



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Diseño y caracterización de un sistema liposomal para la administración transdérmica de un péptido sintético con fines cosméticos

Jorge Andrés Sandoval Arias

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia
Bogotá, Colombia

2015

Diseño y caracterización de un sistema liposomal para la administración transdérmica de un péptido sintético con fines cosméticos

Jorge Andrés Sandoval Arias

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Farmacéuticas

Director:

Químico Farmacéutico Ph. D., Profesor Jaiver Eduardo Rosas Pérez

Línea de Investigación:

Tecnología Farmacéutica

Grupos de Investigación:

Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas

Sistemas de Liberación Controlada de Moléculas Biológicamente Activas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia

Bogotá, Colombia

2015

A mi familia y a mi Chelita quienes me apoyaron incondicionalmente durante este proceso.

Agradecimientos

- Esta investigación fue desarrollada gracias al soporte financiero otorgado en la Convocatoria del Programa Nacional de Proyectos para el Fortalecimiento de la Investigación, la Creación y la Innovación en Posgrados de la Universidad Nacional de Colombia – Bogotá 2013-2015. Código del Proyecto: 19033.
- A los profesores del grupo Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas especialmente al profesor Jaiver Rosas quien me brindó su apoyo incondicional además de compartirme sus conocimientos.
- A los demás integrantes del grupo Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas especialmente a Alejandro Lara, gran apoyo, amigo y confidente.
- Al grupo de Sistemas de liberación Controlada de Moléculas Biológicamente Activas SILICOMOBA, en especial a la estudiante Lina Aponte
- A la profesora Marcela Aragón.
- A quienes va dedicado este trabajo así no sepan de que se trata.
- Y a Dios que me dio fuerza cuando ya no había.

Resumen

El Acetilhexapeptido-3 (Ac-EEMQRR-NH₂) es considerada una molécula con efecto anti-envejecimiento, cuya acción es similar a de la toxina botulínica. Su uso en formulaciones cosmecéuticas ha aumentado a pesar de que sus propiedades fisicoquímicas ponen en entredicho la capacidad de ser absorbido a través de la piel. Por tal motivo, en el presente trabajo se plantea el desarrollo de un sistema liposomal diseñado para su encapsulación, a fin de mejorar la capacidad de permear la piel después de la aplicación tópica. El péptido se obtuvo mediante síntesis química en fase sólida usando la estrategia Fmoc / tBu; se purificó utilizando extracción en fase sólida y luego se caracterizó por cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa y espectrometría de masas (MS-IT-TOF) y dicroísmo circular. Los sistemas liposomales vacíos y cargados con el péptido se prepararon utilizando el método de emulsión-evaporación del disolvente orgánico y se caracterizaron en lo referido al diámetro promedio de vesícula, potencial zeta y eficiencia de encapsulación. Finalmente, se realizó un ensayo preliminar *ex vivo*, con el fin de determinar la capacidad de permear la piel del péptido encapsulado frente al péptido en solución acuosa. Los resultados mostraron que es posible obtener péptidos cortos de manera eficiente, en relativamente poco tiempo y bajo costo, con un alto grado de pureza y rendimiento. Por otra parte, se evidenció el potencial del sistema liposomal desarrollado como una herramienta para la administración del neuropéptido sintetizado químicamente. Los resultados pueden ser considerados como un valioso aporte en el diseño y desarrollo de productos cosmecéuticos basados en péptidos sintéticos.

Palabras clave: Síntesis en fase sólida, péptidos sintéticos, microencapsulación, Liposomas, cosmecéuticos, envejecimiento.

Abstract

Acetylhexapeptide-3 is a molecule with anti-aging effect, which acts like the botulinum toxin. Its use in cosmeceutical formulations has been increasing in spite of its physicochemical properties, which do not allow the molecule to be easily absorbed by the skin. Therefore, in this paper we describe the peptide synthesis and the development a liposomal system designed for acetylhexapeptide-3 encapsulation, in order to improve the skin permeation ability after topical application. Peptide was synthesized by solid phase synthesis using the Fmoc/tBu strategy. The peptide was purified and characterized using RP-HPLC, ES-MS and DC. Empty liposomal and peptide loaded liposomal systems were prepared by reverse-phase evaporation vesicles methodology. Liposomal systems were physicochemical characterized for size, and zeta potential and the peptide encapsulation efficiency. Furthermore, in order to evaluate the transdermal permeability of encapsulated peptide versus its aqueous solution a preliminary *ex vivo* test using pig skin as model membrane was performed. Our results showed that it is possible to obtain short synthetic peptides by SPPS methodology with high purity degree and high yield, besides low-cost and fast. On the other hand, these results showed a potential delivery liposomal system for chemically synthesized neuropeptide in the as cosmeceutical development.

Keywords: Solid Phase Synthesis, synthetic peptides, microencapsulation, liposomes, cosmeceuticals, skin aging.

Contenido

	Pág.
Agradecimientos	VII
Resumen	IX
Abstract.....	X
Contenido	XI
Lista de figuras.....	XIII
Lista de tablas	XV
Lista abreviaturas.....	XVII
Introducción	19
1 Aspectos relevantes	21
1.1 Cosmecéuticos	21
1.1.1 Clasificación.....	23
1.1.2 Péptidos en cosmecéuticos.....	25
1.2 Acetilhexapéptido-3	26
1.2.1 Unión Neuromuscular.....	27
1.2.2 Secuencia de péptido.....	28
1.3 Proteínas y péptidos	31
1.3.1 Síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS)	34
1.3.2 Purificación de péptidos	41
1.3.3 Caracterización y cuantificación de péptidos.....	43
1.4 La vía transdérmica	45
1.4.1 El estrato corneo.....	46
1.4.2 Permeación de principios activos a través de la piel	48
1.5 Liposomas	51
1.5.1 Caracterización física.....	51
1.5.2 Composición química.....	53
1.5.3 Liposomas flexibles.....	56
1.5.4 Elaboración de liposomas	59
2 Obtención y caracterización de acetilhexapéptido-3.....	63
2.1 Introducción	63
2.2 Materiales, equipos y métodos	64
2.2.1 Materiales	64
2.2.2 Equipos.....	64

2.2.3	Métodos.....	64
2.3	Presentación y discusión de resultados.....	67
2.3.1	Síntesis del péptido	67
2.3.2	Proceso de purificación.....	70
2.3.3	Caracterización del péptido.....	73
3	Diseño del sistema liposomal.....	74
3.1	Introducción.....	74
3.2	Materiales, equipos y métodos	75
3.2.1	Materiales	75
3.2.2	Equipos.....	75
3.2.3	Métodos.....	75
3.3	Presentación y discusión de resultados.....	79
3.3.1	Ensayos preliminares.....	79
3.3.2	Obtención y caracterización de liposomas	81
3.3.3	Efecto de los variables independientes sobre las variables respuesta	83
4	Encapsulación de acetilhexapéptido-3 en liposomas	86
4.1	Introducción.....	86
4.2	Materiales, equipos y métodos	86
4.2.1	Materiales	86
4.2.2	Equipos.....	86
4.2.3	Métodos.....	87
4.3	Presentación y discusión de resultados.....	93
4.3.1	Preparación de acetilhexapéptido-3 en liposomas	93
4.3.2	Aislamiento de Liposomas	94
4.3.3	Efecto del proceso de homogenización por sonicación.....	97
4.3.4	Ensayos preliminares de permeación <i>ex vivo</i>	102
4.3.5	Eficiencia de encapsulación cuantificada con micro BCA.	105
5	Conclusiones y recomendaciones	108
5.1	Conclusiones.....	108
5.2	Recomendaciones.....	109
A.	ANEXO: ANOVA para liposomas vacíos	110
B.	Anexo: ANOVA evaluación del efecto de la encapsulación del péptido	111
C.	ANEXO: ANOVA para la evaluación del efecto del proceso de sonicación y la formulación en variables respuesta	112
	Bibliografía	114

Lista de figuras

Figura 1-1:	Panorama general de los productos usados para el beneficio de la piel.	22
Figura 1-2:	Estructura química de acetilhexapéptido-3.	27
Figura 1-3:	Proceso de liberación de la ACo de la neurona.	28
Figura 1-4:	Acetilhexapéptido-3 derivado del extremo N-terminal de la SNAP-25.	29
Figura 1-5:	Ensayos A) <i>in vitro</i> , inhibición de exocitosis de catecolamina por acción de diferentes péptidos y B) <i>in vivo</i> , atenuación de las líneas de expresión en el rostro de mujeres voluntarias.	30
Figura 1-6:	Estructura general de un α -aminoácido.	32
Figura 1-7:	Formación del enlace peptídico.	33
Figura 1-8:	Representación secuencial de un péptido.	33
Figura 1-9:	Primeras síntesis de dipéptidos.	35
Figura 1-10:	a. Sentido del proceso máximo en SPPS. b. Estructura de un AA utilizado en la SPPS con los grupos protectores.	37
Figura 1-11:	Etapas de la SPPS con los AAs previamente activados.	38
Figura 1-12:	Grupos protectores del grupo amino.	39
Figura 1-13:	Mecanismo de reacción en la desprotección de AAs con grupo Fmoc.	39
Figura 1-14:	A) Fotografía de la superficie de piel desnuda de ratón de (200 x 200 μm^2) utilizando CLSM en modo fluorescente. B) Estructura típica de la epidermis.	47
Figura 1-15:	Medicamentos transdérmicos aprobados por la FDA desde 1979.	49
Figura 1-16:	Algunos métodos y estrategias utilizadas para aumentar la permeación de fármacos a través de la piel.	51
Figura 1-17:	Tipos de liposomas según sus características físicas.	53
Figura 1-18:	Estructura de algunos glicerofosfolípidos.	54
Figura 1-19:	Posibles mecanismos de acción de los liposomas como sistemas de liberación de PA's en la piel.	57
Figura 1-20:	Deformación de los liposomas flexibles durante la penetración a través de los poros intercelulares.	59
Figura 1-21:	Diagrama de formación de liposomas REV.	61
Figura 2-1:	Proceso de purificación de péptidos sintéticos mediante RP-SPE.	66
Figura 2-2:	A) Tiempo requerido en las reacciones de desprotección empleando las dos técnicas y B) ciclos necesarios para completar las reacciones de acople.	68
Figura 2-3:	Perfiles cromatográficos de los péptidos a) crudo, b) fracción de baja pureza y c) fracción de alta pureza de la síntesis 2.	71
Figura 2-4:	Espectro resultado de análisis MS-IT-TOF con inyección directa de la fracción de mayor pureza de la síntesis 2.	72

Figura 2-5:	Espectro de DC de la fracción de alta pureza de la síntesis 3.	73
Figura 3-1:	Mediciones de diámetro promedio de A) F1, B) F2, C) F3 y D) F4	85
Figura 4-1:	Proceso de Diafiltración de liposomas cargados. Al final son obtenidos el filtrado (a) y el sedimento (b).....	89
Figura 4-2:	Efecto del de tiempo homogenización por ultrasonido en la eficiencia de encapsulación (EE) del acetilhexapéptido-3 en los sistemas liposomales.....	96
Figura 4-3:	Efecto del tiempo homogenización por ultrasonido en la cantidad de Acetilhexapéptido-3 en los sistemas liposomales.....	97
Figura 4-4:	Relación del diámetro promedio de los sistemas liposomales cargados (FP1-FP6) en función del tiempo de homogenización por ultrasonido.....	98
Figura 4-5:	Relación del índice de polidispersidad (PDI) de los sistemas liposomales cargados (FP1-FP6) en función del tiempo de homogenización por ultrasonido..	99
Figura 4-6:	Efecto de del proceso de sonicación en la distribución de tamaño en la FP3-0, FP3-45 y FP3-135.	100
Figura 4-7:	Membranas de piel de cerdo. A) orejas frescas lavadas. B) proceso de desengrasado. C) membranas obtenidas D) medición del espesor.....	103
Figura 4-8:	Porcentaje de liberación acumulada de acetilhexapeptido-3 desde la formulación de liposomas flexibles (FP1) y desde solución de PBS, a través de membrana de piel de cerdo.....	104
Figura 4-9:	Curvas obtenidas de A) albumina en rango de linealidad con la misma concentración de péptido y B) una concentración 4 veces mayor de péptido	106

Lista de tablas

Tabla 1-1:	Clasificación de algunos productos farmacéuticos con aplicación cosmética en diferentes países.	23
Tabla 1-2:	Datos importantes en el desarrollo de la SPPS.	36
Tabla 1-3:	Dianas biológicas de algunos productos aplicados sobre la piel.	45
Tabla 1-4:	Efecto de la naturaleza de las moléculas anfífilas en la estructura de los agregados formados.....	52
Tabla 2-1:	Comparación general entre la síntesis convencional y las asistidas con microondas	68
Tabla 2-2:	Péptido obtenido en las 4 diferentes síntesis.	69
Tabla 2-3:	Programa de purificación para el acetilhexapéptido-3 mediante RP-SPE..	70
Tabla 3-1:	Variables independientes contempladas en el diseño experimental.	76
Tabla 3-2:	Unidades experimentales del diseño 2^3	76
Tabla 3-3:	Combinaciones de tratamientos para el diseño 2^3	77
Tabla 3-4:	Matriz de tratamientos para las unidades experimentales.	78
Tabla 3-5:	Formulaciones empleadas en el desarrollo del sistema liposomal.....	78
Tabla 3-6:	Emulsiones formadas para determinar la cantidad mínima de PC.....	80
Tabla 3-7:	Condiciones fijas en el desarrollo de los experimentos.	81
Tabla 3-8:	Resultados de la caracterización de los liposomas.....	82
Tabla 3-9:	Variables dependientes en el diseño factorial fraccionado 2^{3-1}	83
Tabla 3-10:	Estimación de los efectos de cada factor con la suma de cuadrados. ...	83
Tabla 3-11:	ANOVA para el diámetro promedio.....	84
Tabla 3-12:	ANOVA para el PDI.	84
Tabla 3-13:	ANOVA para el Potencial zeta.	84
Tabla 4-1:	Formulaciones realizadas para la encapsulación de acetilhexapéptido-3 en liposomas.	88
Tabla 4-2:	Variables independientes contempladas en el diseño experimental para encapsulación del péptido.	91
Tabla 4-3:	Matriz de tratamientos para cada unidad experimental en la encapsulación del péptido.	92
Tabla 4-4:	Tabla comparativa de la caracterización entre los liposomas vacíos (F1 - F6) y liposomas cargados (FP1-0 – FP6-0).....	94
Tabla 4-5:	Resultados de ensayo de recuperación del péptido en el sistema de purificación empleado.....	95
Tabla 4-6:	Resultados de caracterización de los sistemas liposomales elaborados .101	

Tabla 4-7: Datos del análisis por HPLC de la de la última muestra tomada del compartimento receptor de las celdas de Franz con la FP1.....	104
Tabla 4-8: Absorbancias obtenidas con micro BCA de los filtrados de diferentes formulaciones.....	105

Lista abreviaturas

Abreviatura Término

<i>ACo</i>	Acetilcolina
<i>API</i>	Agua para Inyección
<i>Chol</i>	Colesterol
<i>CLSM</i>	Microscopía Confocal Láser de Barrido
<i>HPLC</i>	Cromatografía líquida de alta eficiencia
<i>P</i>	Coefficiente de reparto octanol/agua
<i>PA</i>	Principio activo
<i>PC</i>	Fosfatidilcolina
<i>PDI</i>	Índice de Polidispersidad
<i>PL</i>	Fosfolípido
<i>REV</i>	Inversión de fase por evaporación
<i>RP-HPLC</i>	Cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa
<i>SC</i>	Estrato corneo
<i>SPPS</i>	Síntesis de péptidos en fase sólida
<i>RP-SPE</i>	Extracción el Fase Sólida en fase reversa
<i>UV</i>	Luz ultravioleta
<i>tBo</i>	Toxina Botulínica
<i>TA</i>	Temperatura ambiente
<i>AC</i>	Agitación constante

Abreviatura Término

<i>DCM</i>	Diclorometano
<i>DMF</i>	Dimetilformamida
<i>DCC</i>	Diciclohexilcarbodimida
<i>μL</i>	Microlitros
<i>μm</i>	Micrómetros
<i>S</i>	Segundos
<i>Min</i>	Minutos
<i>Arg</i>	Arginina
<i>Gln</i>	Glutamina
<i>Glu</i>	Ácido Glutámico
<i>HOBt</i>	Hidroxibenzotriazol
<i>TFA</i>	Ácido trifluoroacético
<i>TIS</i>	Triisopropilsilano
<i>ACN</i>	Acetonitrilo
<i>IPA</i>	Isopropanol
<i>Fmoc</i>	Fluorenilmetiloxycarbonil
<i>tBu</i>	Terbutoxicarbonil
<i>MS-IT-TOF</i>	Espectrometría de masas con analizadores de trampa de iones y tiempo de vuelo
<i>DC</i>	Dicroísmo circular
<i>PBS</i>	Buffer de fosfatos pH=7,4
<i>MLV</i>	Vesícula multilamelar grande
<i>LUV</i>	Vesícula unilamelar grande
<i>SUV</i>	Vesícula unilamelar pequeña
<i>CMC</i>	Concentración micelar crítica

Introducción

La globalización y los avances tecnológicos hacen que en el mundo moderno las personas estén constantemente interconectadas y posean fácil acceso a todo tipo de información. Los medios de comunicación actúan como una plataforma en donde se exponen productos de forma atractiva, utilizando estrategias efectivas. En un contexto farmacéutico, una de ellas es mostrar estándares de belleza asociados a productos que prometen cambios radicales en la apariencia de sus consumidores; estos productos son los cosméticos, que aunque han sido utilizados durante miles de años, en la actualidad presentan un crecimiento exponencial que muestra diariamente la salida al mercado de un sin número de productos, que “prometen” diversidad de efectos. De igual manera existe una tendencia a la modificación de estos productos, enriqueciéndolos con características de funcionalidad en donde se incorporan sustancias con una actividad biológica pero que su uso no exhibe una actividad terapéutica propiamente dicha. Estos son los cosméticos funcionales o *cosmecéuticos* cuyas formulaciones contienen sustancias activas como antioxidantes, aclarantes, vitaminas, factores de crecimiento, antiinflamatorios, y en ciertos casos una importante participación de los péptidos y algunas proteínas, que en acuerdo a su biocompatibilidad, biodegradabilidad y eficiencia a muy bajas dosis, se han venido constituyendo en las moléculas activas de elección para el desarrollo de sistemas farmacéuticos de novedosos.

La evidente importancia de los péptidos y las proteínas en los procesos biológicos generó el interés por obtener cantidades suficientes para investigar sus propiedades, y evaluar su potencial aplicación terapéutica. A principios del siglo XX se reportaron resultados en cuanto al aislamiento y purificación de proteínas a partir de fuentes naturales, lo que llevó a la aprobación para uso clínico de los primeros principios activos (PAs) como la insulina (1). Paralelamente en esa primera mitad de siglo se realizaron investigaciones sobre la síntesis química de péptidos la cual se realizaba únicamente en solución. En la década de los 60 se inició la tendencia biotecnológica que permitiría controlar las funciones

celulares de microorganismos para la producción de proteínas. Estas tres estrategias (aislamiento y purificación, síntesis y técnicas recombinantes) presentan tanto ventajas como desventajas, pero la síntesis química es la metodología más apropiada para obtención de moléculas peptídicas con alta pureza y buen rendimiento. Adicionalmente es la única metodología mediante la cual es posible realizar modificaciones químicas en la secuencia de los péptidos e incluso incorporar aminoácidos no naturales (2), siendo especialmente útil para obtener secuencias de no más de 20 aminoácidos (AA) (1). Los péptidos utilizados como moléculas activas en productos cosmeceúticos, son por lo general de no más de 10 AA por lo que la síntesis química y más específicamente la síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) es la metodología más adecuada para su obtención.

Normalmente las moléculas peptídicas debido a sus propiedades fisicoquímicas no presentan una adecuada permeabilidad a través de la piel (3) y teniendo en cuenta que éste sería el principal mecanismo mediante el cual los péptidos cumplirían su función, superar esta limitación se ha convertido en un desafío para los desarrolladores de productos quienes han tenido que apoyarse en la investigación de diversas tecnologías farmacéuticas. Una de las estrategias exploradas, principalmente en el campo de los medicamentos, ha sido el uso de sistemas de liberación modificados con diferentes características. Tal es el caso de los sistemas liposomales, que son estructuras obtenidas del autoensamblaje molecular las sustancias anfifílicas como los fosfolípidos (PLs) como dispersión acuosa, los cuales han demostrado mejorar el paso de moléculas activas a través de la piel (4); adicionalmente por sí mismos, los liposomas mejoran la apariencia de la piel actuando como potentes agentes humectantes y también incrementan su elasticidad (5).

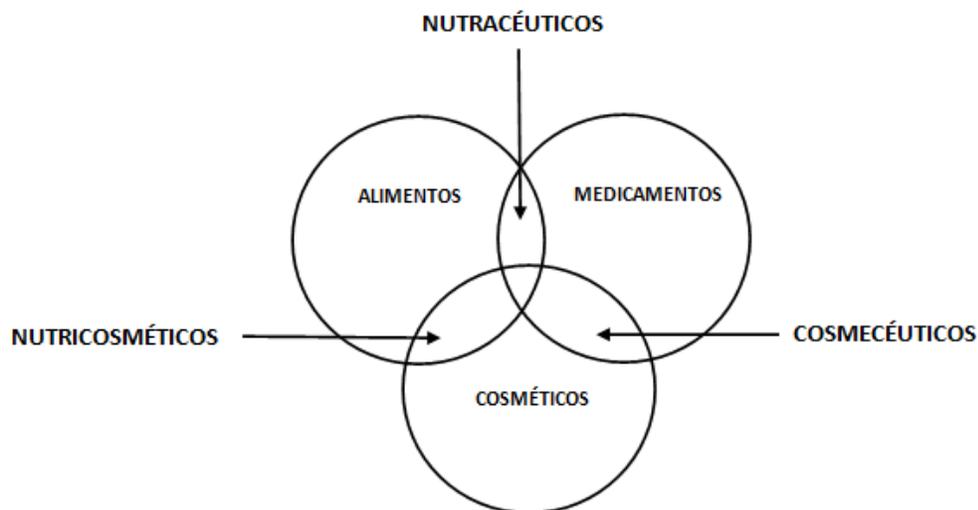
El propósito del presente trabajo de investigación fue sintetizar y caracterizar el acetilhexapéptido-3 (Ac-EEMQRR-NH₂) mediante SPPS para posteriormente desarrollar un sistema liposomal que permita su microencapsulación. Cada uno de los sistemas obtenidos se caracteriza en cuanto al diámetro promedio de vesícula, potencial zeta y eficiencia de encapsulación, para luego evaluar de manera preliminar su capacidad para incrementar la permeación del péptido a través de la piel.

1 Aspectos relevantes

El propósito del presente capítulo es realizar una descripción de los aspectos más importantes de la actual situación de los productos cosmecéuticos, basados en la utilización de moléculas peptídicas. Entre estas moléculas se hace relevancia al acetilhexapéptido-3 realizando una descripción general de sus propiedades y su mecanismo de acción. Por último se revisan algunos aspectos de la vía transdérmica, la cual sería la ruta más adecuada para que el péptido pueda alcanzar el sitio de acción y cumpla su función de disminuir la líneas de expresión del rostro.

1.1 Cosmecéuticos

La incorporación de nuevas moléculas a las formulaciones cosméticas clásicas con el propósito de obtener cada vez más beneficios para la piel, ha ayudado a varios fabricantes a satisfacer un número creciente de consumidores, ávidos por tratar de sosegar el efecto del tiempo en la apariencia de su piel, especialmente en el rostro. Esta estrategia, creada principalmente para dar valor agregado a una serie de productos, además de generar un importante crecimiento económico en el campo farmacéutico, provocó el surgimiento de algunos productos que no coinciden con las definiciones estrictas de cosmético o medicamento. Por esta razón surgió el término **cosmecéutico**, el cual fue propuesto por el dermatólogo Albert Kligman, quien en los 80's se dio cuenta de la peculiaridad híbrida de estos "cosméticos funcionales" (6). Sin embargo este fenómeno no se restringe únicamente a los cosméticos, ya que en la actualidad varios descriptores han tratado de agrupar nuevos "híbridos farmacéuticos" como se observa en la Figura 1-1. Los **nutracéuticos** se describen como bebidas y diferentes suplementos destinados a dar beneficios a la salud, mientras que los **nutricosméticos** son aquellos productos que al ser ingeridos pretenden mejorar fundamentalmente la apariencia de piel y cabello (7). Es el caso de Inneov®, producto desarrollado entre dos multinacionales, Nestlé y L'Oreal, destinado a detener la caída del cabello.

Figura 1-1: Panorama general de los productos usados para el beneficio de la piel (7).

Esta clasificación aunque innovadora y atractiva (especialmente desde el punto de vista de marketing), ha sido rechazada por las agencias regulatorias más importantes del mundo, ya que su aceptación exigiría un cambio en las definiciones de cosmético y medicamento, o exigiría crear nuevas definiciones para cada híbrido (8). Mientras esto ocurre cada agencia regula estos productos de diferente manera como se muestra en la Tabla 1-1. Mientras en USA y Canadá muchos de estos híbridos son regulados como productos *OTC* (medicamentos de venta libre), en Europa son legislados como cosméticos y solamente en Japón se ha creado una nueva clase híbrida los *Quasi-drug* (casi medicamento) (8,9).

