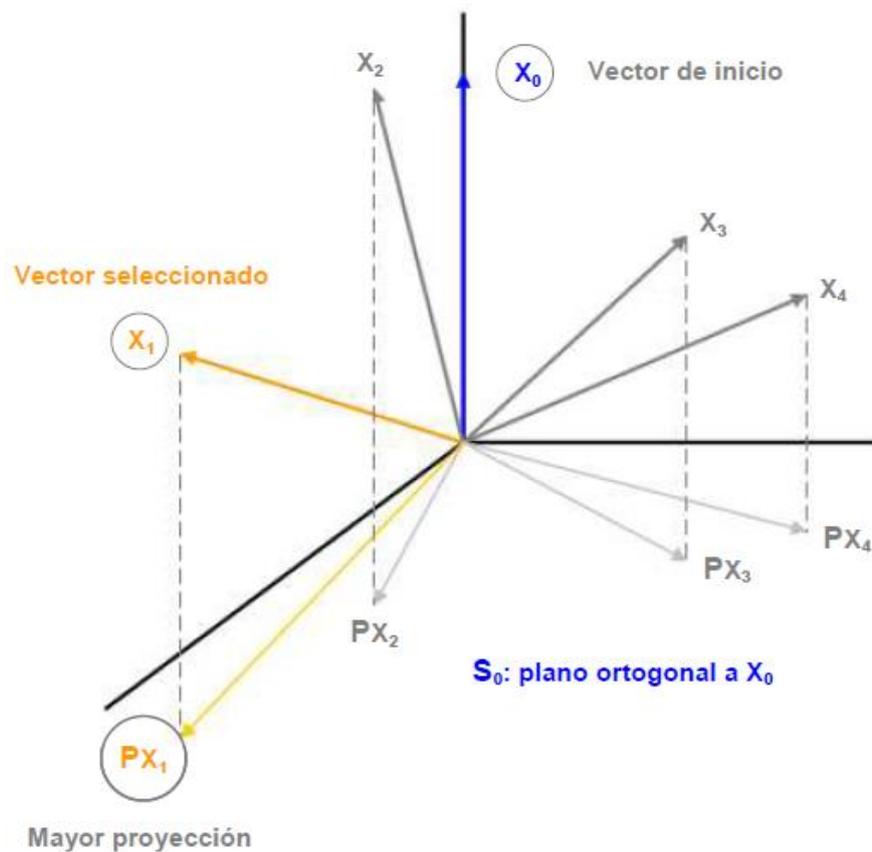


Figura 5.6 Ejemplo de selección de variables mediante SPA para un conjunto de 5 variables. El vector de inicio es X_0 y la mayor proyección sobre el plano ortogonal al mismo (S_0) corresponde a X_1 .

Por otro lado, SIMCA es una técnica de clasificación supervisada donde cada clase se modela mediante la aplicación del algoritmo PCA, de forma que cada clase tiene un modelo específico que la describe con un número óptimo de componentes principales (PCs). El número de PCs para cada clase en el conjunto de entrenamiento se determina mediante validación cruzada. Así, se calcula un modelo PCA para cada clase o categoría del sistema. Posteriormente, se integra cada una de las clases y se calcula sus límites o fronteras con una probabilidad dada. El modelo se optimiza mediante un conjunto de muestras de entrenamiento. A continuación, para comprobar su desempeño y minimizar los problemas relacionados con un exceso de ajuste, se valida con muestras externas. Finalmente, el modelo desarrollado se utiliza para predecir las clases en

Capítulo 5. ESTUDIO DE CLASIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE OMC CARGADO EN SISTEMAS DE MEs

muestras desconocidas y se calculan los correspondientes valores residuales y *Hotellings*. La asignación de clases se realiza cuando la distancia residual es menor que el límite estadístico definido para cada una de las clases ^[209].

En cuanto a las técnicas de calibración multivariada, la principal diferencia entre usar métodos de calibración en datos espectrales convencionales respecto de su aplicación en imágenes espectrales es el valor de referencia que se usa para realizar la calibración. En el estudio de imágenes, se debería tener valores de referencia para cada pixel de la imagen, lo que es muy poco probable. La situación más común es tener el valor de concentración global de una muestra como referencia. Se han propuesto estrategias que consisten en tomar el espectro promedio o espectro mediana de una imagen como el valor representativo la misma y realizar la calibración usando la concentración global de cada muestra ^[210].

Como se describió en el Capítulo 4, sección 4.2, PLS es una herramienta de gran utilidad para analizar datos de origen espectrométrico y cuantificar diversas especies en sistemas de multicomponentes. En particular, la aplicación de PLS a mapas espectrales originados mediante ERC ha sido aplicado con óptimos resultados, tal como ha sido demostrado recientemente por Silva y col. (2017) ^[211] y Duarte y col. (2017) ^[212].

De esta manera, en esta parte de la tesis se han aplicado las técnicas SPA-LDA y SIMCA a datos espectrales obtenidos mediante ERC para la clasificación de muestras

²⁰⁹ WOLD S., SJÖSTRÖM M., SIMCA: A method for analyzing chemical data in terms of similarity and analogy, *American Chemical Society* 1977, 52, 243-282.

²¹⁰ SMITH G. P. S., MCGOVERIN C. M., FRASER S. J., GORDON K. C., Raman imaging of drug delivery systems, *Advanced Drug Delivery Reviews* 2015, 89, 21-41.

²¹¹ SILVA D. J., WIEBECK H., Using PLS, iPLS and siPLS linear regressions to determine the composition of LDPE/HDPE blends: A comparison between confocal Raman and ATR-FTIR spectroscopies, *Vibrational Spectroscopy* 2017, 92, 259-266.

²¹² DUARTE L. M., PASCHOAL D., IZUMI C. M. S., DOLZAN M. D., ALVES V. R., MICKE G. A., SANTOS H. F., OLIVEIRA M. A. L., Simultaneous determination of aspartame, cyclamate, saccharin and acesulfame-K in powder tabletop sweeteners by FT-Raman spectroscopy associated with the multivariate calibration: PLS, iPLS and siPLS models were compared, *Food Research International* 2017, 99, 106-114.

de la formulación MEI-OMC con diferentes concentraciones de OMC. Por otra parte, se utilizó el algoritmo PLS para el análisis de los correspondientes mapas espectrales y poder cuantificar OMC en este tipo de muestras.

5.3 Parte Experimental

Los experimentos correspondientes a esta parte del trabajo de tesis se llevaron a cabo en el Laboratorio de Física y Química Analítica, dependiente del Departamento de Química de la Universidad de Lancaster, Reino Unido (Laboratory of Physical and Analytical Chemistry, Department of Chemistry, Lancaster University, Lancaster, LA1 4YB, UK ^[213]).

5.3.1 Materiales

Todos los reactivos empleados fueron de calidad analítica y las soluciones se prepararon usando agua ultra pura (18M Ω cm).

-  Decaetilenglicol mono-dodecil éter (Sigma)
-  Etanol absoluto (Dorwil)
-  Ácido oleico (Applichem)
-  Octil-p-metoxicinamato (Sigma)

Para esta serie de estudios se analizó la formulación MEI, la cual fue cargada con diferentes cantidades de OMC, de tal manera de obtener concentraciones finales de 1,0; 3,0; 5,0; 7,0 y 10% (p/p). Todas las formulaciones fueron obtenidas tal como se describió en el Capítulo 2, sección 2.4.3.

²¹³ LANCASTER UNIVERSITY, Physical and Analytical Chemistry, disponible en: www.lancaster.ac.uk/chemistry/research/physical/

5.3.2 Métodos

5.3.2.1 Adquisición de datos

Los datos de ERC fueron obtenidos con un instrumento marca Renishaw Plc[®], modelo Wotton-Under-Edge 2000, acoplado a un láser de longitud de onda de 532 nm y un microscopio con objetivo L50X, (Fig. 5.4). El software empleado para la de adquisición de datos fue Wire 4.1.

Los espectros ERC fueron obtenidos en la región entre 600 a 1700 cm^{-1} , con una rejilla de difracción de 2400 líneas/mm y con un detector de dispositivo de carga acoplada (CCD, del inglés *charged-coupled device*). En cada análisis se utilizó un volumen de 10 μL de cada formulación, el cual fue colocado en un portaobjetos de vidrio para obtener las correspondientes imágenes.

El mapeo de las muestras se realizó en el modo streamline, con un tiempo de exposición del láser de 0,8s y un máximo de potencia (100%). Cada muestra generó mapas constituidos por un área de 17x12 píxeles.

Los espectros para cada muestra fueron obtenidos del promedio de 4 barridos de 20s cada uno, en tres puntos diferentes de la imagen obtenida por ERC.

Las áreas de pico de los espectros Raman fueron calculadas con el programa Wire 4.1.

5.3.2.2 Análisis de datos

El pretratamiento de datos obtenidos por ERC y los análisis de clasificación y calibración se realizaron utilizando diferentes rutinas de trabajo que fueron ejecutadas en el programa MatLab[®], versión 2010.a.

5.3.2.2.1 Preprocesamiento de datos

Los espectros obtenidos fueron suavizados mediante el algoritmo de Savitzky-Golay, con un polinomio de segundo orden y una ventana de 7 puntos, de tal manera de aumentar la relación señal/ruido y reducir ruidos aleatorios de alta frecuencia. Además, se procedió a la corrección de la línea de base mediante el uso del algoritmo de los cuadrados mínimos asimétricos (AsLS; del inglés, *asymmetric least squares*)^[214]. En este algoritmo se varían dos parámetros: p para la asimetría de los datos y λ para el suavizado de los mismos. Para señales con picos positivos los valores de p suelen variar entre $0,001 \leq p \leq 0,1$; mientras que los valores de λ suelen variar entre $10^2 \leq \lambda \leq 10^9$. El uso de este algoritmo es sencillo y consiste en ir variando ambos parámetros hasta obtener la corrección de la línea de base, para lo cual, normalmente la inspección visual es suficiente. En este trabajo, los valores que se determinaron para ambos parámetros fueron: $p = 0,001$ y $\lambda = 10^3$. La ventaja del uso de este algoritmo es que, normalmente, la corrección de la línea de base es un proceso semimanual, el cual consume tiempo y es poco reproducible. De esta manera, con el uso de AsLS se puede corregir la línea de base, de todos los espectros medidos, de una sola vez y bajo las mismas condiciones. En la Fig. 5.7, pueden observarse espectros obtenidos mediante ERC (a) espectros brutos sin pretratamiento y (b) espectros corregidos con AsLS.