Aunque muchos cosmeceúticos son capaces de proporcionar tanto beneficios “terapéuticos” (mejoran el estado de ánimo) como cosméticos, la mayoría no presenta efectos biológicos importantes debido a que su aplicación no permite que se alcancen concentraciones influyentes de sustancias principalmente a nivel sistémico. Las confusiones que se pueden derivar de estos términos son tales, que se podría confundir un medicamento dermatológico como una loción de Minoxidil al 5% con un cosmeceútico (10). Así mismo, si los cosmeceúticos son regulados únicamente como cosméticos, muchas de las bondades y la actividad comunicada al usuario en el proceso de marketing, no son verificadas por los entes regulatorios, ya que en el momento de avalar un cosmético al mercado no se exigen pruebas rigurosas de seguridad y eficacia requeridas para los medicamentos (6), aunque algunos fabricantes realizan ensayos *in vitro* o pequeños ensayos clínicos para demostrar su eficacia (6). Por tanto se debe

enfocar el término cosmeceútico a aquellos productos de uso t3pico, con mol3culas que tienen un efecto biol3gico sin un beneficio terap3utico dado, m3s no incluyen productos de prescripci3n m3dica que tienen f3rmacos que pueden acarrear beneficios cosm3ticos (8).

Tabla 1-1: Clasificaci3n de algunos productos farmac3uticos con aplicaci3n cosm3tica en diferentes pa3ses (9).

Producto	Mercado			
	U. Europea	USA	Jap3n	Canad3
Jab3n para las manos	Cosm3tico	Cosm3tico	Cosm3tico	Cosm3tico
L3piz labial	Cosm3tico	Cosm3tico	Cosm3tico	Cosm3tico
Protector solar	Cosm3tico	OTC	Cosm3tico	Medicamento sin receta
Loci3n anti-acn3	Producto Medicinal	OTC	<i>Quasi-drug</i>	Medicamento sin receta
Pasta dent3frica anti-carries	Cosm3tico	OTC	<i>Quasi-drug</i>	Medicamento sin receta
Antitranspirante	Cosm3tico	OTC	<i>Quasi-drug</i>	Medicamento sin receta
Tinte de pelo	Cosm3tico	Cosm3tico	<i>Quasi-drug</i>	Cosm3tico

1.1.1 Clasificaci3n

Los avances en tecnolog3a farmac3utica y cosm3tica, y la invenci3n de nuevos ingredientes causaron una evoluci3n desde los primeros cosm3ticos que trataban de embellecer limit3ndose a agregar color a la piel, hasta la actualidad, donde se habla de **cosm3tico funcional** como una categor3a que se podr3a considerar sin3nimo de los **cosmeceúticos**. Tambi3n se usan t3rminos como **neurocosm3ticos** que son aquellos que al ser aplicados dan una sensaci3n de bienestar mental y pueden ser tanto cosm3ticos tradicionales como cosmeceúticos. A continuaci3n se reporta una serie de productos clasificados por la FDA como cosm3ticos, los cuales contienen ingredientes novedosos y reconocidos en el campo de los cosmeceúticos (8,10). Esta clasificaci3n se presenta de acuerdo a la funci3n del PA en diversas formulaciones y var3a seg3n cada autor, ya que no existe un listado estandarizado. En este contexto, se decide tratar en un apartado independiente a los p3ptidos, con el prop3sito de revisar el tema de una manera m3s detallada.

1.1.1.1 Antioxidantes

A medida que la piel envejece, las cantidades de antioxidantes presentes como la coenzima Q10 y el escualeno, disminuyen. Por tanto se han ideado cremas con derivados de la Q10 como la ubiquinona y la idebenona, aunque algunos estudios han demostrado que su uso no aumenta las concentraciones de coenzima Q10 en la piel. No obstante, antioxidantes como el ácido-alfa lipoico el cual no se encuentra naturalmente en la piel y que es un potente *scavenger* para el oxígeno, ha demostrado tener efectos positivos en la apariencia de la piel tras 12 semanas de su aplicación, aunque con un efecto no muy pronunciado (11).

1.1.1.2 Vitaminas

Las vitaminas son compuestos esenciales en el funcionamiento del cuerpo humano. Aunque algunas pueden ser sintetizadas, muchas otras requieren ser ingeridas en la dieta entre las que se destacan las vitaminas A, B, C, E y K. Muchas de estas vitaminas han demostrado ser útiles tanto en el tratamiento como en la prevención del fotoenvejecimiento del rostro (12). Las vitaminas A y E actúan como antioxidantes naturales de tipo lipofílico y han sido incorporadas en cremas desde hace varios años. Recientemente vitaminas como la C que tiene carácter hidrosoluble, actúa como molécula *scavenger*, atrayendo radicales libres en los compartimientos celulares acuosos, donando electrones para neutralizar estas moléculas disminuyendo de esta manera el estrés oxidativo (12).

1.1.1.3 Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento más utilizados son hormonas como la kinetina, zetaina y pyratina 6 las cuales son obtenidas de plantas. Estas moléculas han demostrado en ensayos *in vitro* retrasar cambios asociados al envejecimiento mediante la prevención de la formación de células multinucleares y la desorganización de microtúbulos (13). Otros factores de crecimiento son proteínas que han demostrado ser efectivas participando en procesos de formación de nuevo colágeno, nueva elastina y la formación de glicosaminoglicano mediante la angiogénesis. Se destacan en este grupo extractos de placenta humana, factor de crecimiento epidermal recombinante y los factores plaquetarios (6).

1.1.1.4 Aclarantes de la piel

El aclarante más reconocido desde tiempos ancestrales ha sido el ácido kójico que es obtenido de algunas especies de hongos *Aspergillus* y *Penicillium*. Es una de las sustancias más efectivas en el tratamiento de las manchas en la piel al inhibir la acción de la tirosinasa en el proceso de producción de la melanina (10).

Así mismo debido a la eliminación del ingrediente hidroquinona en los productos OTC Europeos, se buscó mantener el mercado con el uso de moléculas como ácido ascórbico, arbutina, aleosina y N-acetilglucosamina las cuales han mostrado propiedades despigmentantes importantes (14).

1.1.2 Péptidos en cosmecéuticos

Como se verá posteriormente, la interacción de secuencias específicas de aminoácidos derivadas de diversas proteínas es el mecanismo por el cual se regulan varios procesos en la piel, principalmente la modulación de la proliferación celular, la inflamación, la angiogénesis y la síntesis y regulación de proteínas. Por tanto, la creación de análogos peptídicos bioactivos que actúen en pro de mejorar la apariencia de la piel interviniendo principalmente en estos procesos, es uno de los focos más importantes de la industria farmacéutica encargada del cuidado de la piel. De esta manera se han diseñado péptidos vehiculizados en cosmecéuticos, destinados a actuar como sustancias antienvjecimiento mejorando de alguna forma la apariencia de la piel tras su administración tópica. Aunque muchos péptidos son descritos por el efecto que presentan tras su aplicación en la piel (15–17), a continuación se reporta una clasificación donde se trata de agrupar los péptidos por su mecanismo de acción en tres categorías.

1.1.2.1 Péptidos inhibidores enzimáticos

EL heptapéptido YVRADDA inhiben enzimas como la procolágeno C-proteasa, cuya función es escindir una parte de procolágeno tipo I, minimizando su destrucción (18). El acetiltetrapéptido-5 actúa inhibiendo la glicosilación del colágeno incrementando la permeabilidad vascular de líquidos, lo cual es muy útil en el tratamiento de las bolsas en los ojos (19).

1.1.2.2 Péptidos portadores

Estos péptidos estabilizan y entregan oligoelementos necesarios para la curación de heridas, procesos enzimáticos y la regeneración del colágeno en la piel (20). El tripéptido GHK ha demostrado ser un facilitador de cobre a las células, lo cual resulta ser beneficioso para la piel en procesos de cicatrización, remodelación dérmica y producción de colágeno (18). Este péptido también ha sido unido a grupos hidrocarbonados como el palmitoil, para mejorar su permeación cutánea y se ha administrado unido a iones cobre (15) y a iones manganeso (19).

1.1.2.3 Péptidos inhibidores de la neurotransmisión.

Son conocidos también como neuropéptidos y hasta el momento se han descrito dos mecanismos de acción para este tipo de moléculas. El acetilhexapéptido-3 tienen acción similar a la toxina botulínica, impidiendo la liberación de la acetilcolina (ACo), mientras que el pentapéptido-3 (Vialox®) actúa con un mecanismo análogo a la tubocurarina (19), inhibiendo competitivamente el receptor de ACo en la membrana postsináptica e impidiendo la contracción muscular (20).

1.2 Acetilhexapéptido-3

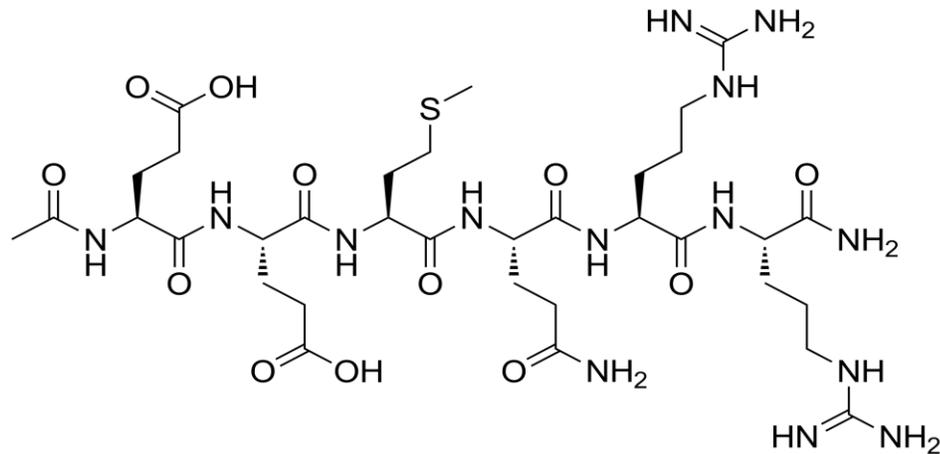
Como su nombre lo indica, corresponde a una secuencia de seis aminoácidos linealmente unidos: ácido glutámico- ácido glutámico- metionina- glutamina- arginina- arginina. El extremo amino se encuentra acetilado mientras que su extremo carboxi se encuentra como función amida (Figura 1-2). El péptido fue descubierto en la década de los 90's y ha sido producido y comercializado bajo el nombre Argireline® por la empresa española Lipotec (21). Tiene un peso molecular de 888,6 Da y tiene un Log P= -4,5 (reparto octanol/agua) (22), lo que no deja duda sobre su hidrofiliidad.

Para comprender el mecanismo de acción del acetilhexapéptido-3 es conveniente relacionarlo directamente con el proceso de liberación de ACo como se describe en el apartado siguiente.

1.2.1 Unión Neuromuscular

El músculo se contrae gracias a un estímulo nervioso enviado desde el sistema nervioso central (SNC). La terminal axónica desmielinizada de la neurona asociada a una región especial de la fibra muscular es lo que se conoce como placa motriz o región neuromuscular. La comunicación se realiza a través de mediadores químicos conocidos como neurotransmisores, de los cuales el más frecuente en este proceso es la ACo.

Figura 1-2: Estructura química de (Ac-EEMQRR-NH₂) acetilhexapéptido-3 (21).



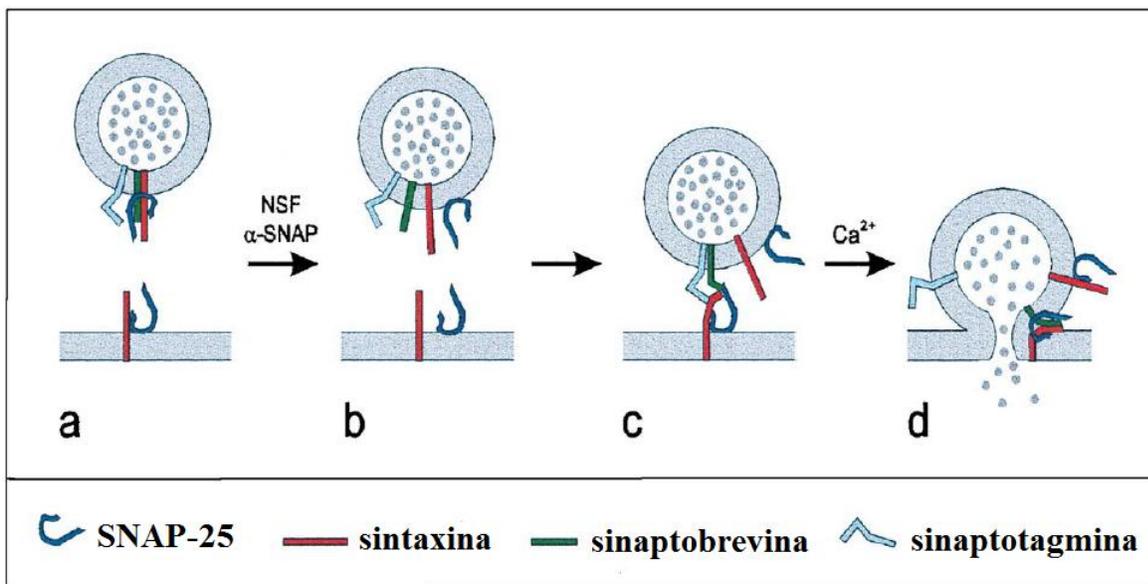
La ACo se sintetiza en el citoplasma neuronal y se libera a través de la membrana de la neurona hasta el espacio o hendidura sináptica, donde ejerce su función al activar los receptores de la membrana (23). La liberación es regulada por cambios en las concentraciones de iones Calcio (Ca²⁺), junto con la intervención de una serie de proteínas en el proceso descrito a continuación.

La ACo se produce a partir de colina y acetilcoenzima A, almacenándose en mayor proporción en las llamadas vesículas sinápticas, mientras que una pequeña fracción permanece en forma libre disuelta en el citosol (23). El proceso de liberación de la ACo se realiza desde las vesículas, cuando se fusionan con la membrana plasmática liberando su contenido (24).

La membrana vesicular presenta ancladas en su bicapa fosfolipídica cuatro proteínas (Figura 1-3), dos de las cuales (sinaptobrevina y sinaptotagmina) son exclusivas de esta estructura, mientras que las otras dos (SNAP-25 y syntaxina) se anclan también a la cara citoplasmática de la membrana plasmática de la neurona, donde es evidente la mayor proporción de la proteína SNAP 25. Antes de la fusión, se encuentra formado en la

membrana vesicular el complejo SNARE (Figura 1-3 a) que es la unión de 3 proteínas (SNAP-25, sintaxina, y sinaptobrevina). El proceso de liberación inicia cuando este complejo se disocia por acción de la proteína de fusión sensible a N-etilmaleimida (NSF) y la proteína α -SNAP (Figura 1-3 b). Posteriormente, algunos AAs en los extremos C-terminal de estas proteínas interactúan, generando una atracción entre de las dos membranas, produciendo un acople entre la vesícula cargada con ACo y la membrana celular (Figura 1-3 c). En el acople, se forma otro complejo proteico que es susceptible a disgregarse con la elevación de la concentración citoplasmática de Ca^{2+} lo cual induce la separación de la sinaptotagmina, estableciendo nuevamente el complejo SNARE que provoca la fusión de las membranas vesicular y plasmática causando la liberación de la ACo (Figura 1-3 d).

Figura 1-3: Proceso de liberación de la ACo de la neurona (24).



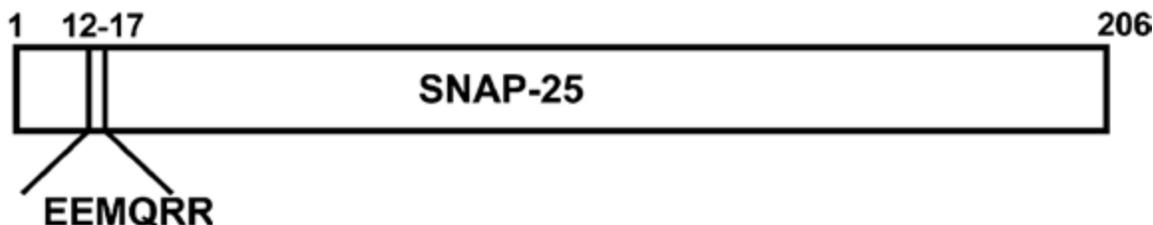
1.2.2 Secuencia de péptido

El descubrimiento de las toxinas *Clostridias*, las cuales actúan impidiendo la formación del propio complejo SNARE, ha contribuido al conocimiento de los mecanismos y entidades moleculares que intervienen en la maquinaria de la neuroexocitosis (25). La toxinas botulínicas (tBo) B, D, F y G actúan rompiendo la sinaptobrevina en diferentes sitios, las A y E rompen la proteína SNAP-25 en el extremo C-terminal, mientras que la tBo C rompe tanto la SNAP-25 como la Sintaxina (26). De cualquier manera al ser destruida alguna de estas proteínas, el proceso de formación del complejo SNARE no se

puede completar y la liberación de la ACo no es posible. Por esta razón las toxinas *Clostridias* interrumpen la neurotransmisión hacia la placa motriz paralizando los músculos inervados.

La SNAP-25 es una proteína de 206 AA (Figura 1-4) que ha sido ampliamente estudiada, entre otras razones, con el fin de encontrar moléculas efectivas para el desarrollo de nuevos cosmecéuticos. Se han probado fragmentos derivados de su secuencia sintéticamente obtenidos, para evaluar su efecto en el proceso de formación del complejo SNARE. De esta manera se han encontrado péptidos como el ESUPE, un péptido de 26 AA y el ESUPA de 20 AA, cuyas secuencias se derivan del extremo C-terminal de la proteína SNAP-25 (26,27) los cuales compiten de manera eficiente con la SNAP-25 durante el proceso de formación del complejo SNARE. Esta inhibición competitiva es totalmente reversible y depende de la concentración de los péptidos y de la SNAP-25 ya que a diferencia con la tBo, la proteína no se rompe o se destruye y en cualquier momento se podría alcanzar una concentración adecuada para reanudar el proceso de exocitosis, lo cual hace que la toxicidad de estos péptidos sean menores en comparación con la tBo.

Figura 1-4: Acetilhexapéptido-3 derivado del extremo N-terminal de la proteína SNAP-25 (28).



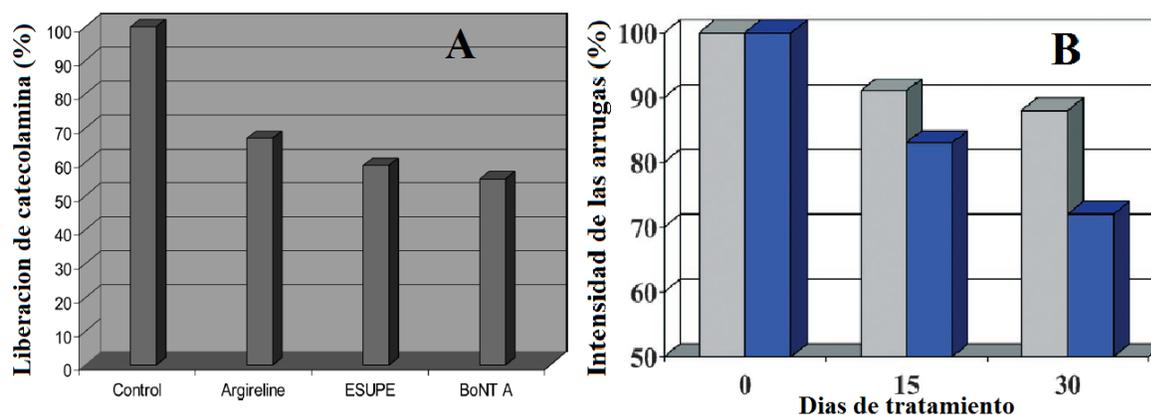
Aunque en ensayos *in-vitro* los péptidos derivados de la secuencia de la proteína SNAP-25 han mostrado ser eficientes evitando la neurotransmisión, moléculas tan grandes presentan dificultad para alcanzar la diana biológica cuando son aplicadas sobre la piel. Por esta razón la tBo comercializada como Botox®, que es bastante eficaz paralizando los músculos disminuyendo las líneas de expresión, debe ser administrada mediante inyección subcutánea. Posteriormente se evaluaron fragmentos derivados del extremo N-terminal y se encontraron secuencias más cortas con actividad similar, las cuales son actualmente comercializadas como el acetiloctatapéptido-3 (SNAP 8 ®) y la más descrita,

el acetilhexapéptido-3 el cual a veces es nombrado como acetilhexapéptido-8 (29), que corresponde a la secuencia Ac-EEMQRR-NH₂

Comparado con la tBo, el acetilhexapéptido-3 tiene una potencia 4000 veces menor (21) pero ha demostrado ser eficaz inhibiendo la contracción de los músculos encargados de la expresión de facial, disminuyendo de esta manera las líneas formadas por el movimiento repetitivo (30). Se han llevado a cabo ensayos *in-vitro* (28), donde una solución de acetilhexapéptido-3 (100 µM) inhibió en un 30% la liberación de catecolaminas, comparable a la inhibición del 45% obtenida con el péptido ESUPE (1µM) y la obtenida con la tBo A (BoNT A, 20 nM) que inhibe 50% de la exocitosis de neurotransmisores, como se observa en la Figura 1-5. Igualmente en ensayos clínicos se ha demostrado que el acetilhexapeptido-3 disminuye la intensidad de las líneas de expresión en un 30% (Figura 1-5) cuando fue administrado como una emulsión (28), mientras que en otros vehículos las ha disminuido hasta en un 48,9% (30). En ambos estudios se utilizó el péptido al 10% en el correspondiente vehículo y el tiempo de exposición fue de 30 días. Cabe resaltar que la concentración del péptido se considera muy elevada y es necesario tener en cuenta los costos de su síntesis.

De manera particular durante la revisión realizada para la elaboración del presente trabajo, no se encontraron reportes que hicieran referencia a estudios que revelen la capacidad del acetilhexapéptido-3 para permear la piel, la cual podría ser bastante limitada debido a sus propiedades fisicoquímicas.

Figura 1-5: Ensayos A) *in vitro*, inhibición de exocitosis de catecolamina por acción de diferentes péptidos y B) *in vivo*, atenuación de las líneas de expresión en el rostro de mujeres voluntarias después de la aplicación dos veces al día de acetilhexapeptido-3 administrado como emulsión (azul) frente a la emulsión sin péptido (gris) (28).



1.3 Proteínas y péptidos

Dentro de la vasta maquinaria biológica que permite la existencia de todos los seres vivos, es indiscutible el rol fundamental de las proteínas, que debido a su elevada complejidad en aspectos como composición y disposición estructural, presentan una amplia diversidad funcional que mantiene en vida las células y los organismos (31). El término proteína se deriva del griego “*proteuein*” que significa “el primero” y fue acuñado por Berzelius en 1838 para poner en manifiesto su “protagonismo biológico” (32). Sin embargo puede decirse que tanto las proteínas como los ácidos nucleicos comparten la misma importancia en las funciones metabólicas vitales de las formas vivientes actuales (31,32).

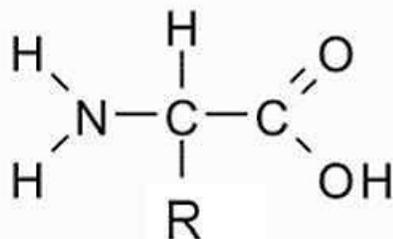
Las proteínas son macromoléculas formadas por AAs y a menudo incorporan en su estructura algunos otros componentes (33). Los AAs son moléculas que exhiben un átomo de carbono al cual se encuentra unido un grupo amino, un grupo carboxilo, una cadena lateral que cambia según el AA y un átomo de hidrogeno (Figura 1-6). Cientos de estructuras de AA naturales han sido descubiertas, sin embargo un AA proteinogénico se distingue por cumplir dos características fundamentales como el ser α -AA y además ser L-AA (excepto la glicina la cual no presenta carácter quiral). Las características y propiedades de cada uno de los AA están determinadas por la identidad del grupo R, que puede ser de carácter hidrófobo, polar cargado, polar no cargado, aromático, entre otros (32).

En una proteína los AA se unen entre sí, mediante enlaces peptídicos los cuales son enlaces tipo amida, el cual es producto de la reacción entre el grupo amino de un AA y el grupo carboxilo de otro. La secuencia de AA en una cadena peptídica se conoce como su *estructura primaria* y es la que va a determinar los elementos estructurales secundarios, terciarios y cuaternarios. La síntesis de las proteínas en la célula, es un proceso complejo realizado en los ribosomas mientras que la secuencia de los AA está dictada por el código genético. Por tanto esta secuencia proporciona tanto una huella digital molecular de la proteína para su identificación, como la información que puede usarse para identificar y clonar el gen o los genes que la codifican (34).

Además de la estructura primaria, una proteína exhibe otros niveles jerárquicos estructurales. La *estructura secundaria* es un plegamiento de partes localizadas del

polipéptido gobernada por puentes de hidrogeno; por tanto un único polipéptido puede exhibir múltiples estructuras secundarias a lo largo de la cadena (35).

Figura 1-6: Estructura general de un α -aminoácido (32).



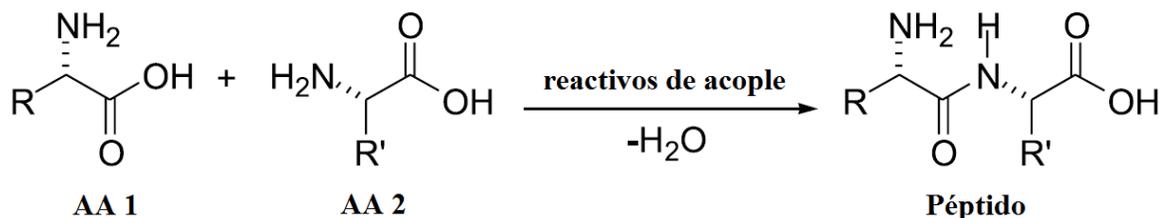
La *estructura terciaria* se refiere a la conformación tridimensional del polipéptido e indica de qué modo las estructuras secundarias del polipéptidos se disponen para formar *dominios*, los cuales son secciones de la proteína que desempeñan una tarea química, física o biológica particular (34). Eventualmente varios polipéptidos pueden formar una sola estructura proteica, mediante la formación de agregados moleculares dispuestos de una manera geométrica ordenada que corresponde a la *estructura cuaternaria* (33).

Por otra parte una secuencia definida de AA es llamada péptido cuando el número de AA es menor a 20 o 30 unidades. Las cadenas más largas de aminoácidos son llamadas polipéptidos, y aquellos polipéptidos (o complejo de polipéptidos) que tienen más de 4000 unidades de aminoácidos y que poseen una estructura tridimensional definida son propiamente proteínas (35). Sin embargo otros autores (36) clasifican los péptidos en oligopéptidos los cuales tienen menos de 10 AA, los polipéptidos son secuencias de mayor numero de AA, y aunque no está bien definido, se denominan proteínas a las moléculas de pesos moleculares superiores a 10.000 Dalton. De cualquier forma, además de las proteínas, algunos péptidos u oligopéptidos producidos en los organismos, desempeñan funciones muy importantes como en el sistema neuroendocrino en donde actúan como hormonas, factores liberadores de hormona, neuromoduladores, neurotransmisores, entre otros (34).

Una molécula peptídica se puede representar gráficamente como una cadena en donde cada AA se simboliza con una abreviatura de una o tres letras. La parte izquierda de la representación (Figura 1-7) muestra un primer AA que aporta su grupo carboxilo para formar el enlace peptídico con el grupo amino de un segundo AA, quedando libre su

grupo amino que en ciertas ocasiones puede estar provisto de diferentes grupos funcionales. A partir de esta región de la molécula denominada extremo **N-terminal**, se inicia la elongación de la cadena peptídica (Figura 1-8) que puede ser lineal o ramificada. El último AA de la secuencia aporta su grupo amino para la formación del enlace peptídico con el penúltimo aminoácido dejando su grupo carboxilo libre, el cual puede estar en forma de ácido (-COOH) representado con un -OH o en forma de amida (-CONH₂) representado con un -NH₂. No se debe confundir en la representación de una molécula peptídica el N-terminal con un grupo -NH₂ representado en la parte derecha de la molécula, ya que corresponde a el **extremo C-terminal** que se encuentra en su forma amida.

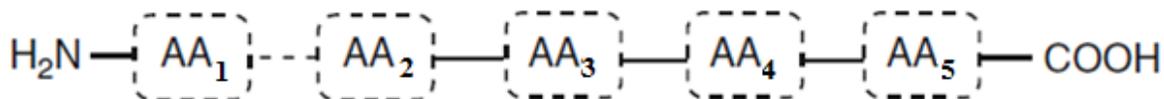
Figura 1-7: Formación del enlace peptídico (37).



El enfoque investigativo en el área de síntesis de péptidos se orienta a que los procesos biológicos mediados por proteínas, se llevan a cabo mediante su interacción con ligandos específicos. Esto permite que se puede realizar un desarrollo sistemático de un péptido sintético funcional luego de realizar los siguientes pasos: 1. Seleccionar regiones de la proteína. 2. Sintetizar las secuencias seleccionadas. 3. Realizar modificaciones a la secuencia si es necesario y 4. Evaluar y seleccionar las secuencias pépticas que presentan una respuesta similar o mejor en la formación del complejo con el ligando (38).

Por tanto, a partir de la elucidación estructural de una proteína se pueden sintetizar varios péptidos que posteriormente se evalúan en ensayos *in-vitro* y/o *in-vivo*. De esta forma es posible encontrar una molécula más “simple” con una actividad equivalente a la de la proteína nativa.

Figura 1-8: Representación secuencial de un péptido (39).



1.3.1 Síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS)

1.3.1.1 Antecedentes

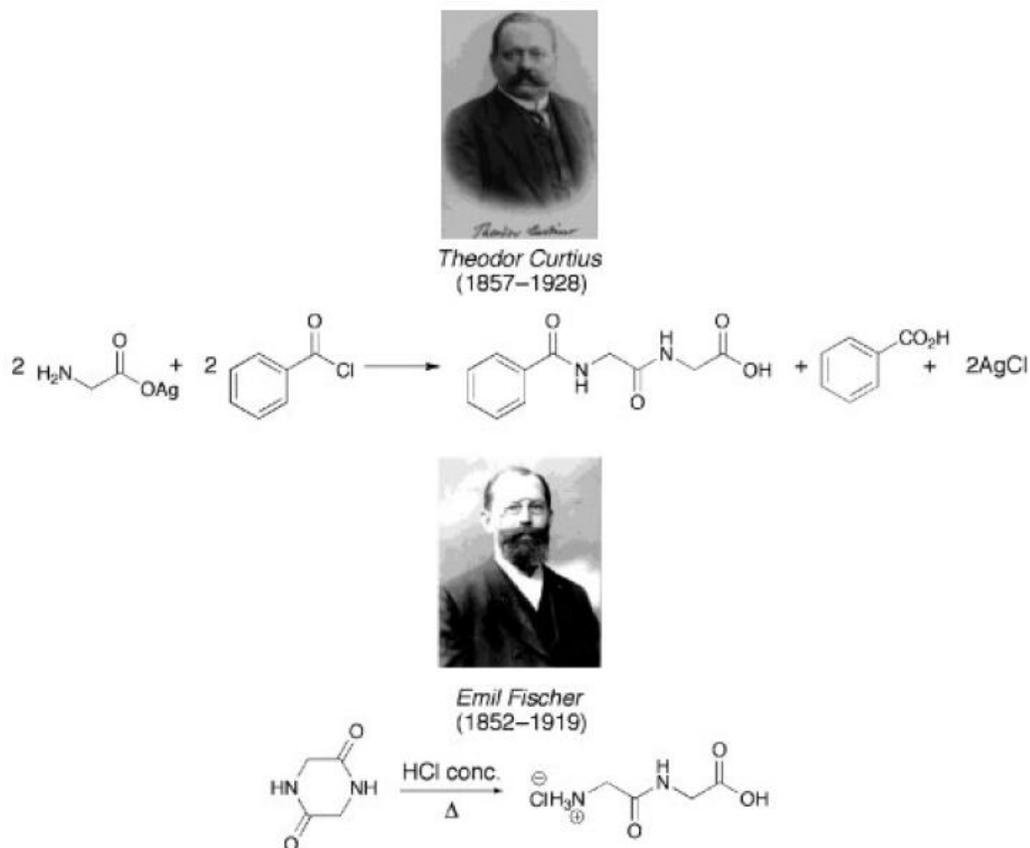
En 1901 se publicó el primer estudio sobre síntesis de péptidos en donde se describía la síntesis del péptido Glicina-Glicina a partir de diketopiperazina de glicina (Figura 1-9) cuyo autor fue Emil Fisher (2). Además de la obtención del dipéptido, el investigador enfocó sus estudios a las propiedades de proteínas y péptidos, llegando a confirmar que sus estructuras monoméricas consisten en unidades de aminoácidos unidos mediante enlaces tipo amida. Basados en estas conclusiones Fisher predijo que tanto péptidos como proteínas podrían ser sintetizados con los reactivos necesarios en las condiciones adecuadas (40). Sin embargo, 20 años antes (1881) durante su doctorado, el estudiante Theodor Curtius ya había conseguido la síntesis de un dipéptido N-prottegido (benzoilglicilglicina) utilizando el método de acople de azidas donde la sal de plata de glicina es tratada con cloruro de benzoilo (2,41).

Para poder sintetizar cadenas de AA más largas, se debían buscar soluciones a problemas inherentes del acople de los AA, de los cuales se destacan entre otros: 1. Proteger el grupo amino del AA para que no reaccione con uno de sus análogos y 2. Mantener la estereoquímica de la molécula durante las reacciones. Por tanto en 1931 Bergmann y Zervas obtuvieron buenos resultados protegiendo el grupo amino con el grupo Carbobenzoxi (Cbz) mientras que en 1957 Carpino, Mc Kay y Albert lidiaron con estos inconvenientes utilizando el grupo ter-Butoxicarbonil (41). Durante estos años se sintetizaron péptidos cortos (menos de 5 AA) utilizando estos grupos protectores (2). Pero fue hasta 1953 que Du Vigneau y Tuppy aislaron y purificaron de la glándula hipófisis, un octapéptido que luego sintetizaron y llamaron Oxitocina el cual se convirtió en el primer péptido sintético funcional obtenido (15). Este trabajo significó a Vincent Du Vigneau el Premio Nobel en 1955.

Hasta ese momento, la síntesis de péptidos se realizó únicamente mediante el método de síntesis en solución en donde las etapas de acople de AA y obtención final del péptido eran bastante engorrosas porque se debía hacer una serie de purificaciones al finalizar cada reacción. Pero el problema principal era que al aumentar el número de AA en la secuencia, las moléculas peptídicas tenían problemas de solubilidad (42). Estos inconvenientes fueron superados con el desarrollo de la SPPS. El artículo donde se reportó la invención (42) fue publicado el 31 de enero de 1963 por B. Merrifield, donde

mostró la síntesis de un tetrapéptido mostrando todas las etapas, detallando características de los reactivos, (incluyendo un soporte sólido) y reportando las cantidades utilizadas. Esta invención significaría para Merrifield el Premio Nobel en 1984.

Figura 1-9: Primeras síntesis de dipéptidos (2).



A partir de este trabajo realizado hace más de 50 años, muchos avances tecnológicos se han adaptado para optimizar el proceso de síntesis como se reporta en la Tabla 1-2. Se han desarrollado estrategias de acople, nuevos polímeros que actúan como soporte sólido, y un sinnúmero de reactivos con más ventajas que desventajas; incluso tecnologías como la radiación de microondas, se ha utilizado para optimizar las reacciones de acople y desprotección, en donde se disminuye el tiempo de reacción y se aumenta la eficiencia (43).

Tabla 1-2: Datos importantes en el desarrollo de la SPPS (41).

AÑO	DESCUBRIMIENTO
1901	Primera publicación de un dipéptido sintetizado
1957	Grupo protector BOC
1963	SPPS
1967	Clivaje con ácido fluorhídrico
1968	Primer sintetizador automático mediante SPPS
1970	Resina BHA
1970	Grupo protector Fmoc
1973	Resina Wang
1976	HPLC preparativa para purificación
1977	Protección ortogonal.
1987	Resina Rink
1987	Resina Sieber
1992	Protocolo <i>fast-Boc</i>
1994	Ligación química nativa en síntesis de péptidos y proteínas
1996	Pseudoprolinas

Adicionalmente por sus propiedades, la SPPS permitió la posibilidad de desarrollar sintetizadores automatizados (44) en donde el investigador manipula al mínimo los reactivos durante el proceso de síntesis.

1.3.1.2 Etapas de la SPPS

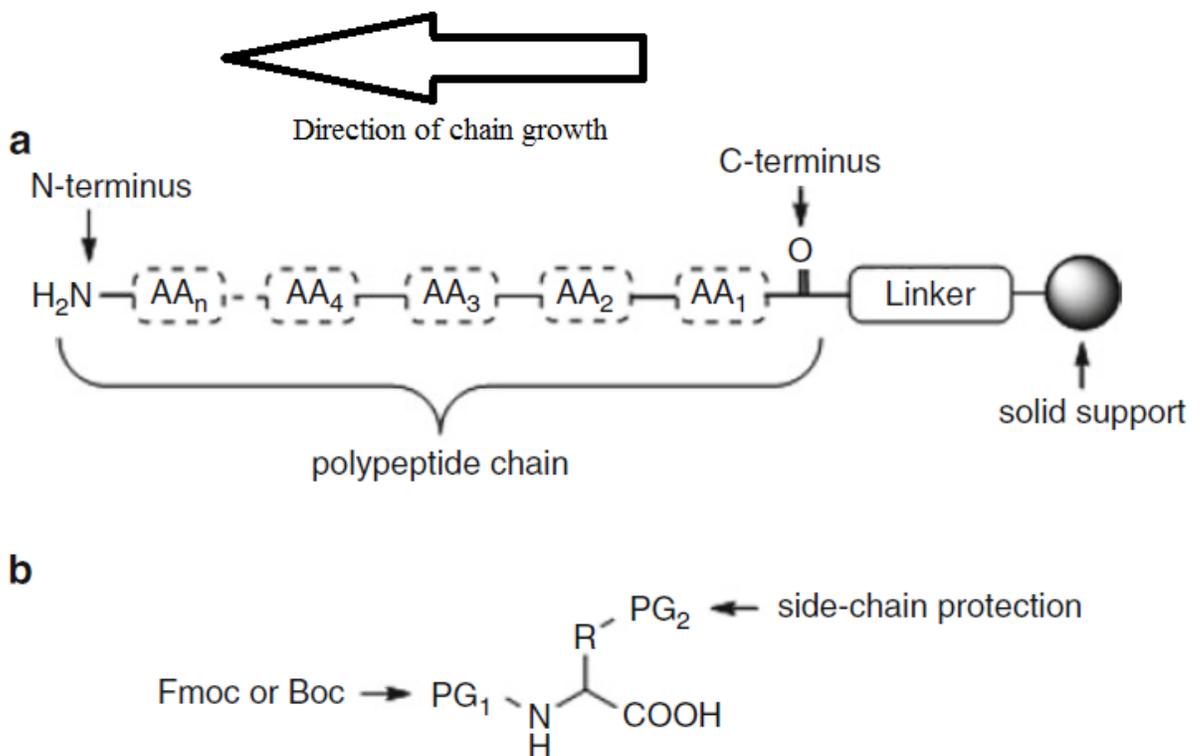
La metodología seguida para obtener un péptido, es acoplar uno a uno cada AA hasta completar la secuencia deseada.

Mediante complejos procesos bioquímicos, todos los seres vivos producen un polipéptido que posteriormente formará una proteína dada, a través de la elongación una cadena de AA que inicia con aquel que aporta su grupo carboxilo para la formación del enlace peptídico con el grupo amino de un segundo AA, el cual aportará su grupo carboxilo en el enlace peptídico con el amino de un tercer AA y así sucesivamente. Por tanto, en el

proceso de síntesis de proteínas en los ribosomas el crecimiento del polipéptido es en dirección N-terminal a C-terminal (45).

En la SPPS el primer AA se une covalentemente mediante su grupo carboxilo a una molécula enlazante (*linker*), que se encuentra unida a un soporte sólido (Figura 1-10 a), el cual permanece insoluble durante todo el proceso de síntesis (39). Este primer AA aporta su grupo amino para unirse con el grupo carboxilo del segundo AA que se encuentra en el medio de reacción. El proceso se repite para acoplar cada uno de los nuevos AA a la cadena creciente que permanece anclada al soporte sólido hasta completar la secuencia deseada. De esta manera la cadena de péptido crece desde el extremo C-terminal al N-terminal.

Figura 1-10: a. Sentido del proceso máximo en SPPS. b. Estructura de un AA utilizado en la SPPS con los grupos protectores. (modificado de (39)).

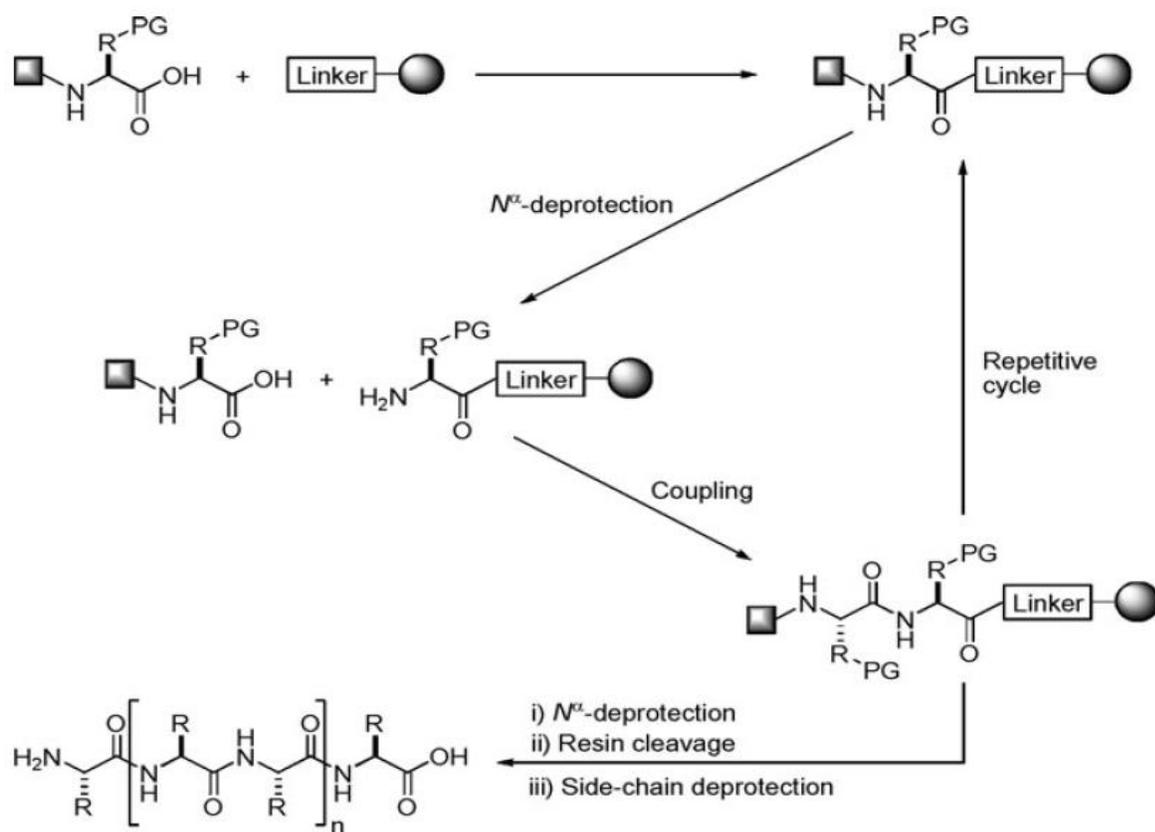


La SPPS requiere un esquema de protección, donde los grupos de las cadenas laterales son removidos al final de la síntesis en proceso conocido como “clivaje” o desanclaje, mientras que los grupos protectores del grupo α-amino de los AA son temporales y se remueven durante la síntesis. Para anclar los AA se debe retirar el grupo protector del grupo α-amino para que esté disponible en la formación del enlace peptídico. Igualmente

para que las reacciones de acople se puedan llevar a cabo, es necesario convertir el grupo carbonilo del AA en una especie más reactiva que es la encargada de formar el enlace con grupo amino del soporte sólido, del cual es necesario haber retirado previamente su grupo protector.

El proceso de desprotección y acople se repite hasta que se complete toda la secuencia de AA y finalmente el péptido se desancla del soporte sólido en el proceso conocido como clivaje. La Figura 1-11 resume las etapas de la SPPS.

Figura 1-11: Etapas de la SPPS con los AAs previamente activados (44).

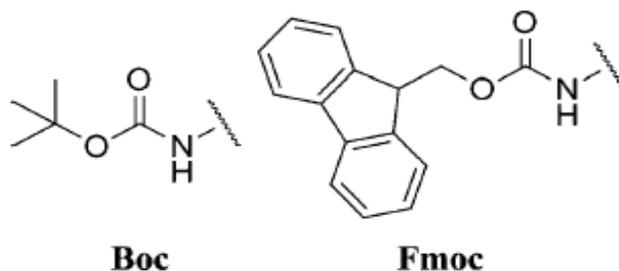


1.3.1.3 Estrategias de protección

Los grupos protectores del grupo α -amino más usados durante la elongación lineal de un péptido se muestran en la Figura 1-12. La Boc/Bzl y la Fmoc/tBu son consideradas estrategias diferentes ya que utilizan reactivos distintos en cada una de las etapas, así como los grupos protectores de las cadenas laterales de cada AA (44). La protección se

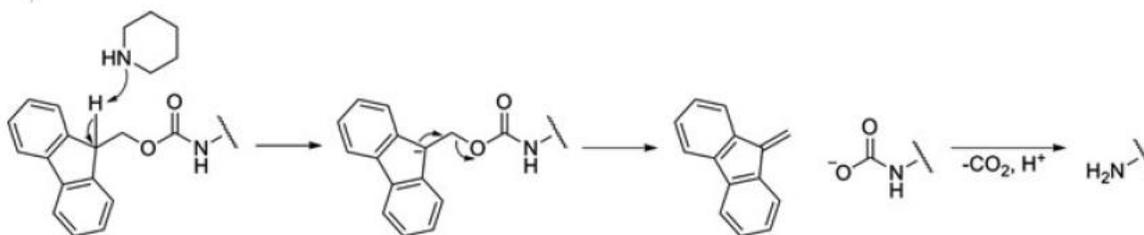
realiza principalmente para evitar dos posibles consecuencias durante las reacciones de acople o desprotección que se derivan de las propiedades estructurales intrínsecas de los AA: 1. Evitar reacciones no deseadas entre grupos y 2. Impedir racemización de AA.

Figura 1-12: Grupos protectores del grupo amino (44).



Otra diferencia entre las estrategias radica en los procesos de desprotección, para la t-Boc/Bzl se realiza en un ácido, mientras que en la Fmoc/tBu se realiza en medio básico, cuyo reactivo de desprotección más utilizado es la piperidina en solución al 25% en DMF con Tritón X-100 al 0,1%. El mecanismo de reacción para el proceso de desprotección del grupo Fmoc es detallado en la Figura 1-13.

Figura 1-13: Mecanismo de reacción en la desprotección de AAs con grupo Fmoc.



1.3.1.4 Monitoreo de reacciones

Las reacciones de desprotección y de acople deben ser monitoreadas con el fin de determinar si hay grupos α-amino libres. Es un proceso crítico, ya que la presencia de grupos amino libres en un acople parcial, genera péptidos incompletos que contaminan el producto final, dificultan el proceso de purificación y disminuyen el rendimiento. Para determinar grupos amino libres se emplea la reacción de Kaiser (46) conocida también como prueba de Ninhidrina, consiste en formar un complejo coloreado conocido como purpura de Ruhemann el cual presenta un máximo de absorbancia a 570nm (47).

Entre las ventajas de la prueba se destaca que resulta ser sensible, rápida, fácil de realizar, cumpliendo requisitos fundamentales como detectar acoples incompletos no discernibles por análisis de aminoácidos. La prueba se basa en que el color azul disminuye a medida a medida de que decrece el número de grupos amino libres, permitiendo determinar de una forma cualitativa y/o cuantitativa, si en el proceso de acople alcanza el 99%, es decir que los sitios activos han sido ocupados por el Fmoc-AA (46).

1.3.1.5 Soporte sólido

El soporte sólido hace referencia a la permanente insolubilidad de los polímeros que constituyen las partículas, en los diversos medios donde se llevan a cabo las reacciones químicas. Aunque muchas veces se considera que el soporte sólido es una matriz en donde ocurren reacciones sobre una superficie, este es un concepto errado, ya que la reacciones también se realizan en el interior de la partícula (48). En su artículo pionero (42) Bruce Merrifield utilizó el concepto de polímero y el concepto de resina, y enumeraba una serie de condiciones y características que debía cumplir el soporte sólido, el cual fue un copolímero clorometilado estireno con divinilbenceno.

La resina de Merrifield aunque fue un gran logro, presentaba inconvenientes tales como su poca capacidad de hinchamiento en varios solventes utilizados durante la síntesis, además de una alta hidrofobicidad de la red polimérica (49), factores muy importantes que dificultan las reacciones, disminuyendo los rendimientos. Por tanto se han ido creando una gran cantidad de soportes sólidos los cuales idealmente deben cumplir con las siguientes características (50):

- Ser mecánicamente robusto. Que se pueda utilizar bajo flujo de solventes tanto síntesis continua como discontinua.
- Ser estable a la variación de temperatura.
- Removible, fácilmente solvatable y que los reactivos tengan fácil acceso.
- Buen hinchamiento en un amplio rango de solventes
- Tamaños de partícula aceptables
- Estable en medios ácidos, básicos, oxidantes y reductores pero que el péptido se pueda desanclar una vez completada la síntesis.
- Sitios reactivos suficientes para llevar a cabo las reacciones.
- Minimizar interacciones entre las cadenas peptídicas unidas.