²¹⁴ SHIXUAN, H., ZHANG W., LIU L., HUANG L., HE J., XIE W., WU P., DU C., Baseline Correction for Raman Spectra Using Improved Asymmetric Least Squares, *Analytical Methods* 2014, 6, 4402-4407.

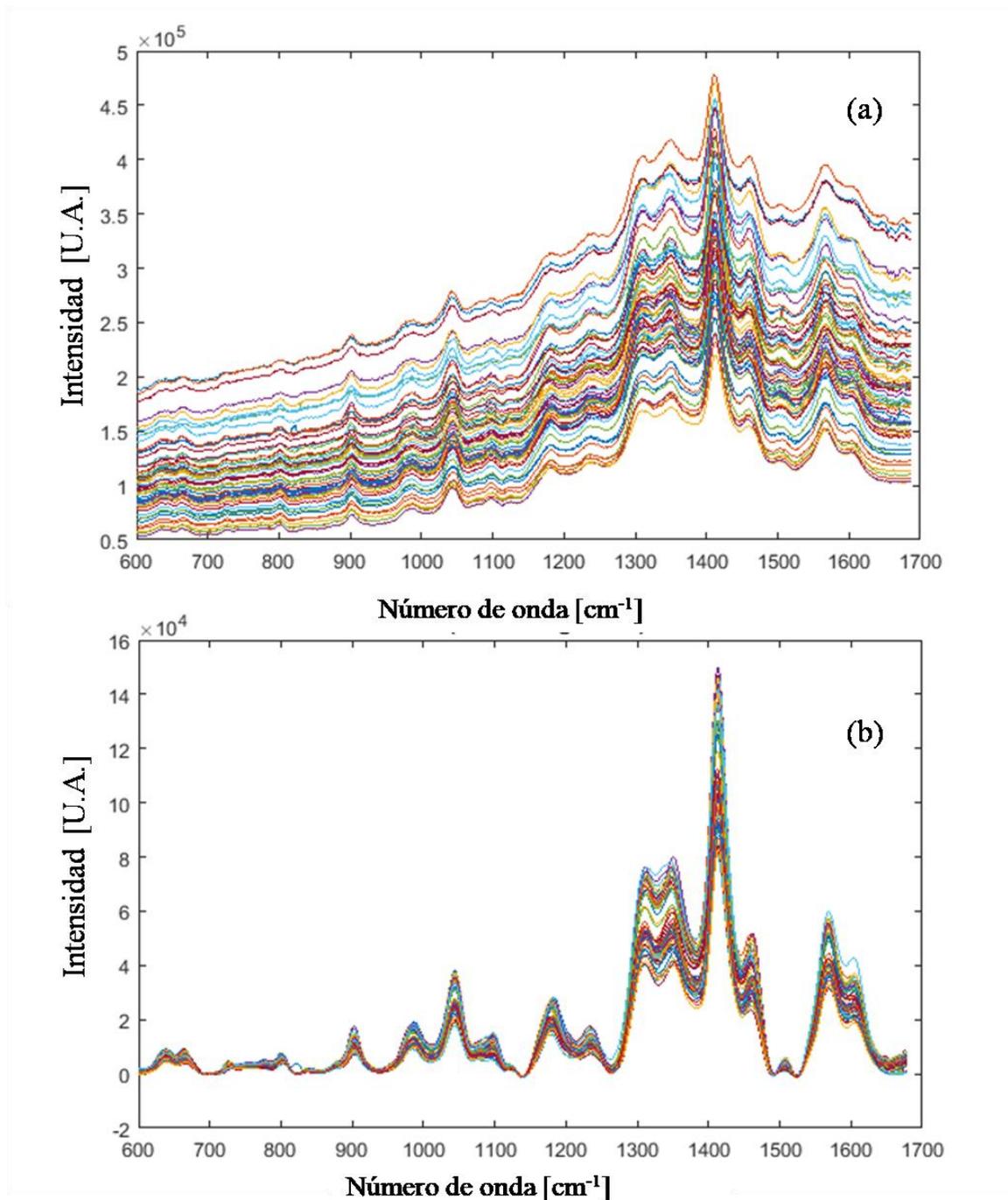


Figura 5.7 Espectros Raman correspondientes a la formulación MEI-OMC cargada con un 5% del filtro OMC. (a) Espectros brutos sin pretratamiento (b) Espectros pretratados con AsLS para la corrección de la línea de base ($p = 0,001$; $\lambda = 10^3$).

5.3.2.2.2 Análisis de clasificación de muestras de MEI-OMC

Previo al estudio mediante las técnicas supervisadas SPA-LDA y SIMCA, se aplicó al conjunto de datos el algoritmo de muestreo uniforme de Kennard-Stone (KS), el cual seleccionó un 70% y 30% de las muestras para los conjuntos de entrenamiento y predicción, respectivamente. Las muestras correspondientes al conjunto de entrenamiento se emplearon para calcular los vectores de cada clase, así como la matriz de covarianza. Por otro lado, las muestras de predicción se utilizaron como un conjunto externo para evaluar el desempeño de la clasificación resultante aplicando el modelo obtenido.

De esta manera, el conjunto de entrenamiento estuvo compuesto por seis clases, cada una representando un nivel de concentración de OMC cargado en las MEs: 0; 1,0; 3,0; 5,0; 7,0 y 10% (p/p). El conjunto de predicción presentó tres niveles de concentración de OMC (clases): 3,0; 5,0 y 7,0% (p/p). Cada muestra en su correspondiente clase y para ambos conjuntos fue preparada por quintuplicado, por lo que en total el conjunto de entrenamiento estuvo conformado por 30 muestras y el conjunto de predicción por otras 15 muestras, tal como se puede observar en la Tabla 5.1.

Capítulo 5. ESTUDIO DE CLASIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE OMC CARGADO EN SISTEMAS DE MEs

Tabla 5.1 Número de muestras (N) de entrenamiento y predicción en cada clase para el conjunto de datos obtenidos por ERC.

Clases	N	ERC	
		Entrenamiento	Predicción
MEI	5	5	-
1,0% MEI-OMC	5	5	-
3,0% MEI-OMC	10	5	5
5,0% MEI-OMC	10	5	5
7,0% MEI-OMC	10	5	5
10% MEI-OMC	5	5	-
Total	45	30	15

El conjunto de datos de entrenamiento fue utilizado en la construcción de los modelos de clasificación mediante SPA-LDA y SIMCA. Los modelos obtenidos se utilizaron en la predicción de muestras adicionales (conjunto de datos de predicción o prueba) para su validación.

Por otro lado, en la evaluación de los resultados del modelo SIMCA, se utilizaron los diagramas de Coomans ^[215], en los cuales se reportan las distancias de las muestras a cada una de las clases del modelo. Para ello, se fijó en 5 % el nivel de significación de los límites y fronteras que definen cada clase.

5.3.2.2.3 Análisis de cuantificación de OMC

La calibración mediante PLS fue realizada utilizando la técnica de validación cruzada. El número óptimo de variables latentes se seleccionó mediante el criterio de

²¹⁵AZCARATE S. M., GIL R., SMICHOVSKI P., SAVIO M., CAMIÑA J. M., Chemometric application in foodomics: Nutritional quality parameters evaluation in milk-based infant formula, *Microchemical Journal* 2017, 130, 1-6.

Haaland y Thomas ^[216]. Los conjuntos de entrenamiento y predicción se describen en la Tabla 5.1.

5.4 Resultados y Discusión

5.4.1 Análisis espectral de los componentes de MEI-OMC mediante ERC

La Fig. 5.8 muestra los espectros Raman correspondientes a la formulación propuesta sin carga (MEI) y a los componentes puros que conforman la misma, es decir, AO (fase oleosa), DME (surfactante) y OMC (filtro químico).

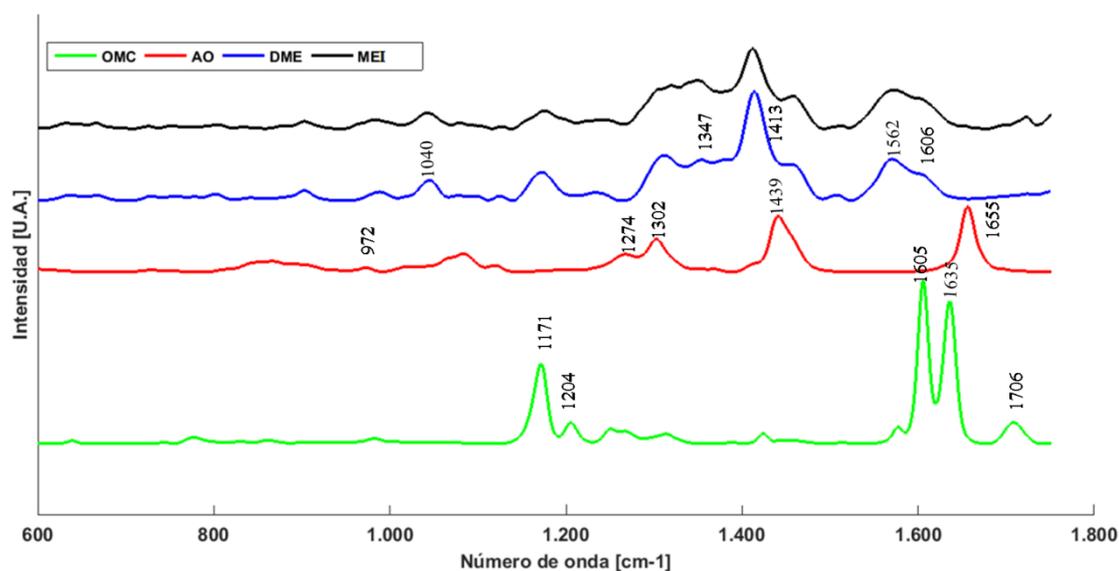


Figura 5.8 Espectros Raman correspondientes a la formulación sin carga (MEI, línea negra) y a sus componentes puros AO (fase oleosa, línea roja), DME (surfactante, línea azul) y OMC (filtro químico, línea verde). En los mismos se indican los números de onda (cm^{-1}) correspondientes a las bandas principales en cada caso.

El espectro Raman correspondiente al OMC (Fig. 5.8, línea verde) muestra cuatro bandas principales alrededor de 1171, 1204, 1605 y 1635 cm^{-1} , y una banda relativamente intensa en 1706 cm^{-1} . Las bandas a 1706 cm^{-1} y 1635 cm^{-1} pueden asignarse al estiramiento del enlace C-O correspondiente al éster conjugado del OMC y

²¹⁶ HAALAND D.M., THOMAS E.V. Partial least-squares methods for spectral analyses. 1. Relation to other quantitative calibration methods and the extraction of qualitative information, *Analytical Chemistry* 1988, 60, 1193–1202.

al estiramiento del enlace C=C exocíclico conjugado, respectivamente. La banda a 1605 cm⁻¹ corresponde a vibraciones del anillo aromático, mientras que la banda a 1204 cm⁻¹ se asocia a la torsión de los enlaces C-O-C del grupo p-metoxi. Por último, la banda a 1171 cm⁻¹ corresponde a la torsión de los enlaces C-H [217].

En el caso del espectro del AO (Fig. 5.8, línea roja), se pueden observar bandas importantes a 1655, 1439 y 1302 cm⁻¹. La banda de vibración a 1655 cm⁻¹ se atribuye a la frecuencia de estiramiento del enlace C=O del grupo carboxílico. El desplazamiento de esta banda a una región de menor frecuencia puede deberse a la formación de dímeros del ácido graso originados por la existencia de puentes de hidrógeno. La banda a 1439 cm⁻¹ corresponde a la frecuencia de estiramiento C=C, mientras que la banda a 1302 cm⁻¹ se atribuye a la frecuencia de torsión del CH₂ [218, 219].

En relación al espectro del DME (Fig. 5.8, línea azul), se observa que las bandas principales aparecen alrededor de 1606, 1562, 1413, 1347 y 1040 cm⁻¹. Las tres primeras 1606, 1562 y 1413 cm⁻¹ se atribuyen a la frecuencia de estiramiento del enlace C=C. Por otro lado, la banda presente en 1347 cm⁻¹ corresponde al enlace O-H y la banda a 1040 cm⁻¹ corresponde a la frecuencia de estiramiento C-O [220, 221].

En cuanto al espectro MEI (Fig. 5.8, línea negra), el mismo resulta similar al espectro del surfactante, es decir, con bandas principales a 1606, 1562, 1413, 1347 y

²¹⁷ L. Beyere, S. Yarasi and G. R. Loppnow, Solvent effects on sunscreen active ingredients using Raman spectroscopy, *Journal of Raman Spectroscopy* 2003, 34, 743-750.

²¹⁸ SILVÉRIO, W. N., Dutra, G. V. S., JENSEN A. T., ARAÚJO O. A., GARG V., OLIVEIRA A. C., VALADARES L. F., SOUZA F. G., MACHADO F., Superparamagnetic nanoparticles stabilized with free-radical polymerizable oleic acid-based coating, *Journal of Alloys and Compounds* 2018, 739, 1025-1036.

²¹⁹ VERMA S. P., WALLACH D. F. H., Raman spectra of some saturated, unsaturated and deuterated C18 fatty acids in the HCH-deformation and CH-stretching regions, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 1977, 486, 217-227.

²²⁰ BARTLETT J. R., COONEY R. P., Raman Spectroscopic Studies of Poly(oxyethylene) Chain Conformations in Non-ionic Surfactants, *Journal Chemical Society Faraday Transactions I* 1986, 82, 597-605.

²²¹ SUN S., BIRKE R. L., LOMBARDI J. R., Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Surfactants on Silver Electrodes, *Journal Physical Chemistry*, 1990, 94, 2005-2010.

1040 cm^{-1} , debido a que la formulación contiene como componente mayoritario DME. Por otro lado, pueden observarse las contribuciones del AO, principalmente a 1439 cm^{-1} . Sin embargo, algunas frecuencias correspondientes al AO no están presentes (por ejemplo, 1655 cm^{-1}), pese a encontrarse en cantidades importantes dentro de la formulación (1,5%).

5.4.2 Análisis de Datos

5.4.2.1 Análisis exploratorio

Inicialmente se llevó a cabo un análisis exploratorio de los datos mediante la aplicación de PCA. Como puede verse en la Fig. 5.9 el gráfico de *scores* de PC1 vs. PC2 muestra una gran superposición entre las distintas muestras, no observándose agrupamientos de clases bien definidos. Por lo tanto, se procedió a la utilización de técnicas de reconocimiento de patrones supervisados para mejorar de esta manera los resultados.

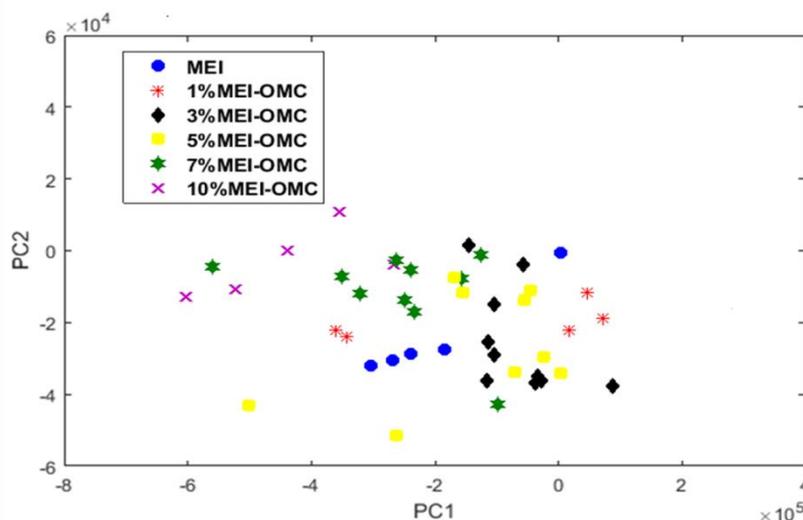


Figura 5.9 Gráfico de *scores* (PC1 vs PC2) correspondiente a la aplicación de PCA al conjunto de muestras analizadas conteniendo diferentes concentraciones de OMC.

5.4.2.2 Análisis de clasificación mediante SPA-LDA y SIMCA

El algoritmo SPA fue aplicado al conjunto de datos espectrales con el objeto de seleccionar las variables, en este caso número de onda (cm^{-1}), cuyo contenido de información es mínimamente redundante, maximizando así la separabilidad entre clases y minimizando la variabilidad dentro de cada clase. Como puede observarse en la Fig. 5.10, SPA seleccionó siete variables de frecuencia: 1171, 1340, 1370, 1400, 1560, 1580 y 1605 cm^{-1} , dentro del rango espectral analizado ($700 - 1700 \text{ cm}^{-1}$). De esta manera, se aplicó el algoritmo LDA, el cual clasificó correctamente el 98% de las muestras en sus respectivas clases. Esto indica que las frecuencias seleccionadas transmiten suficiente información para discriminar las diferentes clases correspondientes a formulaciones con distinta concentración de OMC.

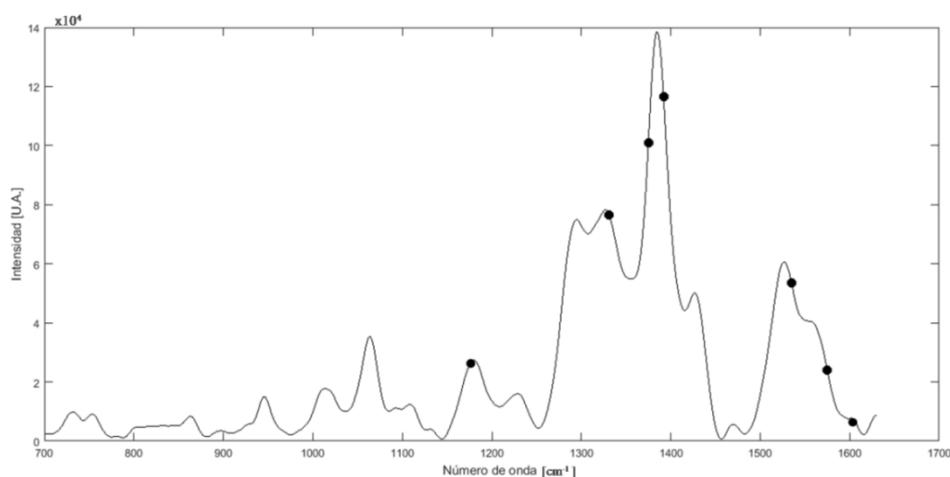


Figura 5.10 Espectro Raman con indicación de las variables seleccionadas por el algoritmo SPA en el modelo de clasificación.

En la Fig. 5.11 se muestra el gráfico de funciones discriminantes (DF; del inglés, *discriminant function*) de Fisher para DF1, DF2 y DF4 obtenidos al aplicar SPA-LDA. En el mismo se puede observar un claro agrupamiento en las distintas clases y la

Capítulo 5. ESTUDIO DE CLASIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE OMC CARGADO EN SISTEMAS DE MEs

correcta clasificación de las muestras de predicción, salvo en un caso (una muestra de la clase 7,0% MEI-OMC).