- Biocompatibles y con buen hinchamiento en soluciones tampón acuosas.

La mayoría de los soportes desarrollados hasta el momento no cumplen con todas estas características y de hecho varias se contradicen entre sí. Por ejemplo si una resina tiene demasiados puntos reactivos la probabilidad de interacciones entre las cadenas peptídicas es mayor. Por tanto se debe seleccionar el soporte sólido que cumpla con las especificaciones requeridas. Además un soporte no es como cualquier reactivo, ya que cada fabricante los elabora de formas diferentes y aunque tengan la misma composición, tienen especificaciones diferentes que afectan el resultado final (50).

Existen dos formas de considerar el modelo del soporte sólido. La primera es tomar a la resina como una esfera compacta donde ocurren las reacciones mientras que la segunda es tomar la red polimérica como un sistema cosolvente en donde la accesibilidad de los componentes (ejemplo: los AAs) a los sitios de reacción, mejora si el polímero tiene características de hidro-lipofilidad semejantes a la del medio (51). Este último modelo es el más aceptado y ha sido la base para crear nuevos soportes sólidos.

En este punto vale la pena aclarar que aunque pueden ser utilizados sin distinción, los términos resina, soporte sólido y polímero pueden diferenciarse ya que se considera al polímero como el material del cual está hecho la “estructura” llamada soporte sólido y se considera a la resina, como el soporte sólido ya unido al *linker*. Por tanto, aunque el número de resinas fabricadas hasta el momento es importante, los soportes sólidos fabricados de polímeros no son muchos, y pueden clasificarse en algunos pocos grupos (52).

1.3.2 Purificación de péptidos

La purificación es un proceso complicado caracterizado por el empleo de costosos equipos y materiales que involucran etapas dispendiosas donde generalmente es difícil obtener cantidades importantes de péptido con alta pureza y buenos rendimientos. Los métodos reportados que han permitido obtener la molécula de interés son principalmente aquellos basados en RP-HPLC, aunque también se han desarrollado métodos para purificación de proteínas y péptidos basados en electroforesis (53). Así mismo, la extracción en fase sólida (RP-SPE) la cual ha sido una herramienta ampliamente utilizada para concentrar, desalinizar y purificar moléculas de matrices biológicas antes

de su análisis químico (54–56), se ha venido utilizando con este fin tratando de superar algunas dificultades inherentes al proceso.

1.3.2.1 Técnicas basadas en HPLC

Se han utilizado diversas técnicas de HPLC para la purificación de péptidos y proteínas. En el caso de los péptidos es considerable el empleo de técnicas basadas en HPLC en fase reversa (RP-HPLC) la cual consiste en la elución del péptido crudo con un gradiente de solventes (fase móvil polar) donde son utilizados diferentes buffers y solventes orgánicos como Metanol y Acetonitrilo, a través de una columna cromatográfica (fase estacionaria) de naturaleza no polar. Las dimensiones y especificaciones de la columna varían de acuerdo al proceso realizado (nivel analítico semipreparativo o preparativo). La fase estacionaria está compuesta de gel de sílice con una superficie funcionalizada con cadenas C-8 a C-18, por lo que el mecanismo de separación de los componentes del crudo se basa en las interacciones hidrofóbicas débiles entre el péptido y la fase estacionaria (57). Aunque el método ha demostrado ser apropiado para obtener péptidos de alta pureza, en algunas secuencias difíciles con un alto porcentaje de residuos hidrofóbicos pueden estar presentes productos con deleciones que son cromatográficamente indistinguibles (58), además se requirieron columnas y equipos que hacen un proceso eficiente bastante costoso. El seguimiento de la purificación se realiza con detectores UV o preferiblemente en sistemas acoplados a detectores de espectrometría de masas (56).

1.3.2.2 SPE

La SPE es un método de extracción similar a la cromatografía líquida que utiliza una fase en estado sólido y una fase líquida para aislar o separar uno o un tipo de analitos presentes en una solución. Presenta ventajas frente a la cromatografía preparativa al ser más amigable con el medio ambiente, más rápido y sencillo, se desperdicia menos muestra y resulta ser económico (59) además tiene ventajas sobre RP-HPLC en parámetros como la velocidad de purificación, reproducibilidad y eficiencia (55).

El montaje para realizar la purificación de un péptido a través de RP-SPE cuenta con una jeringa de polipropileno donde se empaca cierta cantidad de sorbente (50mg – 10g). Este dispositivo es conocido como cartucho, el cual se prepara para el proceso usando lavados con agua y metanol.

A través del cartucho se hace pasar una solución de péptido crudo el cual queda retenido por su mayor afinidad con los grupos apolares de sorbente (por ejemplo C18) frente a la del medio donde fue disuelto. Cabe aclarar que queda retenido el péptido junto con los demás constituyentes del crudo, como péptidos incompletos subproductos de los procesos de acople, los cuales son posteriormente eluidos con soluciones de diferente polaridad. Las fracciones con las moléculas disueltas son recolectadas y analizadas para seleccionar aquellas que tengan el péptido con mayor pureza. Para darle velocidad al proceso es necesario mantener un diferencial de presión, el cual puede generarse al aplicar una pequeña presión de gas en la parte superior de la jeringa o generando vacío en la parte inferior.

1.3.3 Caracterización y cuantificación de péptidos

Para caracterizar o cuantificar un péptido lo primero que se debe hacer es preparar la muestra ya que muchas veces es necesario separar el péptido de otras moléculas que pueden interferir con el análisis. Se suele hacer una separación utilizando RP-HPLC que es una de las técnicas más empleadas para el análisis de péptidos, aunque también se han utilizado herramientas como la electroforesis capilar (36). Además de la separación, el proceso de cuantificación se basa en la respuesta específica que ofrece el péptido o un derivado a algún fenómeno (por ejemplo absorción de luz) que pueda ser medible y que ojala apruebe por los parámetros de validación de la metodología. Se utilizan estándares certificados para comparar su respuesta al fenómeno medido con la aquella que presenta el péptido.

1.3.3.1 Métodos espectrofotométricos de cuantificación

Los métodos espectrofotométricos han sido una valiosa herramienta para el análisis de péptidos. Hacen parte de diversas técnicas como la electroforesis, ELISA, análisis Western Blot y la misma HPLC (60). Puede realizarse una cuantificación directa como la realizada en el detector del HPLC a 205nm o 280nm (UV), o también se pueden utilizar métodos colorimétricos donde es aprovechada la capacidad de los grupos N-terminal de reaccionar cuantitativamente con reactivos para formar derivados coloreados (36). De los métodos colorimétricos únicamente son aplicables para péptidos la cuantificación basada en Ninhidrina y el método del ácido bicinconínico (60).

1.3.3.2 Cuantificación con ácido bicinconínico (BCA)

El método con BCA ha sido ampliamente utilizado en la determinación de proteínas gracias a su sensibilidad y especialmente a que tolera la presencia de especies que pueden causar interferencia con otros ensayos. Se basa en dos reacciones, una es la reducción del ion Cu^{2+} a Cu^+ debida a la presencia del enlace peptídico y de algunos residuos en un medio alcalino, y la segunda la quelación del Cu^+ por el BCA que forma un complejo hidrosoluble con un intenso color púrpura que absorbe luz a 562nm (61).

Sin embargo este método no es muy recomendado para la cuantificación de péptidos, porque no solo los enlaces peptídicos son responsables de la generación del complejo coloreado, sino también la presencia de algunos aminoácidos como cisteína (Cys), triptófano (Trp) y tirosina (Tyr), y la estructura macromolecular de las proteínas (62). Por tanto se han realizado modificaciones que permiten su uso en la cuantificación de péptidos (63), en donde se tratan con calor y algunos tensioactivos.

1.3.3.3 Espectrometría de masas

La espectrometría de masas es una herramienta ampliamente utilizada, a menudo acoplada con HPLC. Permite caracterizar péptidos, obteniéndose una valiosa información como es la masa de la molécula analizada. Se han desarrollado técnicas como MS/MS donde se acoplan dos analizadores de masas a un HPLC generando varias ventajas en el análisis de péptidos (64,65). Sin embargo aún existen varios desafíos como los que corresponden a las propiedades fisicoquímicas de los péptidos (pureza, solubilidad etc.), como los relacionados a la cuantificación con espectrometría de masas (66).

1.3.3.4 Dicroísmo circular

Es una técnica que aprovecha la característica de los cromóforos de las moléculas peptídicas, de tener la capacidad de absorber diferencialmente la luz polarizada circularmente a la derecha o a la izquierda (66). El principal cromóforo en los péptidos es el grupo amida que aunque no es ópticamente activo se encuentra en un entorno quiral que interactúa con la luz ya que las transiciones ópticas de este enlace amida se pueden dividir en múltiples transiciones que tienen longitudes de onda e intensidades que pueden variar según el entorno (67), lo cual lleva a que se puede obtener información sobre la estructura secundaria del péptido en solución según el espectro obtenido. Su utilidad ha sido explorada para utilizarlo también como detector acoplado a un sistema HPLC en

donde al igual que la técnica LC-MS se puede realizar un análisis obteniendo información adicional sobre las características de la molécula peptídica (68).

1.4 La vía transdérmica

El péptido vehiculizado al ser aplicado sobre la piel debe alcanzar el sitio objetivo que como ya vimos son las terminales pre-sinápticas de las neuronas en la unión neuromuscular en músculos del rostro. Por lo tanto, la molécula debe permear a través de la piel y no permanecer en otros posibles estratos que pudiese alcanzar (Tabla 1-3).

Tabla 1-3: Dianas biológicas de diferentes clases de productos aplicados sobre la piel (69).

OBJETIVO	TIPO	EJEMPLOS
Superficie	Limpiadores Protectores Oclusivos	Jabones Protectores solares Petrolato
Estrato córneo	Hidratantes Emolientes Queratólíticos	Glicerina Aceite mineral Ácido Salicílico
Epidermis viva y Dermis	Antiinflamatorios Antibióticos Anestésicos	Hidrocortisona Clindamicina Lidocaína
Subcutáneo	Analgésicos	Salicilato de metilo
Sistémico (transdérmico)	Vasodilatadores	Nitroglicerina
Glándulas sudoríparas	Antitranspirantes	Sales de Aluminio
Glándulas sebáceas	Antiacné	Ácido Retinoico
Folículo piloso, unidad pilosebácea	Antiandrogénicos	Minoxidil

Si se pretende que el acetilhexapéptido-3 alcance su diana biológica en la concentración adecuada para que pueda ejercer adecuadamente su acción es necesario revisar las características propias del producto cosmecéutico, como las propiedades fisicoquímicas del péptido, su concentración y el tipo de forma farmacéutica. También deben ser evaluados factores propios de la zona de aplicación entre los cuales son importantes el área de contacto entre la piel y el producto cosmecéutico, la región anatómica, el grado de irrigación de la zona, la forma oclusiva o no oclusiva de aplicación, e incluso la edad de la persona. Finalmente factores que afectan la biodisponibilidad del péptido una vez

entre en contacto con la piel, como aquellos que tengan que ver con los mecanismos de permeación cutánea hasta alcanzar el sitio de acción, además de su estabilidad *in vivo*.

Aunque la piel es un complejo sistema constituido por diversas estructuras en donde tienen lugar un sinnúmero de procesos y reacciones que mantienen la homeostasis del cuerpo, las características del estrato córneo (SC) son las principalmente involucradas en los procesos de permeación de PAs a través de la piel. Una vez que la molécula logra atravesar el SC esta difunde a través de los demás tejidos hasta los músculos, e incluso alcanza el torrente sanguíneo, según su distribución y metabolismo. Es entonces que haciendo referencia al término transdérmico, se puede decir que se ha utilizado para aquellos fármacos (muchas veces en parches) que al ser aplicados sobre la piel pretenden alcanzar (muchas veces mantener) niveles en sangre adecuados para generar un efecto terapéutico (70). En el presente trabajo el termino hace referencia al paso del péptido al estrato subcutáneo sin conseguir concentraciones séricas importantes.

1.4.1 El estrato corneo

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano, llegando a tener una masa de 5 Kg y una área de 2 m² (71). Su principal función es ser la primera línea de defensa ante factores externos como sustancias tóxicas, microorganismos, radiaciones e incluso traumas mecánicos, además de controlar la salida de agua y de electrolitos (71,72). Por tanto el ingreso de xenobióticos como principios activos (PAs) a través de ella, se ve poco favorecido al tener una permeabilidad selectiva intrínseca.

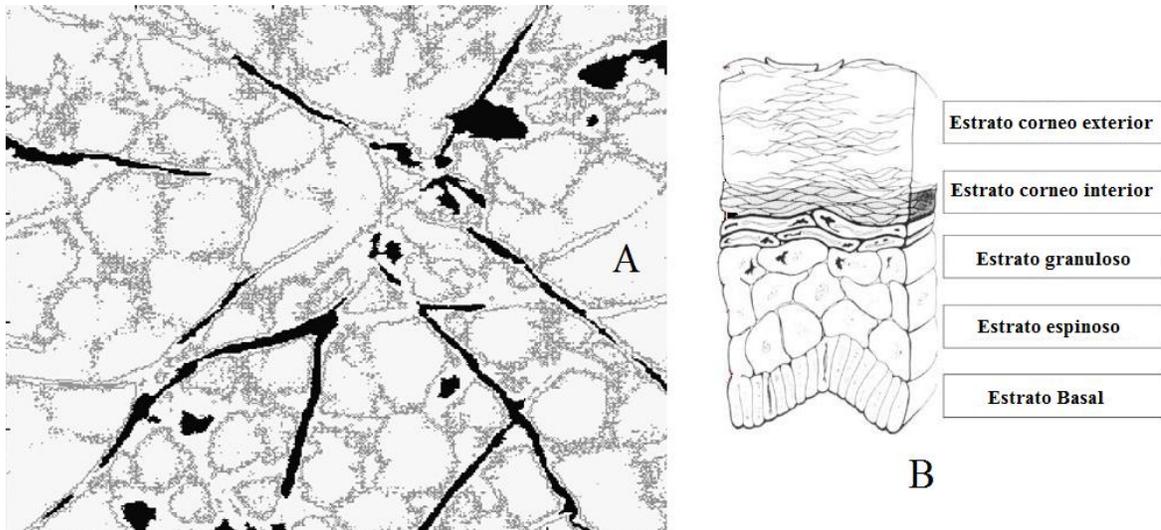
Morfológicamente la piel se compone de dos capas, la *dermis* y la *epidermis*. La *epidermis* (Figura 1-14 B) es la capa externa de la piel y tiene un grosor alrededor de 250µm, mientras que la *dermis*, la capa interna, presenta un grosor promedio de 50 µm dependiendo de la parte del cuerpo donde se mida (73). El SC se encuentra en la parte más externa de la epidermis, siendo el principal responsable de la permeabilidad selectiva de la piel. Está formado por un promedio de 12 a 15 capas de *corneocitos* que son células de forma aplanada con un diámetro aproximado de 30 µm a 40 µm y un grosor de 0,30 µm a 1,0 µm (29). Se encuentran fuertemente adosados entre sí por medio de estructuras de anclaje llamadas desmosomas que aportan rigidez (12).

Los espacios entre las capas y entre las mismas células (regiones intercorneocitos) son ocupados con lípidos como las ceramidas, el colesterol y ciertos ácidos grasos que se

encuentran unidos a las membranas celulares (12, 13). Estos componentes de la parte más externa de la piel hacen que se convierta en una barrera lipídica que dificulta la permeación de sustancias hidrofílicas hacia el interior.

Las columnas de corneocitos se agrupan entre sí formando “clusters” de aproximadamente una docena, generando algunos canales conocidos como *inter-clúster*, que tienen pocos lípidos de relleno y menos resistencia al paso de moléculas y entre estos grupos se forma una intersección de agrupaciones (*cluster junction*) que son canales más grandes con menor resistencia a la permeación de moléculas. Como se puede observar en la Figura 1-14 A, esta organización se puede evidenciar de manera similar en piel de ratón, la cual ha servido como modelo de membrana en ensayos *ex-vivo* de permeabilidad cutánea (74) y tendría una estructura similar a la piel humana (75).

Figura 1-14: **A)** Fotografía de la superficie de piel desnuda de ratón de ($200 \times 200 \mu\text{m}^2$) utilizando CLSM en modo fluorescente. Las partes grises son las regiones inter-corneocitos y las negras son las *inter-clusters*, que presentan una relativa alta y baja resistencia a la penetración respectivamente (75). **B)** Estructura típica de la epidermis (76).



El tamaño de estos conductos es variable y corresponde a distribuciones que dependen de los sitios del cuerpo donde sean medidos. Por ejemplo las glándulas secretoras tienen tamaños entre $50 \mu\text{m}$ y $150 \mu\text{m}$, los conductos sudoríparos tienen tamaños aproximados a $50 \mu\text{m}$ mientras que los folículos pilosos tienen un rango entre $50 \mu\text{m}$ y $700 \mu\text{m}$. Otros conductos más pequeños son las intersecciones de agrupaciones ($30\text{-}80 \mu\text{m}$) y los canales *inter clusters* (aprox $5 \mu\text{m}$), mientras que las regiones inter-corneocitos ya mencionadas

constituyen los canales de 0,5nm a 7nm, los cuales tienen una abundancia relativa mayor (77).

1.4.2 Permeación de principios activos a través de la piel

En los años 40's se inició el estudio de la ruta percutánea que durante cuatro décadas desarrolló herramientas, metodologías y propuso mecanismos que permitieron obtener información suficiente para poder diferenciar la vía tópica de la vía transdérmica (78).

Con estos conocimientos puestos en práctica, en 1979 fue aceptada la comercialización del primer medicamento, el cual fue un parche de escopolamina fabricado con una dosis para tres días, utilizado en el tratamiento del mareo causado por movimiento. A partir de esto se han venido elaborando y utilizando numerosos medicamentos por esta vía (Figura 1-15), mientras que muchos otros se encuentran en fases de estudio clínicas (79).

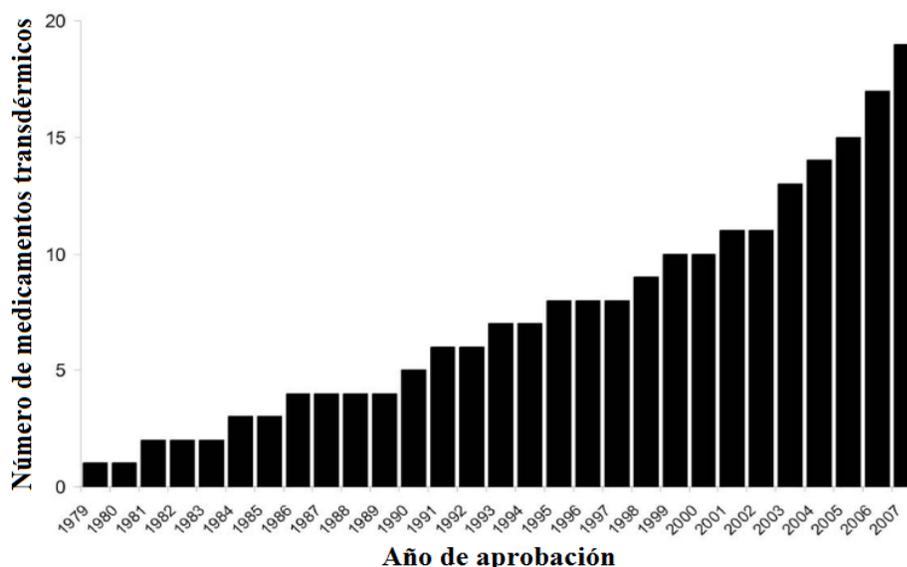
Aunque el número de medicamentos suministrados vía transdérmica va en aumento, hay desventajas que limitan su uso, entre las cuales, dos son determinantes para su desarrollo: 1. Pocos PA's son tan potentes como para tener acción terapéutica en las bajas cantidades que ingresan a través de la piel y 2. La irritación local que producen muchos PA's y ciertos excipientes, puede ser causante de patologías aún más serias que la que motivó el tratamiento (80,81). Por estas razones, se hace necesario tratar de minimizar estos efectos mediante la utilización de estrategias como las reportadas en la Figura 1-16.

Cabe resaltar algunas ventajas que ofrecen estos sistemas como, 1. No induce los efectos adversos de la vía oral como la irritación estomacal, efectos del primer paso, o interacciones con otros PA's o con alimentos; 2. Permite prolongar la duración de la actividad (especialmente en parches), obteniéndose mejor adherencia y éxito en el tratamiento; 3. Permite un inicio de acción más rápido en comparación a otras vías; 4. Se reducen complicaciones adversas al no ser tratamiento invasivo; y 5. Es posible una fácil interrupción de la terapia si se llegase a presentar alguna complicación (80,81).

Aunque las ventajas propias de la vía de administración son claras, cada PA debe cumplir con ciertos requerimientos para que su permeación a través de la piel pueda ser exitosa. Estas características son 1. Tener un bajo peso molecular, 2. Un coeficiente de

reparto octanol-agua que refleje el grado deseable de lipofilidad de la molécula, 3. Que sea una molécula potente, 4. Baja irritabilidad dérmica, 5. Punto de fusión bajo y 6. Que no forme puentes de hidrógeno (81,82). A partir de estas propiedades, se han realizado modelos matemáticos que logran predecir el flujo de un PA a través de la piel, los cuales han dado pautas sobre diseños de sistemas transdérmicos, brindando información acerca de si un PA podría o no tener éxito cuando es administrado por esta vía.

Figura 1-15: Medicamentos de aplicación transdérmica aprobados por la FDA desde 1979 (79).



Por ejemplo, la Ley de Fick (Ecuación (1-1)) se ha utilizado para describir la permeación de PA's a través del SC. Relaciona la cantidad de soluto (Q) que atraviesa una sección de SC de área de aplicación A, en un periodo de tiempo (T), con un gradiente de concentración constante en los dos lados del SC (ΔC_{sc}), un coeficiente de difusión en la membrana (D) y con una longitud de trayecto (h).

Suponiendo que el SC se comporta como una membrana casi homogénea y luego de un tiempo de latencia hasta establecer la difusión del soluto, se puede hablar de un flujo en el estado estacionario (J_{ss}) definido en la ecuación 1-2. También se puede establecer el parámetro coeficiente de permeabilidad (Kp) que se relaciona con el flujo en el estado estacionario (J_{ss}) (ecuación 1-3) el cual se ha logrado determinar experimentalmente en función del peso molecular (MW) y el coeficiente de permeación octanol/agua (P) de cada PA (ver Ecuación 1-4). Conociendo el Kp se podría obtener un Flujo máximo (J_{max}) que se obtendría en teoría al utilizar una concentración saturada de PA en el vehículo

(ver ecuación 1-5). Se puede concluir de esta manera que existe una relación estructura-permeabilidad que permite cuantificar el flujo de PA a través del SC (82). Algunos estudios han calculado que la permeación óptima de los PA's es obtenida cuando su peso molecular es inferior a 500 Da y su log P se encuentra entre 1 y 3 (83).

$$Q = \frac{DAT\Delta C_{sc}}{h} \quad (1-1)$$

$$J_{ss} = \frac{Q}{AT} = \frac{D\Delta C_{sc}}{h} \quad (1-2)$$

$$Kp = \frac{J_{ss}}{\Delta C_v} \quad (1-3)$$

$$\log Kp = a + b \cdot \log P - c \cdot MW \quad (1-4)$$

$$J_{max} = Kp \cdot C_{v, sat} \quad (1-5)$$

Sin embargo como dijimos anteriormente pocos PA's cumplen satisfactoriamente con un flujo efectivo terapéutico. Por tanto, se han propuesto estrategias para el mejoramiento de este flujo, las cuales abarcan puntos de vista diferentes en donde se incluyen: el aumento de la permeabilidad de la piel por medio de potenciadores químicos de la penetración (84,85), el empleo de energía en forma de temperatura durante unas fracciones de segundo para calentar la superficie de la piel mejorando la permeación sin dañar los tejidos (86), el empleo de corriente eléctrica para inducir el paso de moléculas cargadas (87) o el uso de ultrasonido (88).

También se han realizado modificaciones estructurales a PA's uniéndolos a cadenas hidrocarbonadas en donde lo que se pretende es aumentar su valor de P hasta mejorar la permeación (89). También se han utilizado estructuras como los dendrímeros, las micelas y los liposomas que actúan como incrementadores de la permeabilidad debido a cierta afinidad de sus componentes con el SC, y que además mejoran la solubilidad del fármaco en sus matrices respectivas (4,75,79).

En la Figura 1-16 se resumen algunas estrategias para el mejoramiento de la permeación cutánea de PA's. Para el desarrollo del presente trabajo se eligió del subgrupo de vesículas y partículas, específicamente los **liposomas**, para la encapsulación del péptido sintético, como un método para mejorar su permeación cutánea. Adicionalmente se ha

demostrado que en formulaciones cosméticas los mismos lípidos que los componen traen beneficios para la buena salud de la piel (5).

Figura 1-16: Algunos métodos y estrategias utilizadas para aumentar la permeación de fármacos a través de la piel (4).



1.5 Liposomas

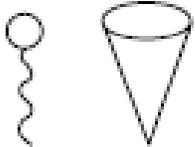
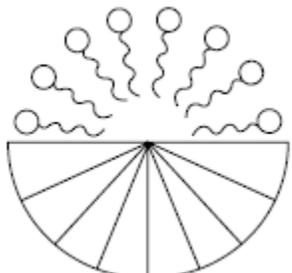
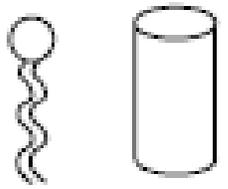
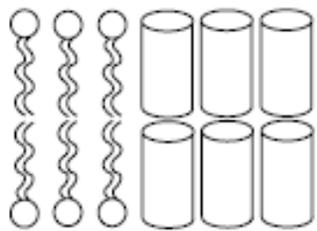
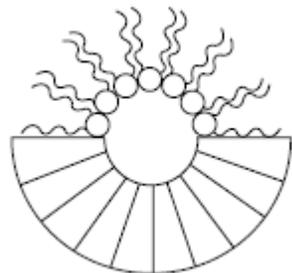
En solución acuosa y en cierta concentración, los tensioactivos se agrupan espontáneamente en estructuras ordenadas llamadas micelas, las cuales distribuyen sus “cabezas polares” hacia el exterior de la estructura con el fin de aislar las “colas hidrofóbicas” del contacto con el agua formando una monocapa (Tabla 1-4). De otra parte las propiedades de la mayoría de fosfolípidos (PLs), facilitan la formación estructural basada en bicapas que son la base estructural de los liposomas, los cuales son descritos como vesículas generalmente esféricas con un compartimiento interno acuoso.

1.5.1 Caracterización física

Una vesícula liposomal puede estar conformada por una o varias bicapas fosfolípicas (lamelas), dispersadas en el medio acuoso (Figura 1-17). El diámetro de cada vesícula es diverso y varía desde 20nm hasta 5000nm (90), el cual depende principalmente de las características fisicoquímicas del PL y del método de fabricación empleado (91). Con

base en estas características morfológicas, los liposomas son clasificados como se cita a continuación:

Tabla 1-4: Efecto de la naturaleza de las moléculas anfifílicas en la estructura de los agregados formados (92).

TENSIOACTIVO	FORMA	ORGANIZACIÓN
<p>Detergentes Jabones Lisofosfolípidos</p>	 <p>Cono Invertido</p>	 <p>Micela</p>
<p>Fosfatidilcolina Fosfatidilserina Fosfatidilinositol Esfingomielina Dicetilfosfato</p>	 <p>Cilindro</p>	 <p>Bicapa</p>
<p>Fosfatidiletanolamina Ácido fosfatídico Colesterol Cardiolipina</p>	 <p>Cono</p>	 <p>Micelas invertidas</p>

1.5.1.1 MLVs: Vesículas multilamelares grandes (Multilamelars Large Vesicles)

Están constituidas por cinco o más bicapas y presentan tamaños mayores a 500 nm. Las vesículas compuestas de pocas bicapas concéntricas a menudo son llamadas liposomas oligo-lamelares. Las MLVs fueron los primeros liposomas obtenidos a través de la hidratación de la película de PL formada y tienen amplia utilidad en la encapsulación de PA's lipofílicos (91).

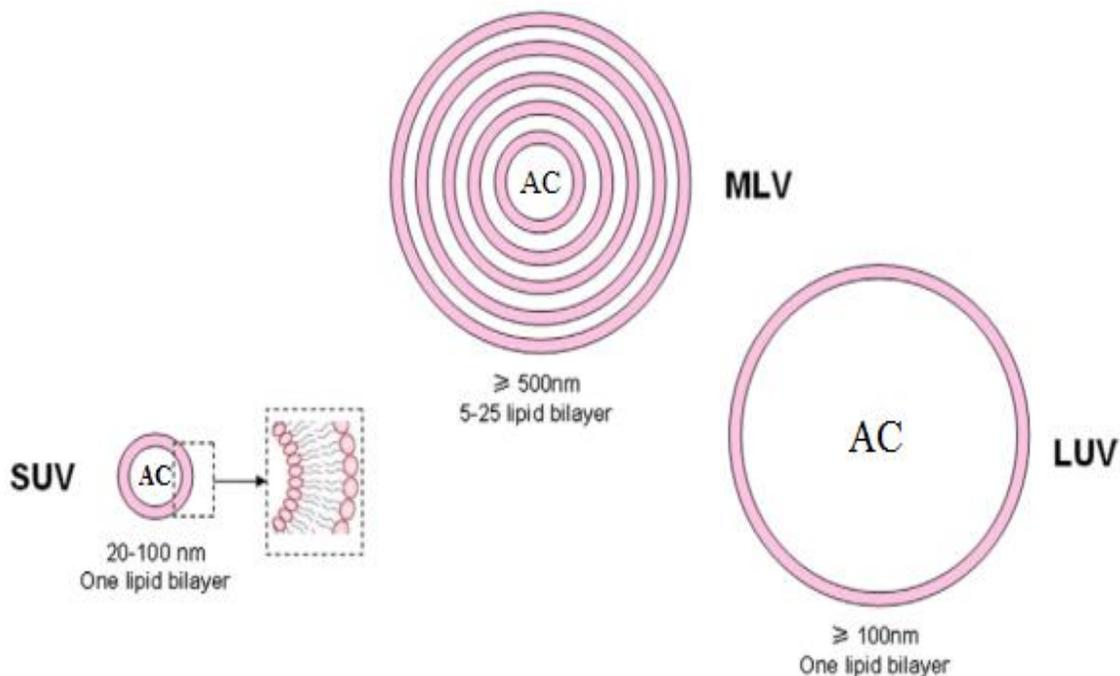
1.5.1.2 LUVs: Vesículas unilamelares grandes (*Large Unilamelars Vesicles*)

Son liposomas de un tamaño de 100 nm hasta 1000 nm formados de una sola bicapa lipídica. Presentan una alta capacidad de encapsulación de activos hidrofílicos, debido al elevado volumen del compartimiento interno (93).

1.5.1.3 SUVs: Vesículas unilamelares pequeñas (*Small Unilamelars Vesicles*)

Son pequeñas vesículas de menos de 80 nm de diámetro y constituidas por una sola bicapa. Aunque presentan cierta homogeneidad en su tamaño son termodinámicamente inestables exhibiendo una tendencia a la agregación (91). Tienen baja capacidad de encapsulación y no se recomienda para activos hidrofílicos por su disminuido volumen interno (93).

Figura 1-17: Tipos de liposomas según sus características físicas (90). Nótese el compartimiento interno acuoso (AC).



1.5.2 Composición química

1.5.2.1 Fosfolípidos

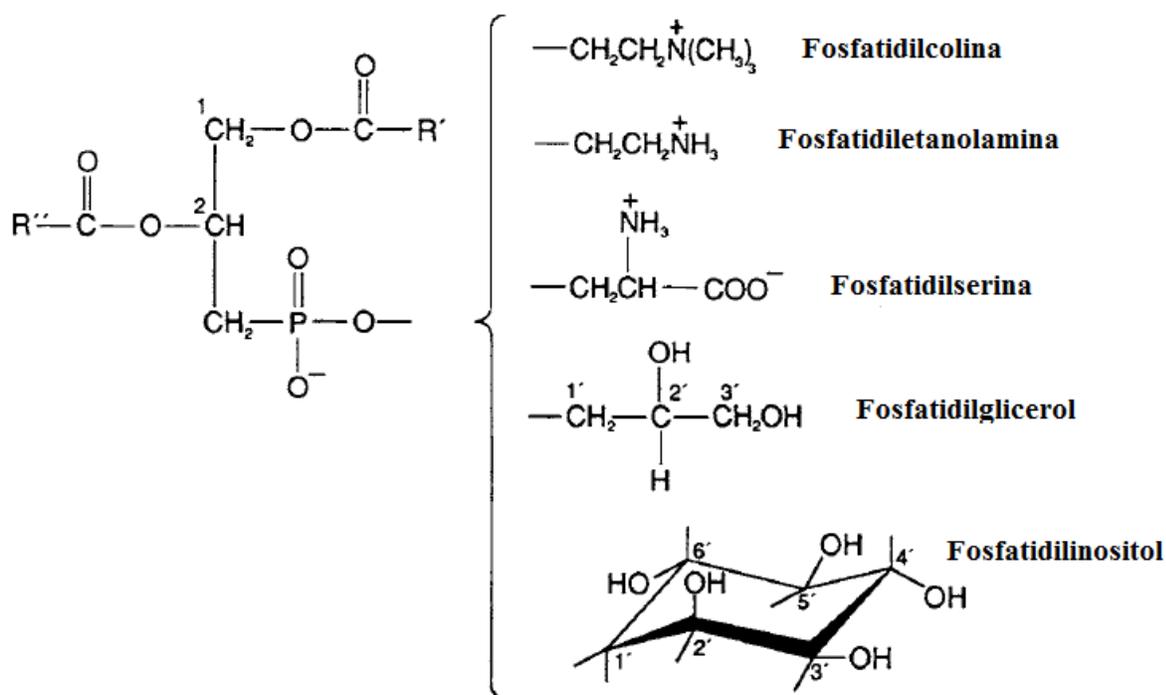
Los PLs son un tipo especial de tensioactivos, reconocidos por ser indispensables para que la vida tal como la conocemos pueda existir, ya que son las principales moléculas

formadoras de las membranas biológicas (94). Su nombre se debe a que en su estructura exhibe un grupo fosfato ubicado en la parte hidrofílica de la molécula. Se pueden clasificar en dos tipos glicerofosfolípidos y esfingolípidos.

1.5.2.1.1 Glicerofosfolípidos

La estructura de un glicerofosfolípido como se observa en la Figura 1-18, tiene como núcleo una molécula de glicerol, en donde a uno de sus carbonos primarios se une la cabeza hidrofílica de la molécula que consta de un grupo fosfato y un grupo polar que varía dependiendo el PL.

Figura 1-18: Estructura de algunos glicerofosfolípidos (95).



El otro carbono primario y el secundario del glicerol se unen a largas cadenas hidrocarbonadas (R' y R'') mediante enlaces tipo éster. Podría decirse que los dos grupos $-\text{OH}$ del glicerol se esterifican con los grupos $-\text{COOH}$ de dos ácidos grasos (94,95). La fosfatidilcolina (PC) es el glicerofosfolípido más conocido y es sintetizado en el retículo endoplasmático de la célula eucariota a partir del diacilglicerol. Es el componente mayoritario de las membranas celulares y además participa en otras funciones bioquímicas celulares (96). También es el PL más usado en la industria farmacéutica ya que se obtiene fácilmente de múltiples fuentes, con procesos relativamente sencillos. Las fuentes principales son la yema de huevo y la soya, aunque comercialmente se venden

también fosfatidilcolina de corazón, hígado y cerebro de bovino aunque son más costosas.

La lecitina de soya es un subproducto obtenido en la producción del aceite (97). Se extrae con agua en un proceso llamado desgomado y el producto final contiene cerca del 35% del aceite de soya, mientras que el 65% son diferentes PLs, mayoritariamente PC, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol. La composición molecular de la lecitina puede variar dependiendo del proceso o de la materia prima, pero principalmente son PLs con cadenas hidrocarbonadas entre 10 y 18 C con 0, 1, 2 o 3 insaturaciones (98). Estos PLs son utilizados en la industria farmacéutica y cosmética como materia prima, mientras que la lecitina es usada principalmente como emulsificante en la industria de alimentos (97). La obtención de PC y de otros PLs con mayor pureza a partir de la lecitina, se hace mediante extracción continua con solventes, en donde en las primeras fracciones son eliminados los ácidos grasos que componen el aceite (99).

Las membranas de PC pueden estar en diferentes fases según la temperatura. A bajas temperaturas se encuentran herméticamente ordenadas en una fase “sólida” conocida como fase gel. A medida que aumenta la temperatura existe una transición o un cambio a la fase de cristal-líquido en donde existe un movimiento mayor de las moléculas que componen la membrana (100). Esta temperatura de transición (T_c) es influenciada por las características moleculares del PL principalmente de las dos cadenas hidrocarbonadas. Generalmente, a medida que estas cadenas son más largas y entre menor sea el grado de insaturación, la T_c de la PC es mayor (100). Este es un aspecto de vital importancia ya que en temperaturas superiores a T_c hay una inestabilidad propia referida a la formación de rotámetros Gauche formando movimientos tanto inter como intramoleculares, lo cual produce que aumente la permeabilidad de la bicapa permitiéndose un posible flujo de los PA's. Por tanto un liposoma tendría más estabilidad referida a la capacidad de mantener un PA encapsulado cuando es almacenado a temperaturas inferiores a la T_c , mientras que sería más estable *in-vivo* cuando la temperatura de transición es mayor a la temperatura del organismo (101).

1.5.2.1.2 Esfingolípidos

Los otros PLs de origen natural ampliamente utilizados, son los esfingolípidos, que al igual que la PC, son componentes fundamentales de las membranas celulares (102). La esfingomielina es un lipóide catiónico que resulta de la esterificación de una ceramida

con un grupo fosforilcolina. Es utilizada especialmente en formulaciones con aplicaciones inmunológicas, aunque su elevado costo restringe considerablemente el uso a escala industrial.

1.5.2.2 Otros componentes

El colesterol es un tensioactivo que se halla distribuido ampliamente en las membranas celulares. Ha sido utilizado en la elaboración de liposomas, ubicándose entre las bicapas fosfolipídicas de modo tal que su grupo OH queda orientado hacia el solvente acuoso mientras que la parte apolar de la molécula se ubica entre las colas hidrocarbonadas en el dominio hidrofóbico. Esta parte de la molécula da rigidez al liposoma ya que evita el movimiento molecular de las cadenas de la PC, lo cual se ha comprobado con un aumento de la Tc de la PC (103). Este fenómeno disminuye también la permeabilidad del liposoma mejorando su integridad, lo que genera que la cantidad de PA encapsulado dependa muchas veces de la cantidad de colesterol en la formulación, lo cual es sinónimo no solo de una mejor encapsulación de PA's sino de una mayor estabilidad del sistema (104).

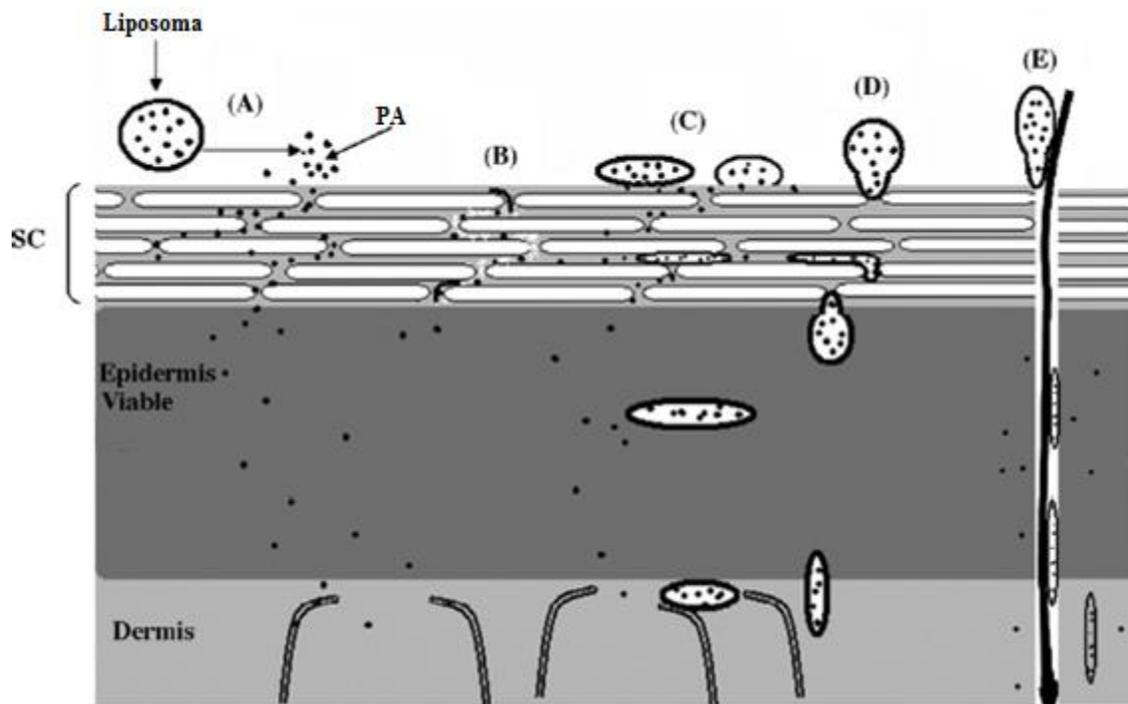
Otros componentes no estructurales usados en la fabricación de liposomas son aquellos que mejoran la estabilidad química de los lípidos utilizados, especialmente cuando son lípidos insaturados los cuales tienden a oxidarse con facilidad. Por tanto en formulaciones liposomales es común la presencia de antioxidantes como α -tocoferol (100). También son incorporadas a las formulaciones soluciones reguladoras de pH, aunque su presencia al aumentar la fuerza iónica del medio puede afectar la encapsulación de ciertos PA's (105).

1.5.3 Liposomas flexibles

El potencial de los liposomas como sistemas de liberación mejorados en la vía tópica fue explorado desde 1980 cuando se concluyó que al encapsular acetónido de triamcinolona se aumentó la concentración cinco veces en dermis y epidermis, disminuyendo también su nivel sistémico, al compararlo con la administración de formulaciones convencionales con la misma concentración (106). Sin embargo, como previamente se discutió, aunque la aplicación de cualquier PA vehiculizado sea sobre la piel, las dianas biológicas que pueden alcanzar las moléculas son diversas. Esto se debe a que hay descritos dos

grupos de mecanismos mediante los cuales los liposomas contribuyen al ingreso de PA's a los estratos de la piel (107). Un primer grupo como se describe en la Figura 1-19, es cuando ocurre una "alteración estructural liposomal" donde se contempla, (A) la destrucción de los liposomas al entrar en contacto con la piel liberando el PA en la superficie, (B) el efecto de los lípidos formadores como agentes químicos mejoradores de la permeabilidad y (C) la adherencia y posterior fusión con los lípidos del SC (107). El segundo grupo contempla a los liposomas que atraviesan intactos los canales tanto lipofílicos (D) como hidrofílicos de la piel (E). Lo que es claro es que los liposomas que atraviesan el SC corneo intactos pueden llevar el PA encapsulado a estratos más bajos de la piel mientras los que son alterados y destruidos y dejan los principios activos en estratos más externos.

Figura 1-19: Posibles mecanismos de acción de los liposomas como sistemas de liberación de PA's en la piel (107).



Los liposomas clásicos constituidos por PLs y colesterol son rígidos, y al ser aplicados sobre la piel es probable que su mecanismo de acción corresponda a los descritos para el primer grupo, lo que dificulta llegar a los PA's encapsulados, a estratos más profundos de la piel. De hecho se ha demostrado que aunque los liposomas clásicos ayudan a

alcanzar diversas dianas biológicas al ser aplicados tópicamente, no ayudan a mejorar significativamente el paso transdérmico (106).

Realizando una unificación de términos, se puede afirmar que los mecanismos A, B y C son aquellos que hacen referencia a la permeación de PAs mientras que los mecanismos D y E son de penetración. Sin embargo como se vió anteriormente, para que un PA pueda permear el SC debe cumplir con una serie de requisitos, especialmente de índole estructural, lo cual llevó a pensar en modificar las propiedades de rigidez de las vesículas que les permitiera deformarse, manteniendo su contenido encapsulado. Esta flexibilidad le daría las características de penetración apropiadas poder atravesaran los canales manteniendo su integridad y logrando permear completamente los estratos de la piel.

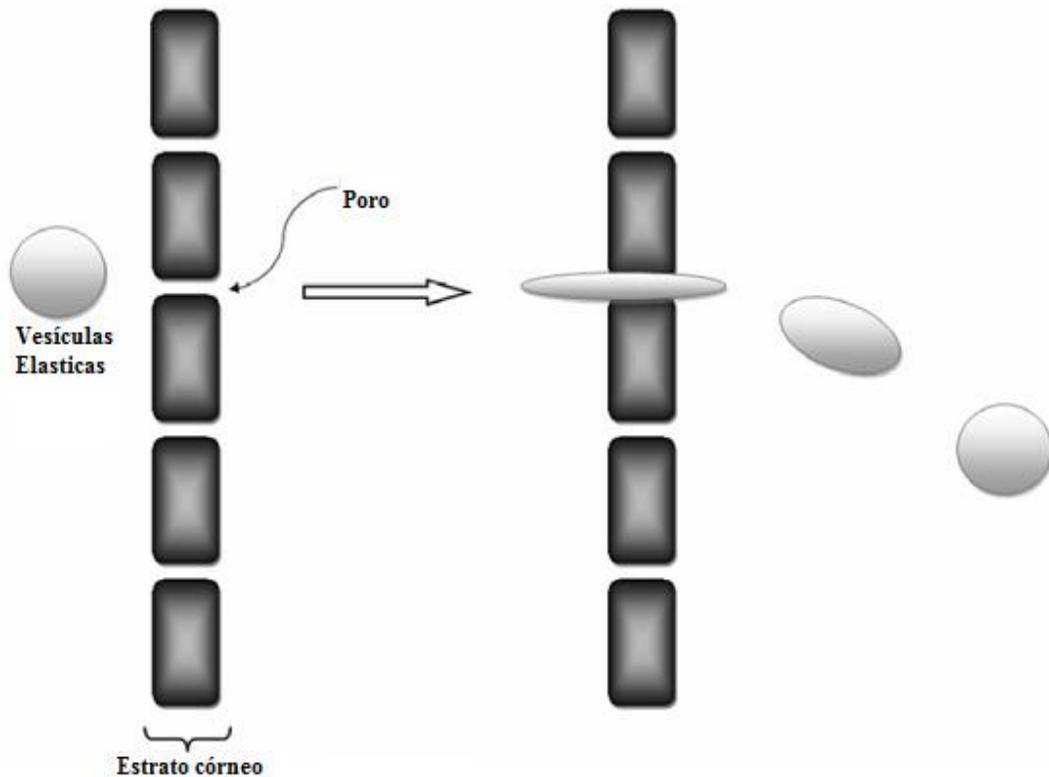
La primera generación de estos liposomas flexibles fueron los Transfersomas®, los cuales incorporaron en su estructura lamelar tensioactivos como colato (CS) y deoxicolato de sodio (DCS). Poseen una propiedad muy importante como es el grado de deformabilidad que muestra la capacidad que posee este tipo de liposomas de atravesar un poro (Figura 1-20). Por ejemplo, un grado de deformabilidad de 5 en vesículas de 100nm indicaría que podría pasar por un poro de diámetro de 20nm ($100\text{nm}/5=20\text{nm}$) manteniendo su integridad (75). Como se discutió anteriormente, los canales intercorneocitos son los más abundantes en la piel pero son los más pequeños (0,5-7nm), aunque se ha demostrado que tienen la capacidad de ensancharse a valores entre 20nm y 30 nm (75). Por tanto teóricamente liposomas flexibles entre 100 y 150nm podrían penetrar este tipo de poros.

Los liposomas elásticos de segunda generación incorporaron tensioactivos no iónicos a la bicapa lipídica, mientras que los de tercera generación aumentaron la capacidad de permeabilidad de las vesículas a través del desarrollo de sistemas ternarios con los lípidos, agua y etanol conocidos como etosomas® (108).

En general los liposomas flexibles han sido una herramienta valiosa para la administración de diversos PA's los cuales incluyen polipéptidos que tendrían una baja permeación a través de la piel intacta (109). Cabe aclarar que la liberación transdérmica no se limita a los clásicos parches utilizados en las primeras etapas de su desarrollo, sino que también incluye sistemas vesiculares flexibles de administración tópica no oclusiva,

aunque algunas veces los etosomas® han sido administrados de manera oclusiva para mantener la concentración etanólica con buenos resultados (106).

Figura 1-20: Deformación de los liposomas flexibles durante la penetración a través de los poros intercelulares (108).



1.5.4 Elaboración de liposomas

La elaboración de liposomas se puede dividir en dos pasos fundamentales. Una fabricación preliminar, en donde según el método empleado son obtenidos habitualmente MLVs, y el acondicionamiento de la vesícula en donde los liposomas son modificados principalmente en sus características físicas. Actualmente existe una gran diversidad de métodos en donde son utilizados diseños experimentales para optimizar las condiciones de elaboración y son trazadas estrategias para controlar desventajas inherentes a los procesos.