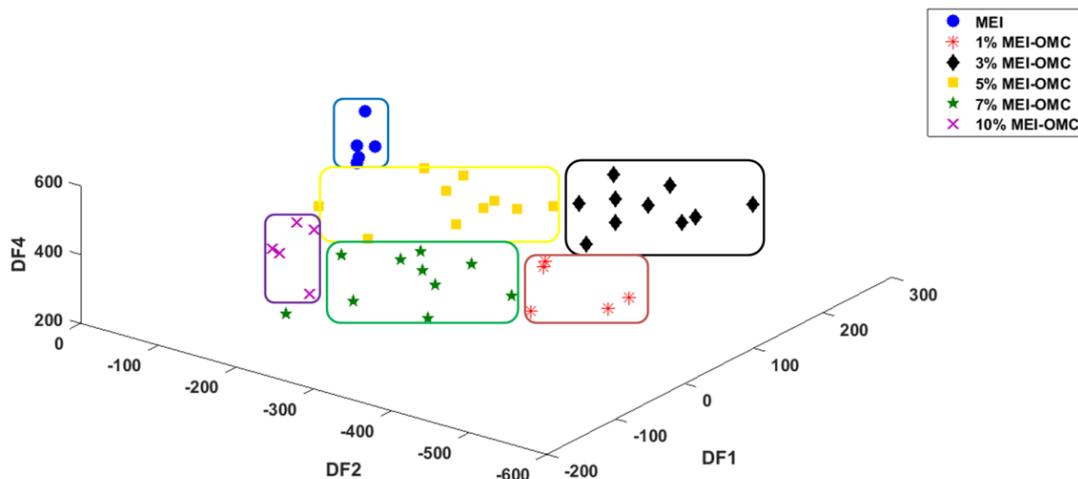


Figura 5.11 Gráfico de funciones discriminantes de Fisher (DF1, DF2 y DF4) correspondientes al modelo SPA-LDA.

En la Fig. 5.12 se pueden observar otros gráficos representando las distintas funciones discriminantes luego de aplicar SPA-LDA. De los mismos se puede deducir que DF1 separa las muestras de las clases MEI/1%MEI-OMC y 1%MEI-OMC/3%MEI-OMC, mientras que la DF2 separa las clases 7%MEI-OMC y 10%MEI-OMC. Del mismo modo, las muestras que pertenecen a la clase 3%MEI-OMC se discriminan de las muestras de la clase 5%MEI-OMC, y las muestras 5%MEI-OMC se discriminan de las muestras 7%MEI-OMC a partir de DF4.

Capítulo 5. ESTUDIO DE CLASIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE OMC CARGADO EN SISTEMAS DE MEs

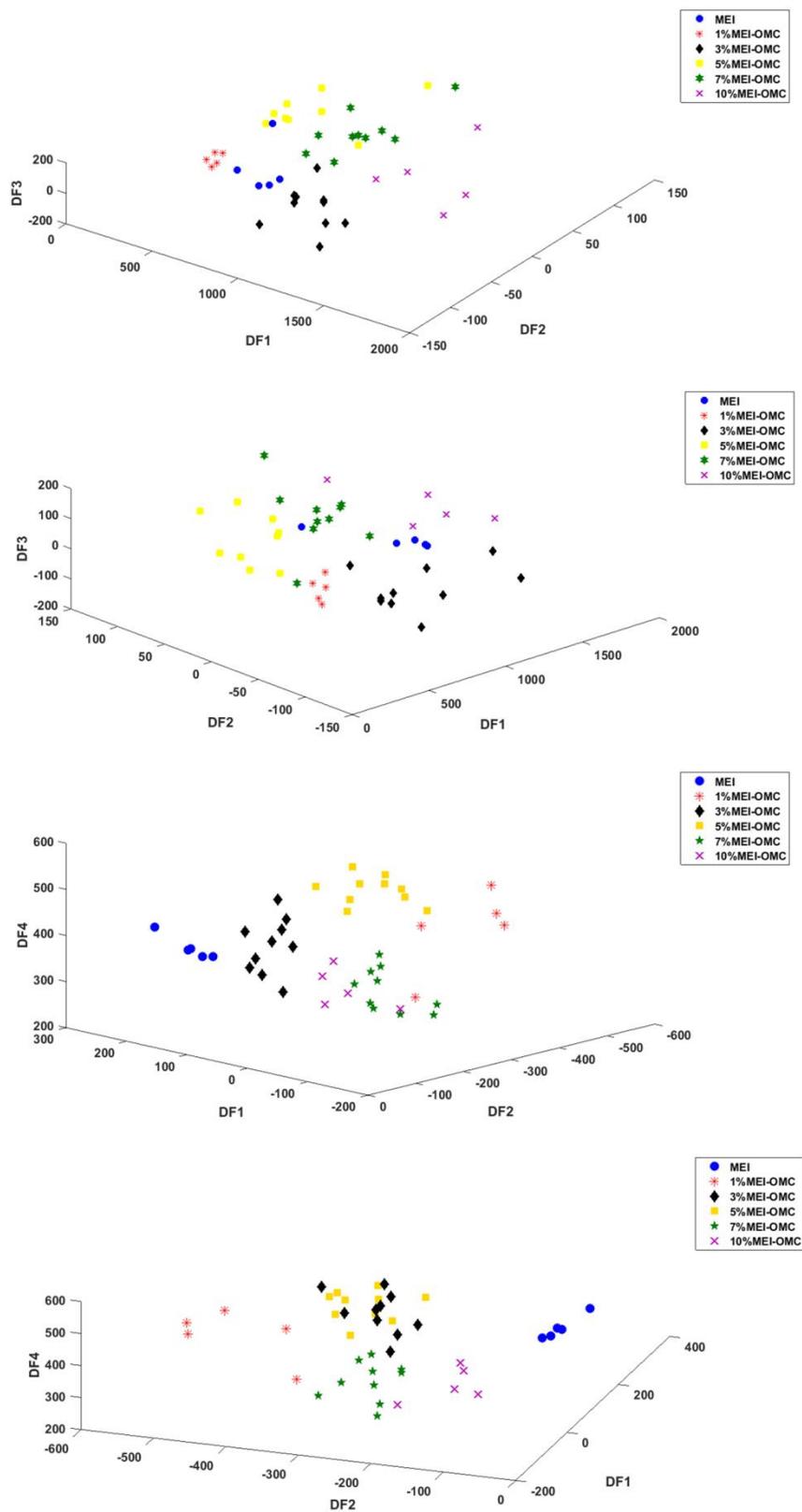


Figura 5.12 Gráfico de las distintas funciones discriminantes de Fisher obtenidas luego de aplicar SPA-LDA al conjunto de espectros Raman.

Capítulo 5. ESTUDIO DE CLASIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE OMC CARGADO EN SISTEMAS DE MEs

Por otro lado, SIMCA utilizó una cantidad óptima de 4 PCs, presentando una variancia explicada superior al 97%. Así, todas las variables incluidas en la construcción del modelo SIMCA (en total 930 variables) exhibieron una buena capacidad de modelado y de discriminación entre clases.

Una manera de evaluar los resultados del modelo SIMCA es mediante el gráfico de Coomans (Fig. 5.13), en la cual se reflejan las distancias de las muestras de los conjuntos de predicción con respecto a las clases definidas por el modelo. Se puede observar como las muestras de predicción 3%MEI-OMC, 5%MEI-OMC y 7%MEI-OMC se clasifican correctamente en sus respectivas clases, mientras que las muestras correspondientes a otras clases caen fuera de los límites que definen las fronteras de las clases predichas.

Capítulo 5. ESTUDIO DE CLASIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE OMC CARGADO EN SISTEMAS DE MEs

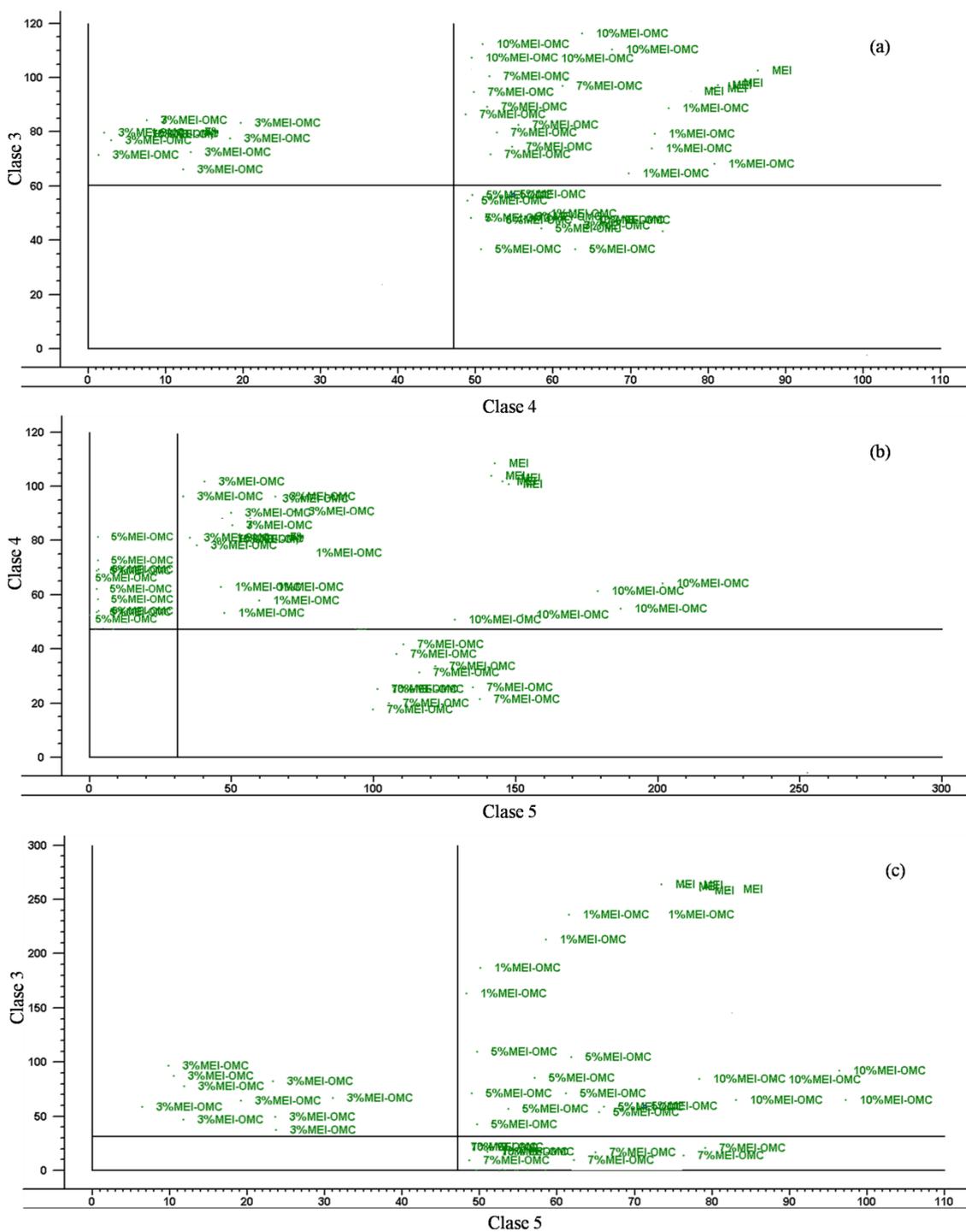


Figura 5.13 Gráfico de Coomans representando las distancias ortogonales de las muestras de predicción respecto de las clases definidas por el modelo. (a) 3%MEI-OMC y 5%MEI-OMC; (b) 5%MEI-OMC y 7%MEI-OMC y (c) 3%MEI-OMC y 7%MEI-OMC.