1.5.4.1 Hidratación de la película de PLs formada

Se clasifica dentro del grupo de las técnicas de agitación mecánica (100) y fue el primer método desarrollado, el más simple y más ampliamente utilizado (110). En él los PLs y

los constituyentes lipofílicos de la formulación son disueltos en un solvente orgánico que se elimina en un rotavapor dejando una película lipídica en las paredes del recipiente. Esta película posteriormente es hidratada con una solución acuosa, que a menudo es un buffer, en donde se encuentran disueltos los componentes hidrofílicos de la formulación. La hidratación debe realizarse a una temperatura superior a la T_c del PL. Este es el método de fabricación preliminar más utilizado en escala laboratorio y es relativamente sencillo de realizar. Una de las etapas críticas del proceso es la evaporación exhaustiva de los solventes utilizados, para evitar inconvenientes de toxicidad (100). Una de las desventajas es que hay una de baja eficiencia de encapsulación para moléculas hidrofílicas.

1.5.4.2 Método para producir REV (Reverse-phase Evaporation Vesicles)

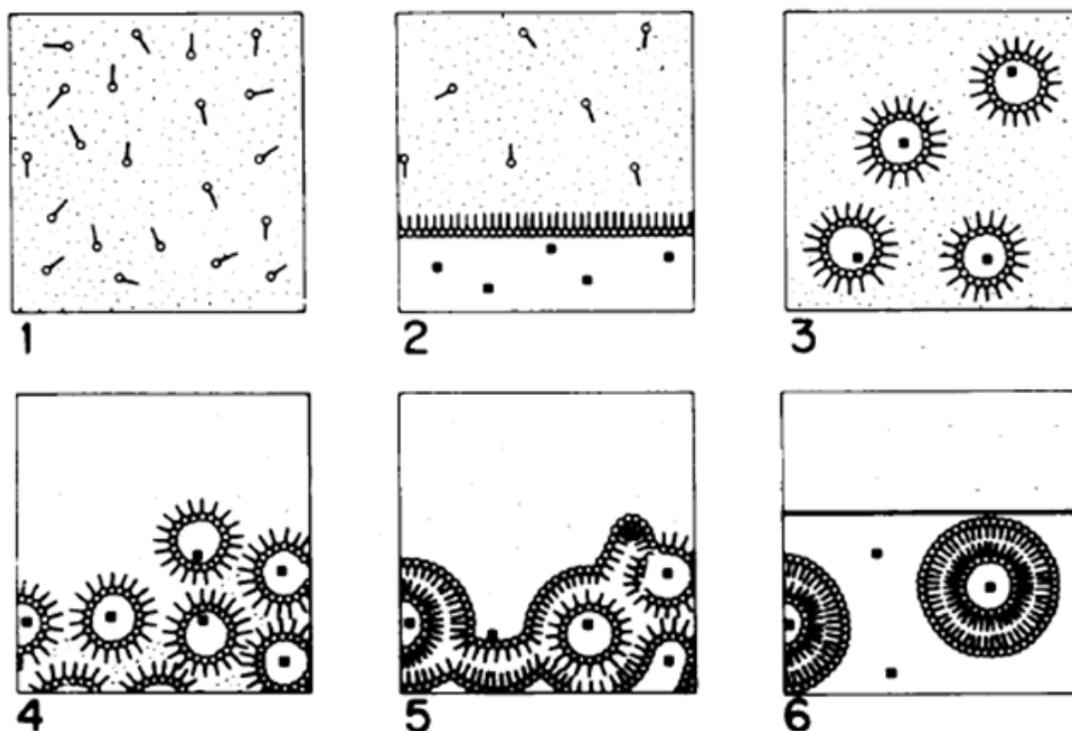
El método de inversión de fases por evaporación, se encuentra dentro del grupo de métodos llamados dispersión con solventes (100) y ha sido utilizado para encapsular PAs hidrofílicos (111) debido a que se producen liposomas con un amplio compartimiento acuoso interno. Como se ve en la Figura 1-21, para que se lleve a cabo el proceso de formación de liposomas, los fosfolípidos disueltos en un solvente orgánico 1) son puestos en contacto con una solución acuosa donde se encuentra disuelto el PA 2) para que posteriormente sea formada la emulsión (w/o) que debe tener un tamaño de gotícula que le confiera estabilidad durante la evaporación del solvente 3). Próximo a finalizar el proceso de evaporación del solvente orgánico 4), es evidente la formación de un gel, que al colapsar permite inversión de fases 5) y formar los sistemas liposomales 6), que normalmente son de tipo LUV, aunque muchas veces al incrementar la concentración de PC pueden obtenerse MLV's (111).

1.5.4.3 Solubilización con detergentes

En este método (112) los PLs se suspenden en la fase acuosa con ayuda de detergentes formando estructuras que se conocen como de micelas mixtas. Para formar la micela los detergentes requieren cierta concentración conocida como concentración micelar crítica (CMC), ya que a niveles inferiores las moléculas se encuentran como monómeros. Por encima del nivel de la CMC existe un equilibrio entre las moléculas libres y aquellas que están formando las micelas, fenómeno que se aprovecha para que estabilizado el sistema micelar mixto se pueden dializar moléculas libres de detergente, produciendo

que el detergente que forma la estructura junto con los PLs, se muevan al medio acuoso para poder restablecer el equilibrio. Los métodos utilizados para remover moléculas del detergente son aquellos que mantienen los liposomas en suspensión como la diálisis y la cromatografía en columna, siendo el más eficiente el segundo aunque pudiéndose manejar mayores volúmenes con el primero. Una de las principales desventajas de este método es que es inevitable la remoción de otras pequeñas moléculas solubles lo que hace poco eficiente este método para la encapsulación de PA solubles.

Figura 1-21: Diagrama de formación de liposomas REV (111).



1.5.4.4 Métodos de acondicionamiento

En los métodos de acondicionamiento, mediante la aplicación de energía se obtienen vesículas con características físicas mejoradas en relación a los liposomas previamente formados. Con ultrasonido se reduce el tamaño de las vesículas formando SUVs, de distribuciones más homogéneas; aunque frecuentemente durante este proceso se pueden reducir las eficiencias de encapsulación de los PA's. El proceso de ultrasonido se lleva a cabo por medio de una sonda que es introducida a la suspensión liposomal o por un baño de ultrasonido donde el recipiente con los liposomas es introducido a un compartimiento sometido a ultrasonido sin que exista contacto físico con la fuente. Este

proceso genera calor el cual debe ser controlado con la utilización de un baño de hielo, ya que el aumento a temperaturas superiores a la T_c puede inducir la liberación del PA desde el liposoma, incluso puede acelerar la oxidación de los lípidos. En este proceso el tamaño de partícula es inversamente proporcional al tiempo de sonicación y muchas veces se tienen distribuciones bimodales de tamaño que tienden a la normalidad a medida que el tiempo aumenta (113).

Otra técnica empleado para acondicionar liposomas es el método de extrusión en donde los MLVs son forzados a pasar a través de filtros de policarbonato de tamaños nominales de 50 nm, 100 nm o 200 nm. Este proceso utiliza altas presiones y el paso repetido a través de estos filtros disminuye el tamaño de los liposomas generando distribuciones bastante homogéneas y sin riesgo de oxidación de lípidos o la posible contaminación con titanio como cuando se utiliza el ultrasonido de sonda. Sin embargo, los equipos para el proceso de extrusión al ser elaborados con acero inoxidable son bastante costosos.

A gran escala tanto el proceso de fabricación como el proceso de acondicionamiento son realizados utilizando la técnica de micro-fluidización en donde suspensiones de lípidos en agua se hacen pasar por filtros de 1 μm - 5 μm utilizando grandes presiones (10.000 psi a 20.000 psi). El caudal producido es dividido en dos corrientes que son obligadas a chocar a gran velocidad y la alta energía producida durante el choque hace que los PLs se autoensamblen en liposomas (114).

2 Obtención y caracterización de acetilhexapéptido-3

2.1 Introducción

Los péptidos y las proteínas son moléculas que participan en la mayoría de los procesos biológicos que tienen lugar en los organismos vivos. Por esta razón, han sido el foco de numerosas investigaciones en las últimas décadas y se han constituido en soporte fundamental para el desarrollo de terapias con medicamentos de última generación. Actualmente hay numerosos productos farmacéuticos que contienen moléculas peptídicas como ingrediente activo, con varias indicaciones: antioxidante, antimicrobianos, antihipertensivos, citomoduladores e inmunomoduladores, entre otros (115). Esto refleja el creciente interés en la terapéutica basada en péptidos en la industria farmacéutica, ya que se estima que alrededor de 60 fármacos peptídicos han sido aprobados, cerca de 150 candidatos peptídicos se encuentran en estudios clínicos y que hay entre 500 a 600 en los estudios preclínicos (116). Por otra parte, como se examinó previamente, es indudable su importante rol en el desarrollo de productos cosmeceúticos, en donde se han convertido en una opción para el tratamiento del envejecimiento de la piel.

La evidente importancia de este tipo de moléculas generó el interés por producir cantidades suficientes de ellas tanto para la investigación de sus propiedades como para la posterior producción de productos farmacéuticos. Esto hizo que la síntesis química se adoptara como la metodología más apropiada con este propósito, teniendo en cuenta las ventajas que presenta, como la de incorporar en las secuencias peptídicas AA no naturales, o permitir la producción de grandes cantidades de producto especialmente para péptidos cortos de no más de 20 AA (2). En el presente capítulo se revisan varios aspectos de la síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS), y algunas modificaciones

respecto a la síntesis clásica, que nos permitieron obtener el acetilhexapéptido-3, una molécula con demostrada aplicación cosmeceútica.

2.2 Materiales, equipos y métodos

2.2.1 Materiales

Resina Rink Amida AM (aapptec®); Arginina (Fmoc-Arg(Pbf)-OH, aapptec®); Metionina (Fmoc-Met-OH, aapptec®); Glutamina (Fmoc-Gln(Trt)-OH, aapptec®); Ácido Glutámico (Fmoc-Glu(OtBu)-OH, aapptec®); DCC (aapptec®); 6-Cl-HOBt (aapptec®); N,N-Dimetilformamida 99,8% (PANREAC); Piperidina 99% (PANREAC); Anhídrido Acético 98% PS (PANREAC); Fenol (MERCK®); Alcohol Isopropílico (Honeywell Burdick and Jackson); Piridina (MERCK®); Éter etílico (Honeywell Burdick and Jackson). Ácido Trifluoroacético (TFA), Etanoditiol, TIS, Diclorometano (DCM), Triton X 100. Cartuchos purificación, acetonitrilo (ACN), Columna symmetry® C18 3,9mm x150mm (Waters®).

2.2.2 Equipos

Horno microondas LG® MS-0745v

Centrifuga Cense® R 535R-1

Agitador de vórtice IKA® VORTEX 3

Agitador SG22 SCHOTT®

Plancha de calentamiento MSH 300 BOECO

Cromatógrafo modular AGILENT® con detector U.V

Espectrómetro de masas IT-TOF Shimadzu ®

Polarímetro Jasco J-810

2.2.3 Métodos

2.2.3.1 Síntesis del Acetilhexapéptido-3

El acetilhexapéptido-3 fue obtenido usando la metodología SPPS asistida por microondas, empleando la estrategia Fmoc/tBu (117,118). 1) La cantidad adecuada de

resina rink amida (0,46 meq/g), fue pesada y sometida a un proceso de hinchamiento por el tratamiento con DCM durante aproximadamente 2 horas con agitación constante (AC) y temperatura ambiente (TA). 2) La reacción de desprotección se realizó con una solución de 4-metilpiperidina (20 % en dimetilformamida (DMF) para retirar el grupo Fmoc y dejar el grupo amino disponible para permitir la incorporación del primer AA de la secuencia o aquel siguiente en la cadena peptídica. Con este propósito se utilizó un horno microondas convencional, en el cual la dispersión resina o resina-péptido en solución de desprotección, fue sometida a dos ciclos de radiación por microondas durante 30 s cada uno, a una potencia de 140 W. 3) La reacción de acople del AA se realizó luego de su activación por medio de la preparación de una solución de Fmoc-AA: DCC: HOBt (1:1:1) en DMF, con cinco excesos de AA respecto a la sustitución de la resina. Esta solución se dejó 15 min a TA y AC. Posteriormente, esta solución se adicionó a la resina o resina-péptido, y se sometió a siete ciclos de radiación de microondas durante 30 s cada uno, a una potencia de 140 W. Tanto en la reacción de desprotección como en la de acople, se llevó a cabo un proceso de enfriamiento hasta alcanzar la TA tras cada uno de los ciclos de exposición a la radiación.

El proceso de acetilación se realizó poniendo en contacto el péptido-resina desprotegido en su grupo amino, con una solución de anhídrido acético: piridina : DMF (1:1:1). La reacción fue monitoreada de la misma manera que un ciclo de acople.

Se realizaron cuatro síntesis partiendo de cantidades diferentes de resina como se describe en Tabla 2-2. La síntesis 1 (convencional) fue realizada sin la aplicación de radiación de microondas con el propósito de evaluar los efectos de esta energía en las reacciones y en el producto final.

2.2.3.2 Desanclaje del péptido

Al finalizar el acople de todos los AA de la secuencia, el péptido-resina seca se trató con solución de desanclaje (TFA: TIS: EDT: H₂O 92,5: 2,5: 2,5: 2,5, 20 ml/g de resina-péptido), durante 6 horas a TA y AC. Después del tiempo de reacción, se separó la resina mediante filtración. En la solución filtrada se precipitó el péptido crudo mediante la adición de éter etílico frío y se separó con ayuda de un proceso de centrifugación.

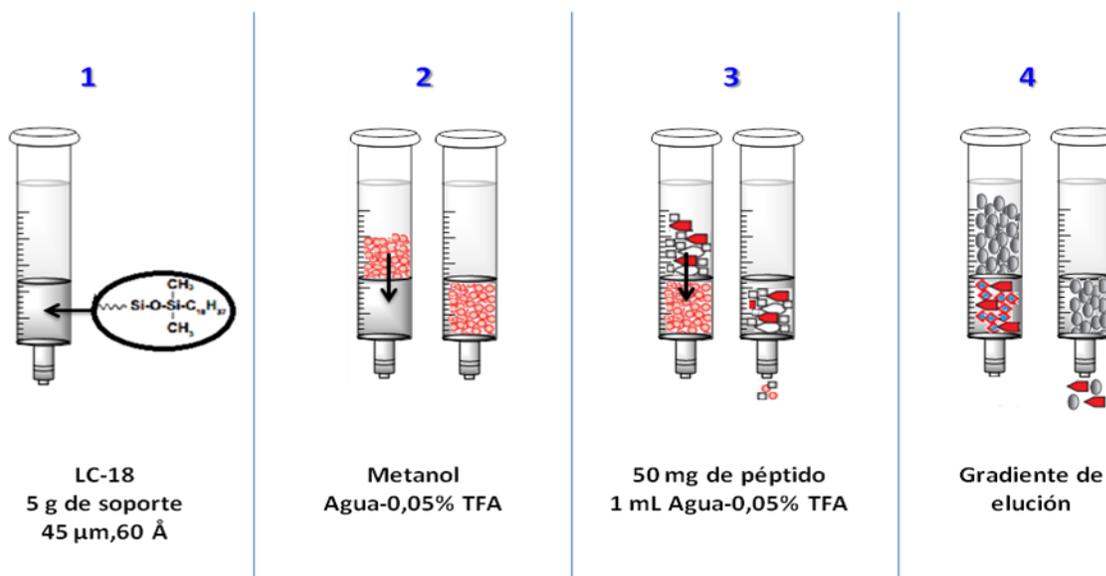
2.2.3.3 Monitoreo de reacciones

Las reacciones de acople y desprotección se monitorearon con el test de Kaiser o prueba de Ninhidrina (46). El procedimiento consiste en tomar una mínima cantidad de resina y adicionar dos gotas de la solución A (fenol 4 g/mL en etanol y cianuro de potasio 0.013 mg/mL en piridina 1: 10) y una gota de la solución B (Ninhidrina 0.05 g/mL en etanol). Luego de calentar a 100 °C durante 5 min se observa coloración azul intensa para el resultado positivo. En cada prueba se hace un blanco (sin péptido-resina) para tener una referencia.

2.2.3.4 Purificación del péptido crudo

Basados en los resultados RP-HPLC analítica del péptido crudo, específicamente el tiempo de retención, se diseñó un método para la purificación del péptido empelando una columna Super Clean LC-18 (RP-SPE) de 5g y tamaño de partícula 40-60 μm . 50 mg de acetilhexapéptido-3 crudo se disolvieron en TFA 0.05% en agua y fueron vertidos al cartucho. Posteriormente se realizó la elución de la muestra con soluciones de diferente polaridad que correspondían al programa de purificación descrito en la Tabla 2-3. Cada fracción se recogió y se analizó por cromatografía RP-HPLC analítica para luego ser clasificadas y reunidas en dos grupos, unas de alta pureza (>85%) y otras con baja pureza (70-85%), las cuales posteriormente se sometieron al proceso de liofilización (118). Las etapas de purificación se resumen en la Figura 2-1.

Figura 2-1: Proceso de purificación de péptidos sintéticos mediante RP-SPE.



2.2.3.5 Caracterización del Acetilhexapéptido-3

El perfil cromatográfico del péptido sintetizado se obtuvo disolviendo (1 mg/mL) en solvente A (H₂O: TFA 0.05%), con una posterior filtración y se inyectaron 50 µL en el cromatógrafo Agilent series 1260. La muestra fue eluída con un gradiente de 0% a 70% de solvente B en 45 min, (B: ACN: TFA 0.05%). La columna empleada fue C18 Agilent XDB-C18 (3.5 µm, 4.6 x 150 mm) y un flujo de 1 mL/minuto. La detección se realizó a 210 nm.

El peso molecular del péptido sintetizado se determinó mediante MS-IT-TOF, utilizando el espectrómetro Shimadzu® de inyección directa con ionización por electrospray con la tensión de detector 1,35kV y tensión de ionizador [+] =4,50kV en un intervalo de 100 a 2000 m/z.

El análisis por Dicroísmo Circular (DC) se realizó a TA utilizando un espectro polarímetro Jasco J-810. El espectro se registró en un rango de longitud de onda de 190 a 260 nm. El Acetilhexapéptido-3 fue disuelto en 30% TFE en PBS a una concentración 0,1 mM.

2.3 Presentación y discusión de resultados.

2.3.1 Síntesis del péptido

La síntesis del Acetilhexapéptido-3 mediante SPPS asistida por microondas y convencional, transcurrió sin mayores complicaciones. El empleo de la energía de microondas para realizar las reacciones de desprotección y de acople de cada uno de los aminoácidos en SPPS mediante la estrategia Fmo/tBu, es uno de los mayores avances en la síntesis de péptidos y se pretendió ver su efecto en la síntesis del acetilhexapéptido-3. La transferencia de energía cinética al seno de la reacción permitió una reducción considerable en los tiempos de desprotección y de acople, en comparación con la síntesis convencional (Tabla 2-1).

Por otra parte el empleo de microondas, contribuye a evitar la agregación del soporte sólido y reduce el consumo de solventes, mejorando los resultados de las síntesis de péptidos con respecto al rendimiento y la pureza. Los datos obtenidos de las tres síntesis realizadas con microondas apoyan esta hipótesis, aunque no se puede concluir

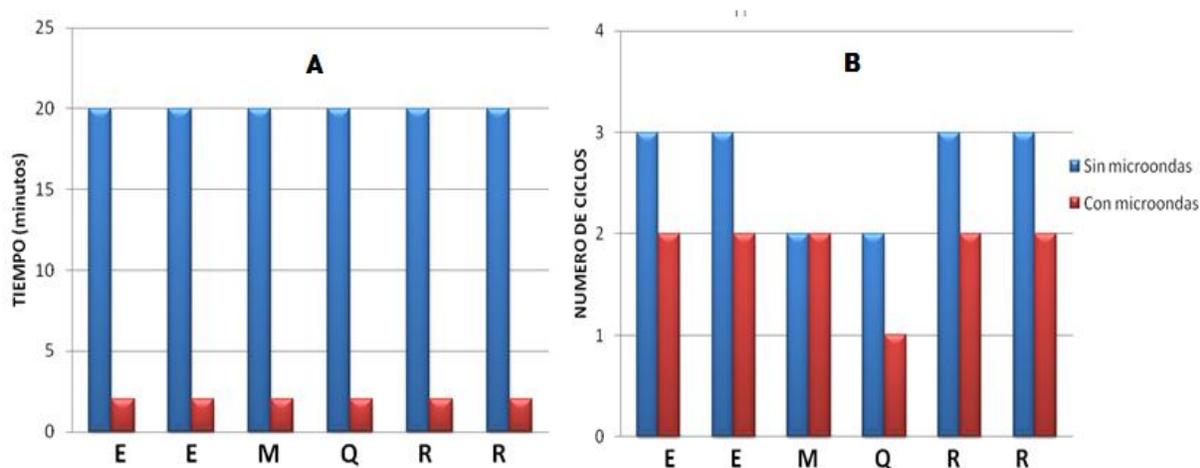
indiscutiblemente con el trabajo realizado, que utilizando microondas el rendimiento y la cuanto a cantidad y pureza del acetilhexapéptido-3 sintetizado fuera mayor.

Tabla 2-1: Comparación general entre la síntesis convencional (síntesis 1) y las asistidas con microondas (síntesis 2, 3 y 4).

	Convencional	Asistida con microondas
Reactivos usados	HOBt, DCC, TBTU	HOBt, DCC
Tiempo de desprotección	20 min	2 min
Tiempo de acople	60 – 180 min	10-30 min
Excesos de reactivos	5	5

En cuanto al número de ciclos por acople necesarios para completar las reacciones de acople (Figura 2-2 B), es evidente que utilizando la técnica con microondas se necesitaron 1 o 2 ciclos mientras que con la técnica convencional 2 y hasta 3 ciclos. Además en ciertos ciclos usando el método convencional, hubo la necesidad de utilizar el reactivo TBTU para activar el AA el cual genera una especie más reactiva que facilitó el proceso de acople, mientras que con el uso de microondas siempre el AA fue activado con DCC en presencia de HOBt. Además las reacciones de desprotección mostraron ser más rápidas con el uso de microondas (Figura 2-2 A) que en la síntesis convencional.

Figura 2-2: A) Tiempo requerido en las reacciones de desprotección empleando las dos técnicas y B) número de ciclos necesarios para completar las reacciones de acople.



El desanclaje mostró ser una etapa importante en la obtención del péptido. En el proceso de precipitación y lavado con éter, es evidente que deben existir pérdidas del péptido crudo el cual pudo permanecer disuelto. Adicionalmente, durante el proceso es importante tener presente que los lavados deben hacerse con bastante cuidado para evitar una reducción en el rendimiento. Tal fue el caso de la síntesis 3, donde por un error

operacional se perdió una porción de éter durante los lavados lo cual repercutió en una disminución acentuada del rendimiento del crudo (54,8%).

Tras los lavados y posterior evaporación del éter residual se realizó la caracterización del péptido crudo mediante RP-HPLC (Figura 2-3-a). Se obtuvieron perfiles cromatográficos con una señal principal que mostró una especie mayoritaria en un $t_R = 8,4$ min y que se encontraba con una pureza entre el 59 % y el 80 % (Tabla 2-2). Además se pudo distinguir algunas señales con menor intensidad y mayor tiempo de retención, probablemente atribuidas a especies peptídicas en las cuales no fue eficiente la remoción de los grupos protectores de las cadenas laterales de los AAs presentes en la secuencia. Posteriormente, el proceso de caracterización mostró que la señal principal sí correspondía al acetilhexapéptido-3, lo cual indica que el proceso de síntesis fue adecuado.

Tabla 2-2: Péptido obtenido en las 4 diferentes síntesis con los respectivos rendimientos.

DATOS	SÍNTESIS 1 (convencional)	SÍNTESIS 2	SÍNTESIS 3	SÍNTESIS 4
Rink amida 0,46 meq/g	200 mg	800 mg	600 mg	400 mg
Péptido teórico	81,7 mg	326,9 mg	245,2 mg	163,5 mg
Péptido crudo	80,4 mg	298,5 mg	134,5 mg	158,5 mg
Rendimiento Crudo	98,4%	91,3%	54,8%	96,9%
Pureza crudo	59%	64%	80%	70%
Rendimiento alta pureza	29,8%	40,1%	36,2%	28,8%
Rendimiento baja pureza	15,9%	23,8%	16,8%	4,56%
Rendimiento purificación	45,8%	63,9%	53,0%	33,4%

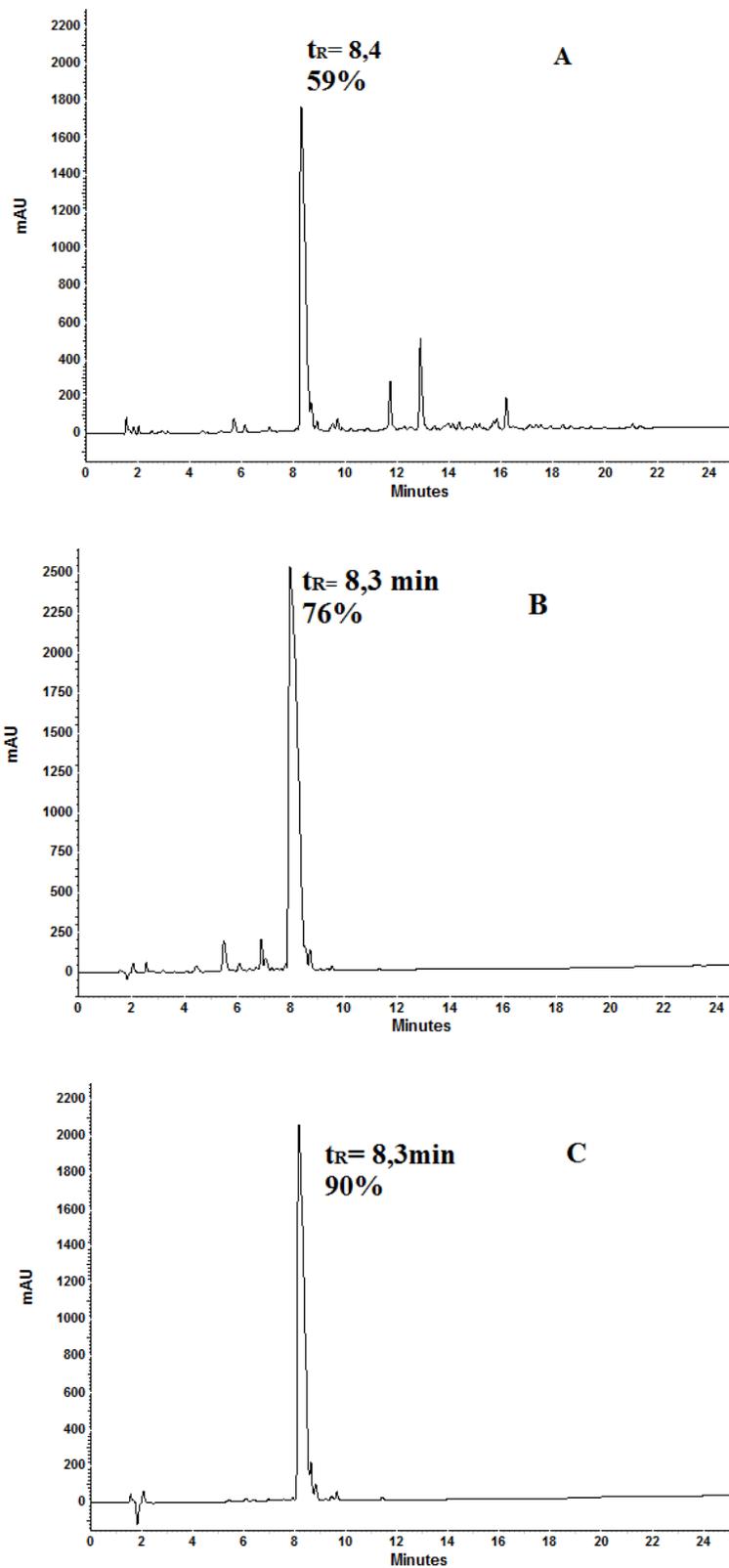
2.3.2 Proceso de purificación

En general el análisis por RP-HPLC de los péptidos crudos de todas las síntesis mostró un t_R de la señal que correspondía al acetilhexapéptido-3 entre 8 y 8,5 min. Este dato orientó el desarrollo de un programa de purificación (Tabla 2-3) basado en el porcentaje de acetonitrilo (ACN) que presentaba en ese momento la fase móvil, el cual permitió la elución del péptido de la columna cromatográfica. Tomando como modelo la síntesis 2, en el gradiente de elución del método cromatográfico se encontró que a un $t_R=8,2$ min el porcentaje de acetonitrilo era alrededor de 11,5 % el cual debía ser extrapolado para el programa de elución en el cartucho Super Clean LC-18.

Tabla 2-3: Programa de purificación para el acetilhexapéptido-3 crudo mediante RP-SPE.

Fracción No	% ACN	Volumen total (mL)
1	0	12
2	0,5	12
3	1	12
4	1,5	12
5	2	12
6	2,5	12
7	3	12
8	3,5	12
9	4	12
10	4,5	12
11	5	12
12	5,5	12
13	6	12
14	7	12
15	8	12
16	12,5	24
17	25	24
18	50	12

Figura 2-3: Perfiles cromatográficos de los péptidos a) crudo, b) fracción de baja pureza y c) fracción de alta pureza de la síntesis 2.



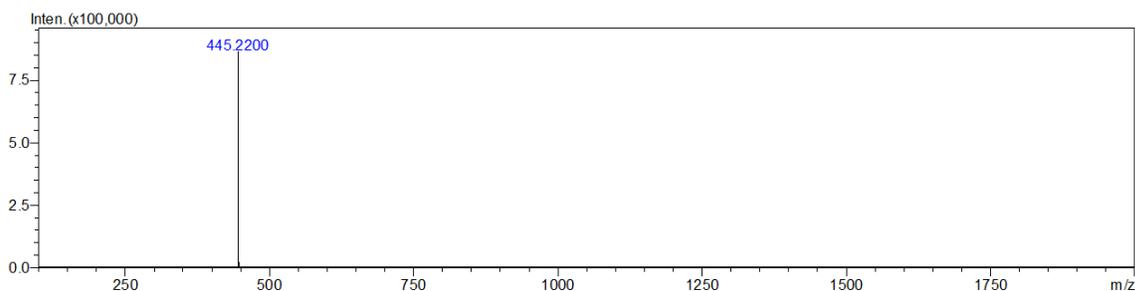
Del programa se obtuvieron 18 fracciones de las cuales se analizaron aquellas del rango de elución entre 1 % y 6 % (fracciones 3 al 13) encontrándose que en las fracciones 5 a 9 estaba presente el péptido con una pureza superior al 85 %. Estas fracciones fueron reunidas y denominadas fracción de alta pureza, mientras que aquellas con pureza entre el 70 % y el 85% (fracciones 4, 10, 11 y 12) se unieron en la fracción de baja pureza.

Las fracciones que tuvieron una pureza menor al 70 % (fracciones 1-3, y 13-18) se trataron de re-purificar aunque se demostró que lo que se obtenía no era significativo y por tanto se determinó que descartar aquellas fracciones era lo más adecuado. Además se notó que las señales de interés (tiempos cercanos a 8,5 min) que resultaban del análisis cromatográfico tenían absorbancias pequeñas (< 100) lo que demuestra una baja abundancia relativa del péptido en la fracción descartada.

Los resultados muestran que con la metodología empleada de síntesis y purificación, se puede obtener acetilhexapéptido-3 con una pureza no menor al 90 % con rendimientos estimados entre el 30 % y el 40 %. Los rendimientos y la pureza obtenidos en la síntesis del acetilhexapéptido-3 indican que la metodología utilizada es adecuada y que posibilita el escalamiento para la obtención de mayores cantidades. Sin embargo es importante revisar siempre la integridad de los cartuchos utilizados, ya que muchas veces se pueden saturar con contaminantes de los solventes y no retener el péptido. Por ejemplo, en la síntesis 4, se utilizó un cartucho que no retuvo el péptido lo cual produjo una importante baja en el rendimiento total.

Figura 2-4: Espectro resultado de análisis MS-IT-TOF con inyección directa de la fracción de mayor pureza de la síntesis 2.

ESI [+]

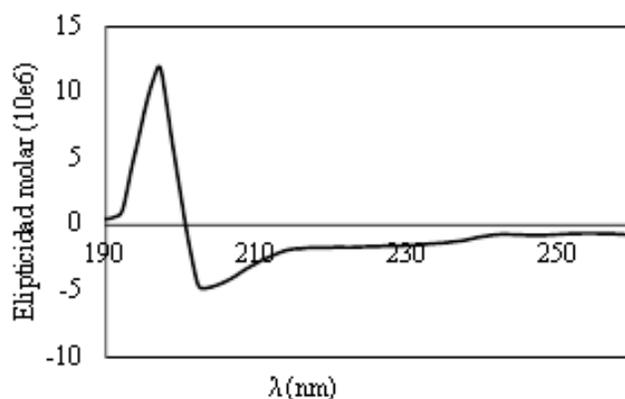


2.3.3 Caracterización del péptido

Las fracciones de mayor pureza fueron caracterizadas mediante ES-MS y DC. En los resultados se observa una señal registrada en el espectro de masas (445,22 m/z) que corresponde al $(m+2)/2$, por tanto la masa molecular del péptido corresponde a 888,44 m/z, la cual es equivalente a la calculada teóricamente (Figura 2-4).

Con respecto al análisis por DC del Acetilhexapéptido-3 (Figura 2-5), se observó dos mínimos en 203 nm, 230 nm y un máximo en 197 nm, que sugieren que a pesar de ser una secuencia de apenas seis AA, presenta elementos de estructura secundaria característicos de una estructura α -hélice, la cual podría estar relacionada con su mecanismo de acción que es la inhibición de la formación del complejo SNARE.

Figura 2-5: Espectro de DC de la fracción de alta pureza de la síntesis 3.



3 Diseño del sistema liposomal

3.1 Introducción

A partir de la década de 1930 la dilucidación de la estructura celular que exhibió el protagonismo de los PLs como constituyentes de la membrana celular, encaminó a Bhagman y colaboradores a descubrir los liposomas por medio de la observación de la organización espontánea de PLs en medios acuosos. El término -liposoma- apareció por primera vez en 1968 en el artículo de la *Journal of Lipids Research*, producto de la tesis pos-doctoral de Weissmann, colaborador de Bhagman (114). A partir de este momento inició un crecimiento exponencial de estudios que sugirieron las ventajas de los liposomas para ser utilizados en cosméticos y como sistemas de liberación de fármacos. Esto se hizo evidente a finales de los años 70 s con la salida de los primeros productos al mercado (92,114), en donde ya se apreciaba la capacidad de estos sistemas para encapsular tanto activos hidrofílicos como lipofílicos, demostrando su versatilidad para ser utilizados por diferentes vías de administración como la oral, tópica y parenteral.

Como se vió en el capítulo 1, los liposomas son una estrategia en la cual nos podemos apoyar para favorecer la permeabilidad de PAs a través de la piel. Enfocándose estrictamente en la ruta transdérmica, se han diseñado liposomas modificados que facilitan más eficientemente el paso de sustancias a través de la piel, como en el caso de los liposomas flexibles, los que se pueden deformar para atravesar los canales lipofílicos del SC.

En el presente capítulo se reportan los datos de una aproximación al diseño y desarrollo de un sistema liposomal enfocado a la administración de activos de carácter hidrofílico. El diseño se basa en las características que deben cumplir los liposomas en lo que se refiere principalmente al tamaño el cual podría favorecer su paso a través de la piel. Con este propósito la aproximación inicial se realizó con sistemas liposomales vacíos.

3.2 Materiales, equipos y métodos

3.2.1 Materiales

L- α -fosfatidilcolina de soya (PC), colato de sodio (CS), deoxicolato de sodio (DCS) y colesterol (Chol) obtenidos de SIGMA®. Éter etílico (Honeywell Burdick and Jackson); solución salina estéril 0,9%; agua para inyección.

3.2.2 Equipos

Sonicador de vástago Q-sonica 125

Rotavapor Buchi® modelo R

Zsizer Nano ZS®

Celdas para medición de tamaño DTS0012

Celdas para medición de potencial zeta DTS1061

Agitador de vórtice IKA® VORTEX 3

Liofilizador Labconco®

3.2.3 Métodos

3.2.3.1 Ensayos preliminares

Los ensayos preliminares se orientaron a fijar las condiciones que se mantendrían constantes en las dos etapas críticas del proceso de fabricación por la inversión de fase por evaporación del solvente, metodología seleccionada debido a los buenos resultados obtenidos para la encapsulación de moléculas hidrofílicas (109). En la etapa de formación de la emulsión w/o se fijó la proporción volumétrica de las fases acuosa (agua) y orgánica (éter) y se varió la cantidad de PC en 8 ensayos realizados por duplicado. La PC fue disuelta en el éter en donde posteriormente fue inyectada la fase acuosa con ayuda de una jeringa de aguja 22G. El vial con la dispersión fue introducido en un baño de hielo y es sonificado a 87,5W con frecuencia de 20 KHz durante ciclos de 45 s con periodo de latencia de 15 s, hasta que se hizo evidente la formación de una emulsión homogénea. Inmediatamente después, se midió el tiempo en que se inició la separación de las fases del sistema.

En la etapa de evaporación del solvente se utilizaron las emulsiones que fueron físicamente estables por más de 30 min, las cuales fueron vertidas en un balón y evaporadas a diferentes condiciones de temperatura, velocidad de rotación y el tiempo de evaporación.

3.2.3.2 Diseño experimental

Teniendo en cuenta las condiciones previamente definidas, para obtener sistemas liposomales vacíos se propuso un diseño factorial a dos niveles (alto y bajo) de tres variables independientes. La cantidad de lípidos utilizados en cada formulación, el tipo de tensioactivo utilizado y su proporción en relación a la PC, fueron las variables evaluadas en el experimento, las cuales se consideraron como las que tenían la mayor influencia en las variables respuesta medidas (Tabla 3-1).

Tabla 3-1: Variables independientes contempladas en el diseño experimental.

Variables	Nivel (código)	
	Bajo (0)	Alto (1)
A = PC + tensioactivo	100 mg	200 mg
B = Tipo de tensioactivo	CS	DCS
C = Relación tensioactivo : PC	1:9	2:8

Los niveles de la variable A se determinaron con los ensayos preliminares; el nivel bajo se estableció con el proceso de optimización de la emulsión w/o mientras que el nivel alto fue encontrado como la máxima concentración permitida por este método para no interferir en el proceso de evaporación del solvente, debido a que se genera alta viscosidad en el sistema. Los niveles de las variables independientes B y C fueron definidos basados en la literatura (75,119,120), y fueron seleccionadas de las proporciones trabajadas con mayor frecuencia por los diferentes investigadores.

Tabla 3-2: Unidades experimentales del diseño 2³.

PC+tensioactivo (mg)	CS		DSC	
	10%	20%	10%	20%
100	Experimento I	Experimento II	Experimento III	Experimento IV
200	Experimento V	Experimento VI	Experimento VII	Experimento VIII

La influencia de las variables independientes en las características del sistema liposomal obtenido se determinaron mediante tres variables respuesta. Y_1 = tamaño de vesícula (nm), Y_2 = Índice de polidispersidad y Y_3 = potencial Zeta (mV) cuyos valores se obtuvieron de la caracterización de los liposomas. De esta manera se puede plantear un diseño experimental factorial de tres factores a dos niveles tipo 2^3 , del cual se deriva un ensayo de 8 experimentos con tres variables respuesta.

Sin embargo, trabajar con ocho experimentos, cada uno por triplicado, con etapas de elaboración relativamente complejas y un proceso laborioso para la determinación de las variables respuesta, hace que el trabajo sea muy extenso. Por tanto se decidió hacer una reducción en el número de experimentos, recurriendo a la utilización de un diseño factorial reducido tipo 2^{p-k} donde $P=3$ y $K=1$ (121). En este diseño se reduce el número de experimentos a cuatro (121,122) mediante la asociación de los ocho posibles en dos grupos, que resultan de usar el contraste de definición basado en la interacción de los tres factores (A, B y C) el cual es conocido como el *generador del diseño* (122), como se puede ver en la Tabla 3-3.

Tabla 3-3: Combinaciones de tratamientos para el diseño 2^3 .

Tratamientos	Efecto factorial								Experimento
	I	A	B	C	AB	AC	BC	ABC	
A	+	+	-	-	-	-	+	+	V
B	+	-	+	-	-	+	-	+	III
C	+	-	-	+	+	-	-	+	II
AB	+	+	+	-	+	-	+	-	VII
AC	+	+	-	+	-	+	-	-	VI
BC	+	-	+	+	-	-	+	-	IV
ABC	+	+	+	+	+	+	+	+	VIII
1	+	-	-	-	+	+	+	-	I

De estos dos grupos se seleccionó uno y los resultados de su análisis permiten determinar los efectos principales de cada factor en la variable respuesta, aunque no es posible definir las posibles interacciones entre factores, una de las limitaciones que presenta el diseño factorial reducido (121,122). Por tanto, para construir el experimento se pueden utilizar los cuatro tratamientos con coeficiente (+) o lo cuatro con coeficiente (-) de el generador del diseño ABC.

Para el trabajo se eligió el grupo de signo (+) que tiene los 4 experimentos V, III, II y VIII, los cuales correspondieron a las formulaciones F1, F2, F3 y F4 para el desarrollo de los sistemas liposomales (Tabla 3-4).

Tabla 3-4: Matriz de tratamientos para las unidades experimentales.

Experimento	Formulación	A	B	C
V	F1	1	0	0
II	F2	0	0	1
III	F3	0	1	0
VIII	F4	1	1	1

Como se observa en la Tabla 3-5 adicional a las cuatro formulaciones descritas, se realizó la formulación F5 para evaluar la presencia de un agente que afecta las características del liposoma, haciéndolo más rígido. Para ello se empleó Chol, que se utiliza a menudo en proporciones entre el 15 y el 40% en relación con la PC. Se decidió utilizarlo al 20% y mantener la cantidad de lípidos totales de 100mg. De otra parte, se trabajó la formulación F6, en la cual se utilizó únicamente PC para la elaboración de un sistema liposomal de referencia.

Tabla 3-5: Formulaciones empleadas en el desarrollo del sistema liposomal.

Formulación	PC (mg)	CS (mg)	DCS (mg)	Chol (mg)	Éter (mL)	API (mL)
F1	180	20	-	-	12	4
F2	80	20	-	-	12	4
F3	90	-	10	-	12	4
F4	160	-	40	-	12	4
F5	80	-	-	20	12	4
F6	100	-	-	-	12	4

3.2.3.3 Elaboración de liposomas

Los liposomas se prepararon por el método de formación de una emulsión y posterior evaporación del solvente orgánico, conocido como método de Inversión de fase por evaporación (111). De acuerdo a cada formulación se disolvió la cantidad de constituyentes lipofílicos (PC o Chol) en 12 mL de éter, mientras que los tensioactivos (CS y DCS) se disolvieron en 4 mL de agua para inyección (API). La fase acuosa se inyectó rápidamente a la fase orgánica utilizando una jeringa de 5mL con aguja 22G y el

sistema se sometió al proceso de homogenización por ultrasonido (Q-sónica 125) utilizando a una intensidad de 87,5 w y sumergiendo el recipiente en baño de hielo. Así se obtuvo una emulsión w/o. A continuación, cada sistema fue sometido a un proceso de evaporación empleando un rotavapor (Buchi® modelo R) con vacío a 35°C, hasta que fue evidente la aparición de un gel. Este producto, fue agitado mecánicamente usando un agitador vortex (IKA® VORTEX 3), hasta inducir la inversión de fase (123) donde el gel se convierte en un líquido de alta fluidez. Seguidamente, el sistema se somete al proceso de evaporación a las condiciones establecidas (Tabla 3-7) para eliminar el éter residual. Los productos fueron envasados en recipientes de vidrio y almacenados en ausencia de luz a 4°C.

3.2.3.4 Caracterización de liposomas

El diámetro promedio y el índice de polidispersidad (PDI) fueron medidos en el Zeta Sizer® Nano ZS (Malvern Instruments). Para el diámetro promedio se utilizó la celda DTS0012 en donde se dispusieron cerca de 1mL de la muestra diluida con NaCl 0,1% hasta obtener una concentración de lípidos de 5mg/mL. El tipo de medida fue automática, con 3 mediciones del equipo por lectura y las lecturas por replica fueron 3, por lo que se obtuvieron para cada muestra 9 mediciones. El potencial Zeta fue medido en el mismo equipo utilizando la celda DTS1061 con la muestra diluida con NaCl 0,1% hasta 2 mg/mL de lípidos con duración automática. Se realizaron 3 mediciones por lectura y 3 lecturas por replica.

3.3 Presentación y discusión de resultados

3.3.1 Ensayos preliminares

En los ensayos preliminares se fijaron las condiciones del proceso de fabricación en dos etapas fundamentales como son la formación de la emulsión primaria y la evaporación del solvente ya que antes del desarrollo del diseño experimental es importante determinar las condiciones que estarán fijas durante el ensayo.

En el proceso de optimización de emulsión w/o se eligió la proporción del solvente acuoso en relación con el solvente orgánico (éter). Esta proporción fue determinada de la revisión exhaustiva en artículos de investigación y principalmente en el artículo donde

reportan la invención del método de fabricación elegido (111), en donde el volumen de éter en la formación de la emulsión debe ser 3 veces mayor al volumen de la fase acuosa. De esta manera se determinó que era conveniente trabajar con suspensiones liposomales de 4mL de fase acuosa, el cual permitió realizar caracterización de las variables respuesta. También se determinó la cantidad mínima de PL formador que mantuvo la emulsión primaria estable al menos 30 min luego del proceso de sonicación.

Se elaboraron 8 sistemas w/o, los cuales se homogenizaron con ultrasonido a diferentes tiempos. Se determinó que 5 ciclos (45 s efectivos y 15 s de latencia) era el periodo suficiente para formar la emulsión. En la Tabla 3-6 se muestra el tiempo que permanecieron estables cada uno de los sistemas. El criterio de estabilidad física definido para estos sistemas, fue que no existiera indicio visual permaneciera de separación de las fases por lo menos 30 minutos luego del proceso de sonicado. De esta forma se determinó que conservando esa relación volumétrica de las fases era conveniente trabajar con una cantidad mínima de 80 mg de PC en los ensayos posteriores.

Tabla 3-6: Emulsiones formadas para determinar la cantidad mínima de PC a utilizar.

Condiciones	ENSAYO							
	1	2	3	4	5	6	7	8
PC (mg)	20	40	60	80	100	150	200	400
Agua (mL)	4	4	4	4	4	4	4	4
Éter etílico (mL)	12	12	12	12	12	12	12	12
T Sonicación (seg)	225	225	225	225	225	225	225	225
Estabilidad (min)	< 1	< 1	12	30<	30<	30<	30<	30<

La elección de condiciones de otra etapa del método de fabricación como la evaporación del solvente, se fundamentó en que la cantidad de éter residual en el sistema liposomal fuera nula, que la evaporación del agua del sistema fuera mínima (que se mantengan los 4mL luego de la evaporación) y que haya evidencia de la estructura de gel. Tras varias pruebas fue posible determinar las condiciones apropiadas para llevar a cabo este proceso. Los resultados de las condiciones determinadas para cada una de las etapas del método de fabricación se muestran en la Tabla 3-7.

Tabla 3-7: Condiciones fijas en el desarrollo de los experimentos.

Etapa	Variable	Condiciones	Equipo
Formación emulsión primaria	Tiempo de Sonicación	5 ciclos de 45 seg efectivos y 15 de receso	Sonicador
Formación emulsión primaria	Potencia de sonicación	87,5 Watts	Sonicador
Evaporación del solvente	Temperatura	35 °C	Rotavapor
Evaporación del solvente	Tiempo	1 h y 30 min	Rotavapor
Evaporación del solvente	Velocidad	150 min ⁻¹	Rotavapor
Inversión de la emulsión	Tiempo agitación	10 seg	Vortex

3.3.2 Obtención y caracterización de liposomas

Los sistemas liposomales fueron obtenidos como dispersiones homogéneas. Los volúmenes obtenidos correspondieron a los 4 mL, que fue la cantidad de fase acuosa agregada desde el inicio del proceso.

Teniendo en cuenta las propiedades fisicoquímicas del éter y las condiciones de agitación, tiempo, temperatura y vacío, en las cuales se llevó a cabo el proceso de evaporación, se consideró que este solvente orgánico fue evaporado en su totalidad. Lo ideal hubiese sido realizar un análisis por cromatografía de gases para la determinación de solvente residual, pero se consideró que para esta aproximación era suficiente mantener las condiciones de la etapa de evaporación. De cualquier manera en caso de que se desee realizar un proceso de producción industrial, la determinación del solvente residual sería un análisis necesario en control de calidad del producto final.

Los resultados de la caracterización de los sistemas liposomales obtenidos son mostrados en la **Tabla 3-8**. Se reportan con el coeficiente de variación (CV) que expresa la relación entre la desviación estándar calculada y el promedio de las tres réplicas. El diámetro promedio de los sistemas liposomales vacíos, se encuentran en el rango de nanómetros. Pensado en su administración tópica y con una adecuada permeación transdérmica, es deseable que las vesículas tengan el tamaño más pequeño posible (75) con un PDI cercano a cero (124). Basados en estos dos parámetros la formulación que

se podría seleccionar para la encapsulación del péptido en posteriores estudios sería la formulación F4.

Tabla 3-8: Resultados de la caracterización de los liposomas.

Formulación	Diámetro promedio nm (CV)	PDI (CV)	Potencial Zeta mV (CV)
F1	513 (10%)	0,340 (0,94%)	-68,2 (2,7)
F2	343 (8,3%)	0,520 (5,3%)	-70,4 (0,85%)
F3	143 (14,8%)	0,424 (5,4%)	-58,1 (5,4%)
F4	147 (5,0)	0,272 (2,9%)	-62,2 (1,6%)
F5	595 (7,6%)	0,416 (2,2%)	-67,6 (2,9%)
F6	756 (7,3%)	0,451 (22%)	-62,3 (2,7)

En cuanto a las formulaciones F5 y F6, mostraron tener un comportamiento diferente a aquellas realizadas con tensioactivos. Aparentemente eran un poco más turbias y su aspecto fue más viscoso. Esto se debe a que los tensioactivos ayudan a mejorar el autoensamblaje de PC, produciendo vesículas de menor tamaño haciéndolas más compatibles frente a los medios acuosos (75). También se corroboró con pruebas de significancia que las diferencias en las características de las formulaciones influían en los valores obtenidos de tamaño y PDI (Anexo A).