Capítulo 5. ESTUDIO DE CLASIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE OMC CARGADO EN SISTEMAS DE MEs

Como puede observarse en la Tabla 5.2, el estudio de clasificación usando SPA-LDA fue óptimo para todas las formulaciones con concentraciones de 3,0% y 5,0% de OMC. Sólo una muestra de la clase 7%MEI-OMC fue clasificada incorrectamente como perteneciente a la clase (10%MEI-OMC).

En el caso de SIMCA, el modelo encontrado permitió clasificar correctamente la totalidad de las muestras del conjunto de predicción, presentando una óptima discriminación de clases para muestras conteniendo diferentes concentraciones OMC.

Tabla 5.2 Resumen de los resultados de la clasificación de las formulaciones MEI-OMC para SPA-LDA y SIMCA en nivel de confianza del 95%.

Conjunto	SPA-LDA (error %)	Variables	SIMCA (error %)	Nº de factores
Entrenamiento (30 Muestras)	-	7	-	4
Predicción (15 muestras)	1		0	

5.4.2.3 Análisis de cuantificación de OMC en MEI mediante PLS

La determinación de la concentración de OMC en formulaciones MEI fue realizada por PLS utilizando los mapas de colores (en inglés, *rainbow color*) espectrales obtenidos por ERC, los cuales proporcionan una representación visual de la distribución de OMC en las diferentes muestras.

El color de la imagen resulta de la superposición de todos los canales (números de onda) en que fue obtenido el espectro, por lo que diferencias en la coloración de distintas zonas de la muestra corresponderían a diferencias en el espectro Raman. En la Fig. 5.14 se pueden observar los mapas de colores correspondientes a las muestras de predicción, es decir, a muestras de MEI cargadas con 3,0; 5,0 y 7,0% (p/p) de OMC. En las mismas, se observan zonas de coloración naranja-amarillo, que debido a su distribución y ubicación, pueden ser atribuidas al OMC, y zonas de coloración verde claro/azul, las que podrían corresponder los demás componentes de la formulación. La

Capítulo 5. ESTUDIO DE CLASIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE OMC CARGADO EN SISTEMAS DE MEs

imagen correspondiente representa un área de la muestra de aproximadamente $204 \mu\text{m}^2$.

Por lo tanto, éstas imágenes proporcionan una distribución del componente en un área pequeña.

Capítulo 5. ESTUDIO DE CLASIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE OMC CARGADO EN SISTEMAS DE MEs

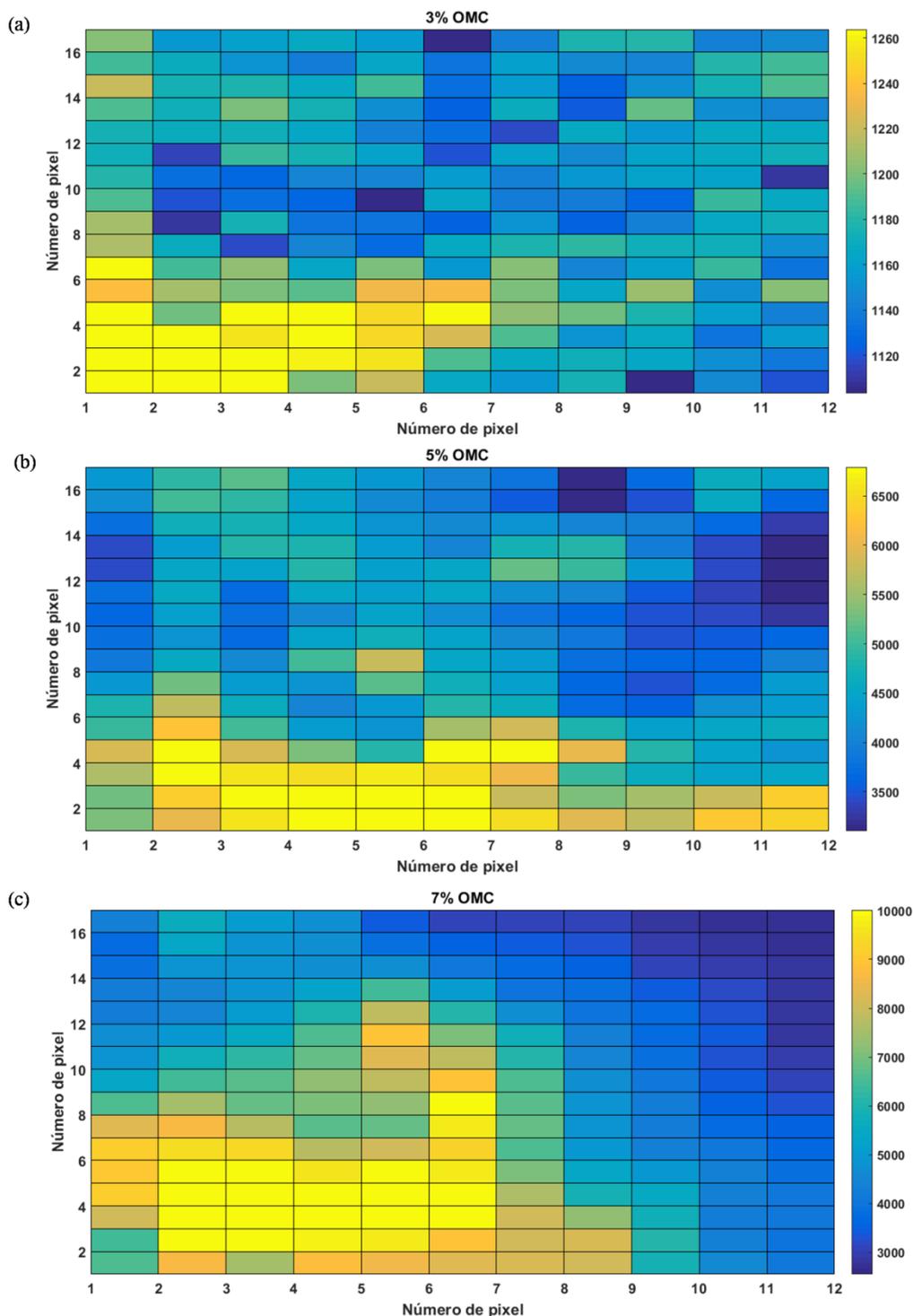


Figura 5.14 Mapa de colores espectrales obtenidos por ERC correspondientes a las diferentes muestras del conjunto de predicción: a) 3,0% MEI-OMC; b) 5,0% MEI-OMC; c) 7,0% MEI-OMC. La imagen representa un área de la muestra de aproximadamente $204 \mu\text{m}^2$.

Capítulo 5. ESTUDIO DE CLASIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE OMC CARGADO EN SISTEMAS DE MEs

Para la obtención de un modelo de calibración aplicando PLS, fueron necesarias seis variables latentes, las cuales explicaron el 97,5% de la varianza de los datos. Los diferentes parámetros estadísticos del modelo de calibración se muestran en la Tabla 5.3. Como se puede observar, el modelo presentó un óptimo de RMSEP y un apropiado valor de R^2 (0,9699).

Tabla 5.3 Parámetros estadísticos correspondientes al modelo PLS para la cuantificación de OMC en muestras de MEI mediante ERC.

Rango espectral (cm^{-1})	600-1700
Concentración (% p/p)	1-10
Variables latentes	6
R^2	0,9699
RMSEP (% p/p)	0,5434
SEN (% p/p)	52,19
LOD (% p/p)	0,0300
LOQ (% p/p)	0,0909

En la Fig. 5.15 se puede observar una óptima correlación entre los valores nominales y predichos por el modelo propuesto y la ausencia de errores sistemáticos. Además, los valores de LOD y LOQ fueron relativamente bajos, demostrando la capacidad del método para detectar y cuantificar pequeñas cantidades de OMC.

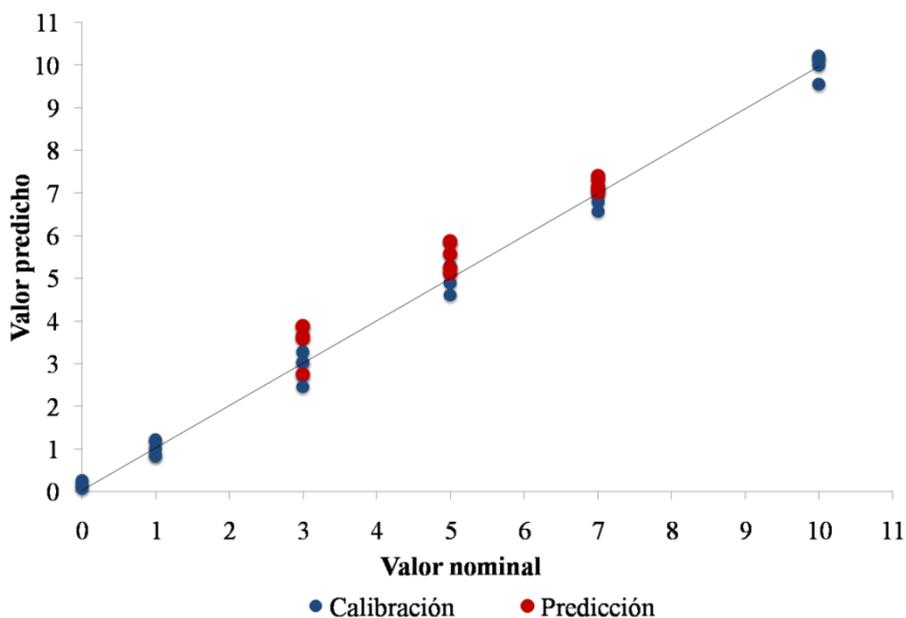


Figura 5.15 Representación de los valores nominales respecto de los valores predichos por el modelo PLS en la cuantificación de OMC en muestras de MEI.

5.5 Conclusiones Parciales

En esta parte de la investigación se exploró la factibilidad de combinar la información obtenida por ERC con diversas herramientas quimiométricas en el análisis cualitativo y cuantitativo de sistemas organizados del tipo de las microemulsiones. De esta manera, se obtuvieron óptimos modelos para la clasificación de formulaciones con diferentes concentraciones de OMC, basados en el análisis de mapas espectrales obtenidos mediante ERC con algoritmos con y sin previa selección de variables (SPA-LDA y SIMCA, respectivamente). Ambos modelos representan una potencial herramienta de *screening* para evaluar la presencia de OMC en formulaciones del tipo ME1. En el caso particular de SPA-LDA, es importante destacar que sólo fueron necesarias siete frecuencias para la construcción del respectivo modelo. Por otro lado, se obtuvo un modelo con óptimos parámetros analíticos, incluyendo un relativamente bajo

Capítulo 5. ESTUDIO DE CLASIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE OMC CARGADO EN SISTEMAS DE MEs

LOD, para la cuantificación de OMC en el mismo tipo de muestras, basado en la aplicación de PLS a los mapas espectrales obtenidos por ERC.

Sin embargo, deben profundizarse los estudios, explorando la capacidad de los modelos para clasificar y cuantificar muestras con mayor concentración de OMC (mayores al 10%) y evaluando la performance de los mismos en el análisis de muestras comerciales.

Capítulo 6

CONCLUSIONES GENERALES

Capítulo 6. CONCLUSIONES GENERALES

El trabajo de investigación llevado a cabo en la presente tesis asume dos importantes aportes. Por un lado, existe una gran demanda por parte de la sociedad de la presencia en el mercado de productos que presenten una óptima y duradera protección frente a la radiación UV, dado los diversos y conocidos efectos negativos que ésta genera en el organismo, principalmente en la piel. Por ello, se propuso el desarrollo de formulaciones basadas en microemulsiones del tipo o/w como sistemas de carga para filtros químicos solares, particularmente uno de gran aplicación como lo es el octil p-metoxicinamato. Por otra parte, los organismos de control de productos de cuidado personal deben contar con herramientas que permitan evaluar de manera confiable la calidad de dichos productos, a fin de proteger a los consumidores del daño que circunstancialmente pudieran ocasionar los mismos. Con este propósito, se abordó el diseño y desarrollo de metodologías analíticas que permitan el estudio de diversos procesos químicos en las formulaciones propuestas, y el análisis cualitativo y cuantitativo del filtro químico solar en los sistemas de interés. De esta manera, los puntos más importantes de esta investigación fueron:

✚ Se obtuvieron dos sistemas del tipo de las microemulsiones(o/w), denominadas MEI-OMC y MEII-OMC, utilizando en la síntesis componentes de relativamente bajo costo y biocompatibles para aplicación tópica.

✚ Los estudios fisicoquímicos demostraron la obtención de sistemas monodispersos, termodinámicamente estables, de tamaño menor a 100 nm y capaces de solubilizar compuestos de características lipofílicas.

✚ Las microemulsiones (o/w) propuestas permitieron cargar concentraciones adecuadas de octil p-metoxicinamato, un filtro químico UVB, liposoluble, del grupo de los metoxicinamatos, de amplio uso en productos para protección solar, cuidado de la

piel y protección diaria. La incorporación del filtro UVB no modificó significativamente las características de los sistemas portadores. Se obtuvieron óptimos valores de factor de protección solar en ambos casos (7,7 para MEI-OMC y 2,8 para MEII-OMC) teniendo en cuenta que se trata de formulaciones con un único componente activo.

✚ Adicionalmente, la formulación MEII-OMC presenta componentes con potencial actividad antiinflamatoria y repelente de mosquitos. Esto proporciona un importante valor agregado al producto debido a que, además de la protección frente a la radiación UV, el sistema podría contribuir a la prevención de enfermedades transmitidas por *Aedes aegypti*, como son el dengue, el zika y la fiebre chikungunya.

✚ En lo referente a los estudios analíticos, se desarrollaron sistemas automáticos, con detección en línea y monitoreo en tiempo real, para la obtención de las constantes de fotodegradación y permeación de octil p-metoxicinamato.

✚ En ambos casos, la combinación de técnicas espectroscópicas (absorción molecular UV-Vis y fluorescencia molecular) con herramientas quimiométricas de primer (PLS) y segundo orden (MCR-ALS) permitieron resolver interferencias espectrales y el análisis y aprovechamiento de gran cantidad de datos.

✚ Con respecto al estudio de fotodegradación, se pudo observar que la K_f del octil p-metoxicinamato cargado en las microemulsiones propuestas es significativamente menor que la obtenida para OMC en un medio no organizado. Esto evidencia un posible efecto fotoprotector de la microemulsión sobre el filtro químico solar de interés.

✚ En cuanto al estudio de permeabilidad, los valores de K_p del octil p-metoxicinamato cargado en MEI-OMC y MEII-OMC fueron comparables con el valor obtenido para una emulsión comercial, indicando que la permeabilidad de las formulaciones propuestas es similar a la de los productos encontrados en el mercado.

✚ Los métodos analíticos desarrollados son simples y rápidos, principalmente debido a la posibilidad de monitorear en tiempo real el proceso en estudio.

✚ Además, la metodología es económica debido a los insumos, la aparatología y la instrumentación empleada.

✚ Un aspecto importante es el cumplimiento de varios de los doce principios de la *Química Verde*, reduciendo de manera significativa el impacto ambiental respecto de metodologías separativas comúnmente utilizadas en este tipo de estudios.

✚ Finalmente, se propone un potencial método de *screening* y de cuantificación del filtro químico solar octil p-metoxicinamato en la formulación MEI-OMC, basado en la combinación de espectroscopía Raman confocal y diversas herramientas quimiométricas.

✚ El estudio de mapas espectrales permitió obtener óptimos modelos de clasificación mediante algoritmos de amplio uso, como SPA-LDA y SIMCA.

✚ En cuanto a la cuantificación de octil p-metoxicinamato en la formulación MEI-OMC, el análisis de datos mediante el algoritmo PLS generó un modelo con óptimos parámetros estadísticos.

✚ Se prevé continuar con los estudios de clasificación y cuantificación de octil p-metoxicinamato en la formulación propuesta y, dado el potencial de la técnica empleada, poder extenderlo a otro tipo de muestras.

Apéndice

Apéndice I

Valores de la composición de varios puntos del sistema MEI utilizados en la construcción del diagrama pseudoternario.

Tabla I.1 Relación de componentes estudiada para la obtención MEs con AO como fase oleosa utilizando una mezcla Smix (DME:ET) 1:1.

Diagrama pseudo-ternario de fases (1:1)																	
(95:5)			(87,5:12,5)			(75:25)			(50:50)			(25:75)			(12,5:87,5)		
%Smix	%AO	%Agua	%Smix	%AO	%Agua	%Smix	%AO	%Agua	%Smix	%AO	%Agua	%Smix	%AO	%Agua	%Smix	%AO	%Agua
23,75	1,25	75,00	30,04	3,51	66,46	36,33	32,02	31,66	48,72	48,53	4,76	7,14	21,43	71,43	5,00	35,00	60,00
22,35	1,18	76,47	25,76	3,01	71,24	34,75	30,63	34,61	45,56	45,38	9,05	6,67	20,00	73,33	4,17	29,17	66,67
21,11	1,11	77,78	22,55	2,63	74,82	33,31	29,36	37,33	43,59	43,42	12,99	6,25	18,75	75,00	3,57	25,00	71,43
20,00	1,05	78,95	20,05	2,34	77,61	31,99	28,19	39,82	40,00	40,00	20,00	5,88	17,65	76,47	3,13	21,88	75,00
19,00	1,00	80,00	18,05	2,11	79,85	26,67	23,51	49,81	38,00	38,00	22,00	5,56	16,67	77,78	2,78	19,44	77,78
18,10	0,95	80,95	16,41	1,91	81,68	22,88	20,16	56,96	35,50	35,50	29,00	5,26	15,79	78,95	2,50	17,50	80,00
17,27	0,91	81,82	15,04	1,76	83,20	20,02	17,65	62,32	30,00	30,00	40,00	5,00	15,00	80,00	2,27	15,91	81,82
16,52	0,87	82,61	30,04	3,51	66,46	17,81	15,69	66,50	25,00	25,00	50,00	7,14	21,43	71,43	5,00	35,00	60,00
15,83	0,83	83,33		-		16,03	14,13	69,84	23,00	23,00	54,00		-			-	
11,18	0,59	88,24		-		14,57	12,85	72,58	20,50	20,50	59,00		-			-	
23,75	1,25	75,00		-		36,33	32,02	31,66	48,72	48,53	4,76		-			-	

Tabla I.2 Relación de componentes estudiada para la obtención MEs con AO como fase oleosa utilizando una mezcla Smix (DME:ET) 2:1.

Diagrama pseudo-ternario de fases (2:1)																	
(95:5)			(87,5:12,5)			(75:25)			(50:50)			(25:75)			(12,5:87,5)		
%Smix	%AO	%Agua	%Smix	%AO	%Agua	%Smix	%AO	%Agua	%Smix	%AO	%Agua	%Smix	%AO	%Agua	%Smix	%AO	%Agua
76,19	19,05	4,76	70,00	10,00	20,00	63,33	3,33	33,33	47,62	47,62	4,76	23,81	71,43	4,76	11,90	83,33	4,76
72,73	18,18	9,09	58,33	8,33	33,33	54,29	2,86	42,86	45,45	45,45	9,09	22,22	66,67	11,11	11,36	79,55	9,09
69,57	17,39	13,04	50,00	7,14	42,86	47,50	2,50	50,00	43,48	43,48	13,04	20,00	60,00	20,00	10,87	76,09	13,04
66,67	16,67	16,67	43,75	6,25	50,00	42,22	2,22	55,56	41,67	41,67	16,67	18,18	54,55	27,27	10,42	72,92	16,67
64,00	16,00	20,00	38,89	5,56	55,56	38,00	2,00	60,00	40,00	40,00	20,00	16,67	50,00	33,33	10,00	70,00	20,00
53,33	13,33	33,33	35,00	5,00	60,00	34,55	1,82	63,64	38,46	38,46	23,08	14,29	42,86	42,86	9,62	67,31	23,08
45,71	11,43	42,86	31,82	4,55	63,64	31,67	1,67	66,67	33,33	33,33	33,33	12,50	37,50	50,00	9,26	64,81	25,93
40,00	10,00	50,00	29,17	4,17	66,67	29,23	1,54	69,23	28,57	28,57	42,86	11,11	33,33	55,56	-	-	-
35,56	8,89	55,56	26,92	3,85	69,23	27,14	1,43	71,43	25,00	25,00	50,00	10,00	30,00	60,00	-	-	-
32,00	8,00	60,00	25,00	3,57	71,43	25,33	1,33	73,33	22,22	22,22	55,56	9,09	27,27	63,64	-	-	-
29,09	7,27	63,64	23,33	3,33	73,33	23,75	1,25	75,00	20,00	20,00	60,00	-	-	-	-	-	-
26,67	6,67	66,67	21,88	3,13	75,00	22,35	1,18	76,47	18,18	18,18	63,64	-	-	-	-	-	-
24,62	6,15	69,23	20,59	2,94	76,47	21,11	1,11	77,78	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22,86	5,71	71,43	-	-	-	20,00	1,05	78,95	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla I.3 Relación de componentes estudiada para la obtención MEs con AO como fase oleosa utilizando una mezcla Smix (DME:ET) 3:1.

Diagrama pseudo-ternario de fases (3:1)																	
(95:5)			(87,5:12,5)			(75:25)			(50:50)			(25:75)			(12,5:87,5)		
%Smix	%AO	%Agua	%Smix	%AO	%Agua	%Smix	%AO	%Agua	%Smix	%AO	%Agua	%Smix	%AO	%Agua	%Smix	%AO	%Agua
76,00	4,00	20,00	70,00	10,00	20,00	66,67	22,22	11,11	41,67	41,67	16,67	18,18	54,55	27,27	11,90	83,33	4,76
63,33	3,33	33,33	58,33	8,33	33,33	60,00	20,00	20,00	40,00	40,00	20,00	16,67	50,00	33,33	11,36	79,55	9,09
54,29	2,86	42,86	50,00	7,14	42,86	54,55	18,18	27,27	38,46	38,46	23,08	14,29	42,86	42,86	10,87	76,09	13,04
47,50	2,50	50,00	43,75	6,25	50,00	50,00	16,67	33,33	33,33	33,33	33,33	12,50	37,50	50,00	10,42	72,92	16,67
42,22	2,22	55,56	38,89	5,56	55,56	42,86	14,29	42,86	28,57	28,57	42,86	11,11	33,33	55,56	10,00	70,00	20,00
38,00	2,00	60,00	35,00	5,00	60,00	37,50	12,50	50,00	25,00	25,00	50,00	10,00	30,00	60,00	9,62	67,31	23,08
34,55	1,82	63,64	31,82	4,55	63,64	33,33	11,11	55,56	22,22	22,22	55,56	9,09	27,27	63,64	9,26	64,81	25,93
31,67	1,67	66,67	29,17	4,17	66,67	30,00	10,00	60,00	20,00	20,00	60,00	8,33	25,00	66,67	8,93	62,50	28,57
29,23	1,54	69,23	26,92	3,85	69,23	27,27	9,09	63,64	18,18	18,18	63,64	7,69	23,08	69,23	8,62	60,34	31,03
27,14	1,43	71,43	25,00	3,57	71,43	25,00	8,33	66,67	16,67	16,67	66,67	18,18	54,55	27,27	8,33	58,33	33,33
25,33	1,33	73,33	23,33	3,33	73,33	23,08	7,69	69,23	15,38	15,38	69,23	16,67	50,00	33,33	7,14	50,00	42,86
23,75	1,25	75,00	21,88	3,13	75,00	21,43	7,14	71,43	14,29	14,29	71,43	14,29	42,86	42,86	6,25	43,75	50,00
22,35	1,18	76,47	20,59	2,94	76,47	20,00	6,67	73,33	41,67	41,67	16,67		-		5,56	38,89	55,56
21,11	1,11	77,78	19,44	2,78	77,78	18,75	6,25	75,00	40,00	40,00	20,00		-			-	
20,00	1,05	78,95	18,42	2,63	78,95	17,65	5,88	76,47	38,46	38,46	23,08		-			-	
19,00	1,00	80,00	17,50	2,50	80,00	16,67	5,56	77,78		-			-			-	
18,10	0,95	80,95	16,67	2,38	80,95		-			-			-			-	
17,27	0,91	81,82	15,91	2,27	81,82		-			-			-			-	
16,52	0,87	82,61	15,22	2,17	82,61		-			-			-			-	
15,83	0,83	83,33	14,58	2,08	83,33		-			-			-			-	
11,18	0,59	88,24		-			-			-			-			-	
19,44	2,78	77,78		-			-			-			-			-	

Apéndice I

18,42	2,63	78,95	-	-	-	-	-	-
17,50	2,50	80,00	-	-	-	-	-	-
16,67	2,38	80,95	-	-	-	-	-	-

Apéndice II

Valores de la composición de varios puntos del sistema MEII utilizados en la construcción del diagrama pseudoternario.

Tabla II.1 Relación de componentes estudiada para la obtención de MEs con AEA como fase oleosa utilizando una mezcla (DME:ET) 1:1.

Diagrama pseudo-ternario de fases (1:1)																	
(95:5)			(90:10)			(80:20)			(70:30)			(60:40)			(50:50)		
%Smix	%AEA	%Agua	%Smix	%AEA	%Agua	%Smix	%AEA	%Agua	%Smix	%AEA	%Agua	%Smix	%AEA	%Agua	%Smix	%AEA	%Agua
86,07	4,89	9,04	81,48	9,51	9,01	49,85	43,94	6,21	60,89	30,45	8,66	56,84	38,45	4,71	47,72	47,53	4,74
78,93	4,49	16,58	74,74	8,72	16,54	46,94	41,37	11,69	56,04	28,02	15,94	54,29	36,72	8,99	45,56	45,38	9,05
72,89	4,15	22,97	69,03	8,06	22,91	44,35	39,09	16,56	51,91	25,95	22,14	51,95	35,14	12,91	43,59	43,42	12,99
67,71	3,85	28,44	64,14	7,48	28,38	42,03	37,04	20,93	48,34	24,17	27,49	49,81	33,69	16,50	-	-	-
63,21	3,59	33,19	59,89	6,99	33,12	39,94	35,20	24,86	45,23	22,61	32,16	47,83	32,35	19,81	-	-	-
59,28	3,37	37,35	56,17	6,55	37,28	38,05	33,53	28,42	-	-	-	46,01	31,12	22,87	-	-	-
55,80	3,17	41,02	52,88	6,17	40,95	36,33	32,02	31,66	-	-	-	44,32	29,98	25,70	-	-	-
52,71	3,00	44,29	49,96	5,83	44,21	34,75	30,63	34,61	-	-	-	42,75	28,92	28,23	-	-	-
49,95	2,84	47,21	47,34	5,53	47,13	33,31	29,36	37,33	-	-	-	-	-	-	-	-	-
47,46	2,70	49,84	44,99	5,25	49,76	31,99	28,19	39,82	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37,99	2,16	59,85	36,02	4,20	59,77	26,67	23,51	49,81	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31,67	1,80	66,53	30,04	3,51	66,46	22,88	20,16	56,96	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27,16	1,54	71,30	25,76	3,01	71,24	20,02	17,65	62,32	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23,77	1,35	74,88	22,55	2,63	74,82	17,81	15,69	66,50	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21,13	1,20	77,67	20,05	2,34	77,61	16,03	14,13	69,84	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19,02	1,08	79,90	18,05	2,11	79,85	14,57	12,85	72,58	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17,29	0,98	81,72	16,41	1,91	81,68	13,36	11,78	74,86	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15,85	0,90	83,25	15,04	1,76	83,20	12,34	10,87	76,79	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Apéndice II

Tabla II.2 Relación de componentes estudiada para la obtención de MEs con AEA como fase oleosa utilizando una mezcla (DME:ET) 2:1.

Diagrama pseudo-ternario de fases (2:1)																	
(95:5)			(90:10)			(80:20)			(70:30)			(60:40)			(50:50)		
%Smix	%AEA	%Agua	%Smix	%AEA	%Agua	%Smix	%AEA	%Agua	%Smix	%AEA	%Agua	%Smix	%AEA	%Agua	%Smix	%AEA	%Agua
86,32	4,59	9,09	81,80	9,12	9,08	72,74	18,18	9,09	63,41	27,56	9,04	54,55	36,39	9,06	47,78	47,48	4,73
79,12	4,21	16,67	74,99	8,36	16,65	66,68	16,67	16,66	58,15	25,27	16,57	50,02	33,37	16,61	45,62	45,34	9,04
73,04	3,88	23,08	69,22	7,72	23,06	61,55	15,38	23,06	53,70	23,34	22,96	46,19	30,81	23,01	43,65	43,38	12,97
67,82	3,61	28,57	64,28	7,17	28,55	57,16	14,29	28,56	49,88	21,68	28,43	42,90	28,61	28,49	41,84	41,58	16,58
63,30	3,37	33,33	60,00	6,69	33,31	53,35	13,33	33,32	46,57	20,24	33,18	40,05	26,71	33,24	40,18	39,93	19,90
59,34	3,16	37,50	56,25	6,27	37,48	50,02	12,50	37,48	34,97	15,20	49,83	30,05	20,05	49,90	38,64	38,40	22,96
55,85	2,97	41,18	52,95	5,90	41,15	47,07	11,77	41,16	27,99	12,17	59,84	28,63	19,09	52,28		-	
52,75	2,81	44,45	50,01	5,57	44,42	44,46	11,11	44,43	26,92	11,70	61,38	27,33	18,23	54,45		-	
49,97	2,66	47,37	47,38	5,28	47,34	42,12	10,53	47,35	25,93	11,27	62,81		-			-	
47,47	2,53	50,00	45,01	5,02	49,98	40,02	10,00	49,98		-			-			-	
37,98	2,02	60,00	36,01	4,01	59,98	35,57	8,89	55,54		-			-			-	
31,65	1,68	66,67	30,01	3,35	66,64	32,02	8,00	59,98		-			-			-	
27,13	1,44	71,43	25,72	2,87	71,41	26,68	6,67	66,65		-			-			-	
23,74	1,26	75,00	22,51	2,51	74,98	22,87	5,72	71,41		-			-			-	
21,10	1,12	77,78	20,01	2,23	77,76	20,01	5,00	74,99		-			-			-	
18,99	1,01	80,00	18,01	2,01	79,98	17,79	4,45	77,77		-			-			-	
17,26	0,92	81,82	16,37	1,83	81,80	16,01	4,00	79,99		-			-			-	
15,82	0,84	83,33	15,01	1,67	83,32	14,55	3,64	81,81		-			-			-	
	-			-		13,34	3,33	83,32		-			-			-	

Tabla II.3 Relación de componentes estudiada para la obtención de MEs con AEA como fase oleosa utilizando una mezcla (DME:ET) 3:1.

Diagrama pseudo-ternario de fases (3:1)																	
(95:5)			(90:10)			(80:20)			(70:30)			(60:40)			(50:50)		
%Smix	%AEA	%Agua	%Smix	%AEA	%Agua	%Smix	%AEA	%Agua	%Smix	%AEA	%Agua	%Smix	%AEA	%Agua	%Smix	%AEA	%Agua
90,41	4,84	4,76	81,85	9,10	9,05	72,85	18,11	9,04	63,71	27,25	9,04	54,83	36,14	9,03	47,78	47,48	4,73
82,56	4,42	13,03	75,05	8,34	16,60	66,81	16,61	16,58	58,43	25,00	16,58	50,29	33,15	16,56	45,62	45,34	9,04
75,96	4,06	19,98	69,30	7,70	23,00	61,69	15,34	22,97	53,96	23,08	22,96	46,45	30,61	22,94	43,65	43,38	12,97
70,34	3,76	25,90	64,37	7,16	28,48	57,30	14,25	28,45	50,12	21,44	28,44	43,15	28,44	28,42	41,84	41,58	16,58
63,31	3,39	33,30	60,09	6,68	33,23	53,50	13,30	33,20	46,79	20,02	33,19	40,28	26,55	33,16	40,18	39,93	19,90
59,36	3,18	37,47	56,34	6,26	37,39	50,17	12,47	37,36	43,88	18,77	37,35	37,78	24,90	37,32	38,64	38,40	22,96
55,87	2,99	41,14	53,04	5,90	41,07	47,23	11,74	41,03	41,31	17,67	41,02	35,57	23,44	40,99	37,11	37,01	25,87
52,77	2,82	44,41	50,10	5,57	44,33	44,61	11,09	44,29	39,02	16,69	44,28		-			-	
49,99	2,67	47,33	47,47	5,28	47,26	42,27	10,51	47,22		-			-			-	
47,49	2,54	49,97	45,10	5,01	49,89	40,16	9,99	49,85		-			-			-	
45,23	2,42	52,35	42,96	4,78	52,27	38,26	9,51	52,23		-			-			-	
43,18	2,31	54,51	41,01	4,56	54,43	36,52	9,08	54,39		-			-			-	
41,30	2,21	56,49	39,23	4,36	56,41	34,94	8,69	56,37		-			-			-	
39,58	2,12	58,30	37,60	4,18	58,22	33,49	8,33	58,19		-			-			-	
38,00	2,03	59,97	36,10	4,01	59,89	32,15	7,99	59,85		-			-			-	
36,54	1,95	61,51	34,71	3,86	61,43	30,92	7,69	61,39		-			-			-	
35,19	1,88	62,93	33,43	3,72	62,86	29,78	7,40	62,82		-			-			-	
33,93	1,82	64,25	32,24	3,58	64,18	28,71	7,14	64,15		-			-			-	
32,76	1,75	65,49	31,13	3,46	65,41	27,73	6,89	65,38		-			-			-	
31,67	1,69	66,64	30,09	3,34	66,57	26,80	6,66	66,53		-			-			-	
30,65	1,64	67,71	29,12	3,24	67,64	25,94	6,45	67,61		-			-			-	
29,69	1,59	68,72	28,21	3,14	68,65	25,13	6,25	68,62		-			-			-	
28,79	1,54	69,67	27,36	3,04	69,60	24,37	6,06	69,57		-			-			-	

Apéndice II

27,95	1,49	70,56	26,55	2,95	70,49	23,66	5,88	70,46	-	-	-
27,15	1,45	71,40	25,80	2,87	71,34	22,98	5,71	71,30	-	-	-
23,76	1,27	74,97	22,58	2,51	74,91	20,11	5,00	74,89	-	-	-
21,12	1,13	77,75	20,07	2,23	77,70	17,88	4,45	77,67	-	-	-
19,01	1,02	79,98	18,06	2,01	79,93	16,10	4,00	79,90	-	-	-
17,28	0,92	81,80	16,42	1,83	81,75	14,63	3,64	81,73	-	-	-
15,84	0,85	83,31	15,06	1,67	83,27	13,42	3,34	83,25	-	-	-

Apéndice III - PRODUCTIVIDAD DE LA TESIS

TRABAJOS PUBLICADOS

- ✚ “**Octyl p-methoxycinnamate loaded microemulsion based on Ocimum basilicum essential oil. Characterization and analytical studies for potential cosmetic applications**”. Verónica Volpe, Danielle Silva Nascimento, Matías Insausti, Marcos Grünhut. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 546 (2018) 285-296.
- ✚ “**Photolysis study of octyl p-methoxycinnamate loaded microemulsion by molecular fluorescence and chemometric approach**”. Danielle Silva Nascimento, Matías Insausti, Beatriz Susana Fernández Band, Marcos Grünhut. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 191 (2018) 277–282.

TRABAJOS ENVIADOS PARA SU PUBLICACIÓN

- ✚ “**On line kinetic analysis of permeation profiles for UV filter loaded microemulsions using synchronous fluorescence spectroscopy assisted by partial least squares**”. Danielle Silva do Nascimento, Verónica Volpe, Matías Insausti, Marcos Grünhut. (*preparado para enviar*)
- ✚ “**In Situ quantification of octyl p-methoxycinnamate in oil-in-water microemulsions based delivery systems using confocal Raman spectroscopy assisted by chemometrics**”. Danielle Silva do Nascimento, Marcos Grünhut y Lorna Ashton. (*en redacción*)

PRESENTACIONES A CONGRESOS

- ✚ Participación en calidad de **AUTOR** en el “**10º Congreso Argentino de Química Analítica**”, desarrollado en Santa Rosa, en el mes de setiembre de 2019. El trabajo presentado en modalidad poster tuvo el título de “**Estudio de una microemulsión portadora de octil-metoxicinamato basado en el análisis multivariado de datos obtenidos por espectroscopía raman confocal**”. Autores del trabajo: Danielle Silva do Nascimento, Lorna Asthon, Marcos Grünhut.
- ✚ Participación en calidad de **AUTOR** en el “**9º Congreso Argentino de Química Analítica**”, desarrollado en Río Cuarto, en el mes de noviembre de 2017. El trabajo presentado en modalidad poster tuvo el título de “**Sistema automatizado para el estudio de permeación in vitro monitoreado por fluorescencia**”. Autores del trabajo: Danielle Silva do Nascimento, Verónica Volpe, Matías Insausti, Beatriz Fernández Band, Marcos Grünhut.
- ✚ Participación en calidad de **AUTOR** en el “**31º Congreso Argentino de Química**”, desarrollado en Buenos Aires, en el mes de octubre de 2016. El trabajo presentado en modalidad poster tuvo el título de “**Obtención, caracterización y estudio analítico de una microemulsión o/w portadora de un filtro químico solar y de acción biocida**”. Autores del trabajo: Verónica Volpe, Danielle Silva do Nascimento, Julia Raunicher, Matías Insausti, Beatriz S. Fernández. Band, Marcos Grünhut.
- ✚ Participación en calidad de **AUTOR** en el “**8vo Congreso Argentino de Química Analítica**”, desarrollado en La Plata, en el mes de noviembre de 2015. El trabajo presentado en modalidad poster tuvo el título de “**Obtención, caracterización y estudio analítico de una microemulsión portadora de filtros químicos solares**”. Autores del trabajo: Danielle Silva do Nascimento, Marcos Grünhut, Beatriz Fernández Band.

ESTADIAS EN EL EXTERIOR

- ✚ **Estancia de Investigación doctoral externa en el laboratorio de química Departamento de Química, Lancaster University, Reino Unido.** Directora: Dra. Lorna Ashton (Lecturer in Analytical Chemistry and Spectroscopy), Inglaterra. Duración: del 26 de junio de 2018 hasta 31 de diciembre de 2018.
- ✚ **Estancia de investigación doctoral externa en el Laboratorio de Química Analítica/Quimiometría (LAQA), Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, Brasil.** Enmarcada dentro del programa Programa de Proyectos Conjuntos de Investigación en el MERCOSUR, CAPES-SPU (PPCP 013/11). Directores: Dra. Beatriz Susana Fernandez Band, INQUISUR (UNS-CONICET), Argentina, y Prof. Dr. Mario Ugulino de Araújo, UFPB, Brasil. Duración: 45 días comprendidos entre julio y agosto de 2015.