El potencial zeta describe la carga superficial de la vesícula y su interacción en un medio acuoso. Este parámetro se considera que es un factor influyente en la estabilidad física del sistema debido a que ciertos valores pueden evitar fenómenos como aglomeración y coalescencia de las vesículas (125). Según los resultados, se encontró que los liposomas elaborados presentan un potencial zeta negativo y los altos valores permitirían que se presenten sistemas altamente dispersos, situación que favorecería su estabilidad física (126). Aunque los valores fueron cercanos entre cada formulación, se realizó un análisis de la varianza (Anexo A) y se encontró con un $P < 0,05$ que se rechaza la hipótesis nula de que las diferencias en las características de la formulación no tienen efectos significativo sobre el potencial Zeta.

3.3.3 Efecto de los variables independientes sobre las variables respuesta

El efecto de los 3 factores sobre las variables respuesta en el diseño factorial reducido fue determinado para las formulaciones F1 a F4, mientras que la caracterización de las formulaciones F5 y F6 sirvió como referencia.

Tabla 3-9: Variables dependientes encontradas en el diseño factorial fraccionado 2^{3-1} .

Formulación	A	B	C	Tratamiento	Tamaño	PDI	P. Zeta
F1	+	-	-	A	513	0,340	-68,2
F2	-	-	+	B	343	0,520	-70,4
F3	-	+	-	C	143	0,424	-58,1
F4	+	+	+	ABC	147	0,272	-62,2

Para la estimación de los efectos de las variables del diseño factorial reducido se utilizó la matriz de efectos Tabla 3-9 que fue realizada para cada variable respuesta (122) utilizando la Ecuación 3-1.

$$AB \dots = \frac{2(l AB \dots)}{4} \tag{3-1}$$

Por ejemplo, la estimación del efecto de A sobre el diámetro promedio de vesícula sería: Efecto A = $2(513-343-143+147)/4 = 87$. Mientras que la suma de cuadrados con un grado de libertad para un efecto factorial fraccionado 2^{n-1} se calcula utilizando la Ecuación 3-2.

$$SC(AB \dots) = \frac{1}{2^{n-1}} (l AB \dots)^2 \tag{3-2}$$

De esta manera se puede construir la tabla donde se relacionan las estimaciones de los efectos con la suma de cuadrados.

Tabla 3-10: Estimación de los efectos de cada factor con la suma de cuadrados (SS).

Factor	Estimación diámetro p.	SS diámetro p.	Estimación PDI	SS PDI	Estimación P. Zeta	SS P. Zeta
A	87	7659	-0,1655	0,0274	-0,90	0,81
B	-284,5	80940	-0,0815	0,0066	9,10	82,81
C	-83,5	6972	0,0135	0,0002	-3,20	10,24

Tabla 3-11: ANOVA para el diámetro promedio.

Fuente	GL	SS	C medio	F cal	F tab	Probabilidad
B	1	80940	80940	11,07	18,5128205	0,0797
Error	2	14631	7314			
Total	3	95569				

Tabla 3-12: ANOVA para el PDI.

Fuente	GL	SS	C medio	F cal	F tab	Probabilidad
A	1	0,0274	0,0274	150,29	161,45	0,0518
B	1	0,0066	0,0066	36,46	161,45	0,1045
Error	1	0,0002	0,0002			
Total	3	0,0342	0,0114			

Tabla 3-13: ANOVA para el Potencial zeta.

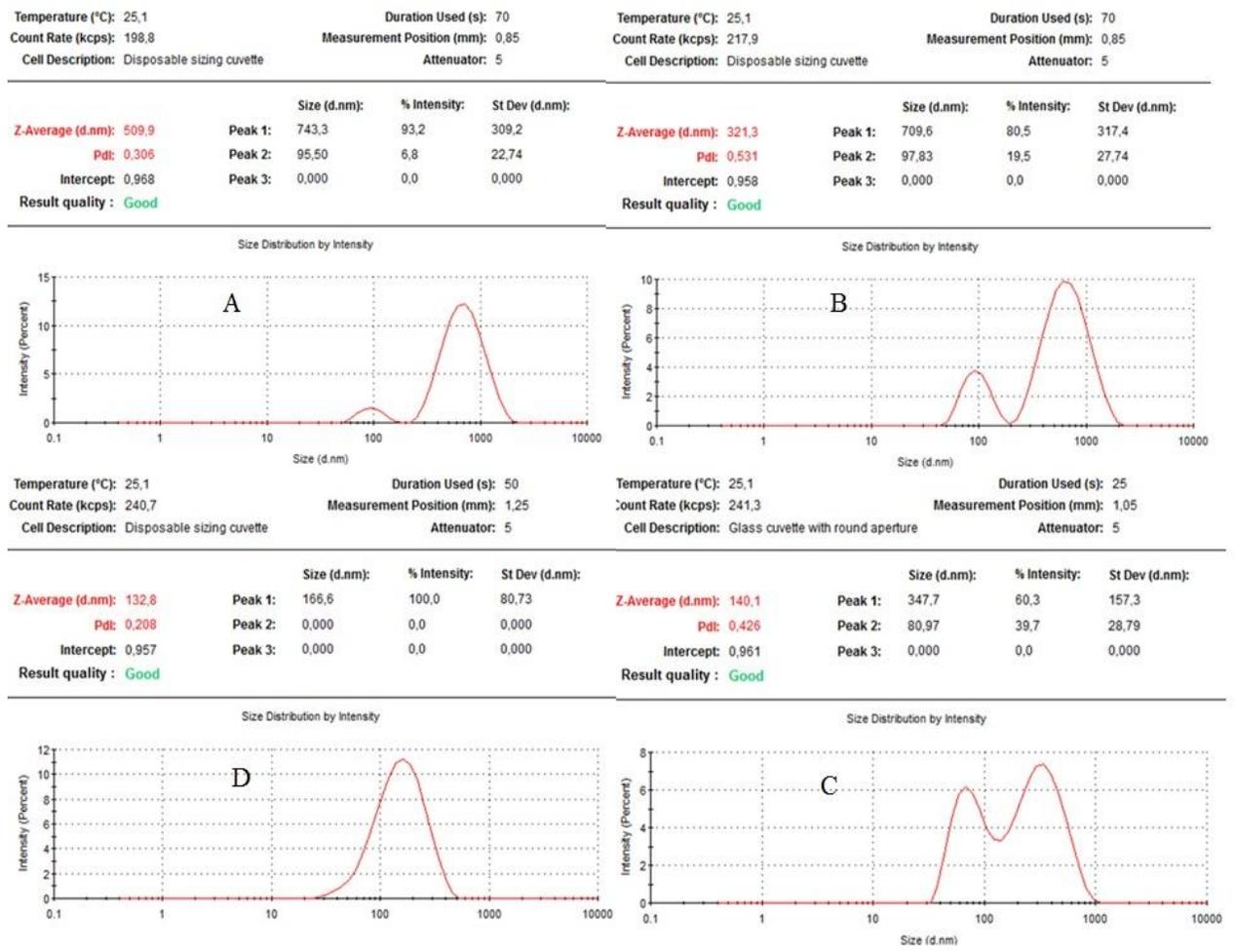
Fuente	GL	SS	C medio	F cal	F tab	Probabilidad
B	1	82,81	82,81	102,23	161,45	0,0628
C	1	10,24	10,24	12,64	161,45	0,1745
Error	1	0,81	0,81			
Total	3	93,86				

El signo de las estimaciones sugiere el efecto del nivel del factor. Por ejemplo el signo negativo del efecto B en la estimación del tamaño sugiere que el nivel bajo de B produce un diámetro promedio mayor en la vesículas o el signo positivo en la estimación del efecto de B en el potencial zeta sugiere que su nivel alto produce mayor potencial zeta en la vesícula. Para hacer una prueba de significancia de los efectos es necesario primero realizar una estimación de la varianza del error experimental. Tal estimación se puede realizar uniendo las sumas de los cuadrados de los efectos que parecen ser insignificantes y con ese dato se puede hacer el análisis de la varianza para cada factor.

Las pruebas de significancia muestran que la hipótesis nula propuesta que dice que los factores analizados no tienen efecto significativo sobre las variables respuesta **no es rechazada** con un $P < 0,05$. Aunque parezca arbitrario se podría aumentar el límite de P ($P < 0,1$) ya que el estudio es un factorial no convencional donde estamos incluyendo en el error los factores que no tienen mucha influencia sobre la respuesta. Con esta suposición se podría rechazar que B no tiene efecto significativo sobre el tamaño de la

vesícula y sobre el potencial zeta y que además se puede rechazar que A no tiene efecto significativo sobre el PDI. Estas conclusiones se pueden reafirmar al revisar las gráficas de las medidas de tamaño (Figura 3-1) realizadas a las 4 formulaciones del diseño. Se nota claramente que los liposomas que incorporaron en su formulación CS (F1 y F2) resultaron más grandes que los realizados con DCS (F3 y F4). También se puede notar que las formulaciones F1, F2 y F3 muestran dos picos (distribuciones binomiales), de lo cual se podría decir que una mayor proporción de DCS (F4) incidiera en una mayor homogeneidad de las vesículas, lo que se ve reflejado en un menor valor del PDI.

Figura 3-1: Mediciones de diámetro promedio de las formulaciones A) F1, B) F2, C) F3 y D) F4.



4 Encapsulación de acetilhexapéptido-3 en liposomas

4.1 Introducción

En el presente capítulo se describe la obtención de liposomas con el acetilhexapéptido-3 encapsulado, su aislamiento y su correspondiente caracterización. También se describe el proceso mediante el cual se realizó una aproximación a los estudios de liberación y permeabilidad *in vitro* mediante un ensayo *ex vivo*.

4.2 Materiales, equipos y métodos

4.2.1 Materiales

Acetilhexapéptido-3 sintetizado; L- α -fosfatidilcolina de soya (PC), colato de sodio (CS), deoxicolato de sodio (DCS) y colesterol (Chol) obtenidos de SIGMA®. Acetonitrilo (ACN) y éter etílico obtenidos de Honeywell Burdick and Jackson. Solución salina estéril 0,9%; buffer de fosfatos pH=7,4 (LONZA®); dispositivos Amicon Ultra 0,5 de 10KDa (Millipore®). Kit de determinación de proteínas de ácido bicinconínico (Micro BCA™ Protein Assay Kit, Pierce Rockfor).

4.2.2 Equipos

Sonicador de vástago Q-sonica 125

Rotavapor Buchi® modelo R

Zsizer Nano ZS®

Celdas para medición de tamaño DTS0012

Celdas para medición de potencial zeta DTS1061

Agitador de vórtice IKA® VORTEX 3

Centrífuga Scientific Megafure 16

Cromatógrafo modular AGILENT® con detector U.V

Lector de microplacas para absorbancia BIORAD

Plancha de agitación multipunto marca IKA modelo RO 10 PS1 Werke

Baño de agua con termostato Memert

Celdas de Franz de 15mL

Calibrador *Stainless hardened*®

4.2.3 Métodos

4.2.3.1 Preparación de liposomas cargados con acetilhexapéptido-3

Los liposomas se prepararon por el método de formación de la emulsión con posterior evaporación del solvente (111) con una modificación respecto a la fabricación de liposomas vacíos, ya que además de incorporar el péptido, se utilizó como fase acuosa una solución de buffer fosfatos 1X pH=7,4 (PBS) filtrado por membrana de 0,22µm en lugar de agua para inyección. Los componentes lipofílicos (PC y el Chol) fueron disueltos en 12 mL de éter mientras que los tensioactivos y el péptido se disolvieron en PBS. La fase acuosa fue inyectada rápidamente a la fase orgánica con una jeringa de 5mL con aguja de 22G. Inmediatamente el sistema bifásico fue sometido a un proceso de homogenización (ultrasonido) y posterior evaporación del solvente orgánico en las condiciones usadas para la elaboración de liposomas vacíos (Tabla 3-7), hasta que fue evidente la aparición de un gel, el cual fue agitado mecánicamente usando un agitador vortex (IKA® VORTEX 3), hasta inducir la inversión de fase (123). El líquido de alta fluidez obtenido fue sometido al proceso de rota evaporación a las condiciones establecidas, para eliminar el éter residual. Los productos fueron envasados en recipientes de vidrio y almacenados en ausencia de luz a 4°C. Cada una de las formulaciones descritas en la Tabla 4-1 fue realizada 9 veces.

4.2.3.2 Preparación de FP5 utilizando el método tradicional

La preparación alterna de un sistema liposomal denominada formulación TFP5 se llevó a cabo mediante el método de hidratación de la película de PC formada. Se utilizaron los mismos componentes que en la FP5. La PC y el colesterol se disolvieron en 12 mL de una mezcla cloroformo: metanol (2:1). La solución resultante se sometió a un proceso de evaporación durante 1 hora a 35°C y una velocidad de 150 min⁻¹, utilizando un balón de 250 mL. Tras interrumpir el vacío se agregaron al balón 4 mL de una solución de péptido 1,25 mg/mL en PBS precalentada a 60°C y se realizó una agitación manual vigorosa y una agitación con vortex (IKA® VORTEX 3). Finalmente, se agitó en el mismo rotavapor a TA y sin vacío durante media hora. Se realizaron 9 réplicas de este sistema.

Tabla 4-1: Formulaciones realizadas para la encapsulación de acetilhexapéptido-3 en liposomas.

Formulación	PC (mg)	CS (mg)	DCS (mg)	Chol (mg)	Éter (mL)	Buffer (mL)	Péptido (mg)
FP1	180	20	-	-	12	4	5
FP2	80	20	-	-	12	4	5
FP3	90	-	10	-	12	4	5
FP4	160	-	40	-	12	4	5
FP5	80	-	-	20	12	4	5
FP6	100	-	-	-	12	4	5

4.2.3.3 Homogenización por ultrasonido

Una vez obtenidas, las 9 réplicas de cada formulación por el método de formación de la emulsión con posterior evaporación del solvente (FP1-FP6) y aquella obtenida con el método tradicional (TFP5), se dejaron en reposo durante dos horas a 4°C. Posteriormente fueron distribuidas en 3 grupos, cada uno sometido a un proceso de homogenización por ultrasonido por tiempos diferentes (0 seg, 45 seg y 135 seg) utilizando el sonicador de sonda (Q-sonica 125) y un baño de hielo. La potencia se mantuvo constante (62,5W).

4.2.3.4 Aislamiento de liposomas

Con el fin de determinar la cantidad de péptido encapsulada en los sistemas liposomales, se procedió a separar los liposomas, del medio de dispersión mediante la técnica de diafiltración (Figura 4-1). La membrana de los dispositivos AMICON ULTRA® 0,5

(Millipore Ultracel-10 kDa) fue preparada mediante centrifugación con NaOH 0,1M, con posteriores lavados con API. Con los dispositivos listos se midió el porcentaje de recuperación del péptido en solución y posteriormente se determinó la eficiencia de encapsulación.

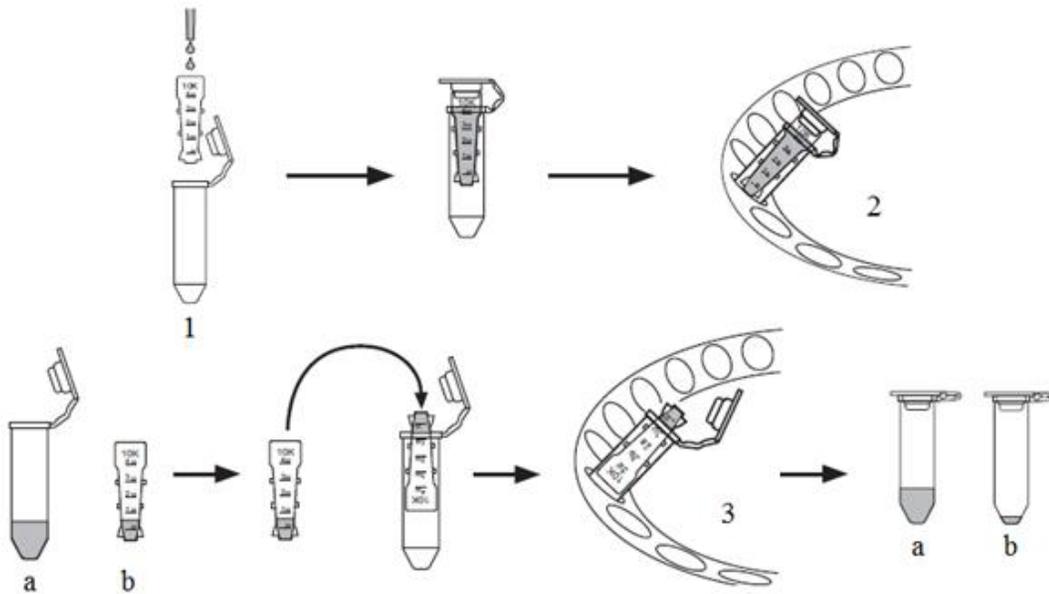
4.2.3.4.1 Porcentaje de recuperación

Se colocaron en un dispositivo AMICON, 50 μ L de solución de acetilhexapéptido-3 (1,25 mg/mL en PBS) junto con 200 μ L adicionales de PBS. Se centrifugó (Thermo Scientific™ Heraeus Megafuge 16) durante 20 min a 14.000g. El dispositivo fue lavado con 100 μ L de PBS y centrifugado durante 20 min adicionales. El líquido filtrado fue pesado y cuantificado por HPLC-RP.

4.2.3.4.2 Eficiencia de encapsulación

Al día siguiente del proceso de fabricación y homogenización por sonicación, fueron vertidos en cada dispositivo 50 μ L de dispersión liposomal junto con 200 μ L de PBS (Figura 4-1-1) para realizar la filtración facilitada por centrifugación (Thermo Scientific™ Heraeus Megafuge 16) durante 30 min a 14.000g (Figura 4-1-2). El sedimento se lavó con 100 μ L de PBS y se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones.

Figura 4-1: Proceso de Diafiltración de liposomas cargados. Al final son obtenidos el filtrado (a) y el sedimento (b).



El filtrado recogido de las dos centrifugaciones fue pesado y congelado para su posterior cuantificación, mientras que el sedimento se obtuvo mediante una centrifugación del dispositivo invertido sobre un tubo Eppendorf® de 1,5 mL (Figura 4-1-3).

Con el propósito de alterar la estructura de los liposomas del sedimento y favorecer la liberación del péptido atrapado en su interior, se les adicionó 200 µL de Tritón X-100 (2%) para ser agitados y calentados a 65°C durante 10 minutos. Tanto el péptido no encapsulado como el péptido encapsulado, fueron cuantificados mediante RP-HPLC y se calculó la eficiencia de encapsulación (EE) utilizando la Ecuación 4-1. La EE se determinó de esta forma únicamente para la formulación FP1, y se encontró que la suma de la cantidad de péptido encapsulado más el no encapsulado, fue cercana la cantidad de péptido inicial. Por esta razón se decidió realizar la determinación de EE de manera indirecta, utilizando la Ecuación 4-2, es decir únicamente con la cuantificación del péptido no encapsulado.

$$EE\% = \frac{\text{péptido encapsulado}}{\text{péptido total}} \quad (4-1)$$

$$EE\% = \frac{\text{péptido total} - \text{péptido no encapsulado}}{\text{péptido total}} \quad (4-2)$$

4.2.3.5 Caracterización de liposomas

De manera similar al desarrollo de los sistemas liposomales vacíos, el diámetro promedio de vesícula, el PDI y el potencia zeta fueron medidos utilizando el Zeta Sizer® Nano ZS (Malvern Instruments). Las condiciones de dilución, las celdas utilizadas y las condiciones de medida fueron las mismas.

4.2.3.6 Diseño experimental

En el diseño para la encapsulación del péptido, se definieron 4 variables independientes, que incluye las mismas 3 del diseño elaborado para liposomas vacíos y una adicional escogida para evaluar el efecto del tiempo de homogenización por ultrasonido. La influencia de estas 4 variables (Tabla 4-2) sobre el sistema liposomal con el péptido encapsulado fue determinada con 3 variables respuesta. Y_1 : diámetro promedio de vesícula (nm), Y_2 : PDI y Y_3 : Eficiencia de encapsulación. El potencial zeta de las

formulaciones también fue determinado, pero no se consideró como variable respuesta en el diseño experimental debido a que no se hicieron las mediciones de todos los ensayos a diferentes tiempos de homogenización final. En la Tabla 4-3 se muestran los tratamientos que se hicieron para las 6 formulaciones FP1-FP6, y la TFP5, cada una sometida a 3 diferentes tiempos de homogenización por sonicación.

Para medir la influencia del proceso de homogenización (variable independiente D) se usó un diseño factorial dos factores completo (formulaciones y tiempo de sonicación) incluyendo las 3 repeticiones como bloques.

Tabla 4-2: Variables independientes contempladas en el diseño experimental para encapsulación del péptido.

Variables	Nivel (código)		
	Bajo (0)	Alto (1)	Alto (2)
A = PC (mg) + Tensioactivo (mg)	100	200	-
B = Tensioactivo	CS	DCS	-
C = Tensioactivo : PC	1:9	2:8	-
D = Tiempo homogenización (seg)	0	45	135

4.2.3.7 Evaluación preliminar *ex vivo* de permeabilidad

4.2.3.7.1 Obtención de piel de cerdo

Se adquirieron orejas de cerdo frescas, las cuales se lavaron con agua potable. Se cortaron de tal modo que se facilitara su manejo y sobre una tabla de cocina se procedió a desprender el cartílago de la piel de la parte interna de la oreja, con la precaución de no afectar su integridad. De esta manera se obtuvieron trozos de piel de cerca de 1 mm de espesor a los cuales se les retiró la mayor parte de la capa de grasa con ayuda de un escalpelo hasta obtener membranas cuadradas con una superficie de 4cm² con un espesor entre 250 µm y 400 µm el cual fue medido con un calibrador *Stainless hardened*® posteriormente las membranas fueron envueltas en gasas estériles y sumergidas en PBS para ser almacenadas a -20°C hasta el momento de su utilización.

4.2.3.7.2 Condiciones del ensayo

Se emplearon celdas de Franz, elaboradas sobre medida en vidrio soplado con un área de difusión promedio de 1,62 ± 0,07 cm², con un compartimento receptor 15,5 ± 0,8 mL

que se ensamblaron sobre una plancha de agitación multipunto marca IKA modelo RO 10 PS1 Werke. La temperatura durante todo el ensayo fue ajustada a 32°C mediante un baño de agua proveniente de un sistema termostato Memert. La solución del compartimento receptor que contenía PBS, se mantuvo en agitación constante a 400 rpm. Para el ensayo se utilizó como membrana la piel de cerdo previamente obtenida la cual se descongeló durante media hora en solución de PBS a 50°C.

Tabla 4-3: Matriz de tratamientos para cada unidad experimental en la encapsulación del péptido.

		VARIABLES			
Formulación	Ensayo	A	B	C	D
FP1	FP1-0	1	0	0	0
	FP1-45	1	0	0	1
	FP1-135	1	0	0	2
FP2	FP2-0	0	0	1	0
	FP2-45	0	0	1	1
	FP2-135	0	0	1	2
FP3	FP3-0	0	1	0	0
	FP3-45	0	1	0	1
	FP3-135	0	1	0	2
FP4	FP4-0	1	1	1	0
	FP4-45	1	1	1	1
	FP4-135	1	1	1	2
FP5	FP5-0	0	-	-	0
	FP5-45	0	-	-	1
	FP5-135	0	-	-	2
FP6	FP6-0	0	-	-	0
	FP6-45	0	-	-	1
	FP6-135	0	-	-	2
TFP5	TFP5-0	0	-	-	0
	TFP5-45	0	-	-	1
	TFP5-135	0	-	-	2

En cada compartimento donador se dispuso 1 mL de la muestra, que consistió en una solución de acetilhexapéptido-3 en PBS o el sistema liposomal correspondiente a la FP1. De cada uno se realizaron tres réplicas (n=3). Se llevó a cabo 7 muestreos, tomando una alícuota de $1,00 \pm 0,01$ mL, con reposición inmediata por fluido fresco; Las muestras fueron tomadas al minuto 30, 60, 90, 150, 210, 330 y 450 luego de iniciado el ensayo.

4.2.3.8 Determinación de eficiencias de encapsulación con micro BCA

Para realizar una cuantificación alterna para el acetilhexapéptido-3 a la realizada por PR-HPLC, se utilizó el Kit de micro BCA (Micro BCA™ Protein Assay Kit, Pierce). 150 µL del filtrado obtenido del proceso de purificación se vertieron en un pozo de una microplaca estéril de 96 pozos con 150 µL de la solución de trabajo compuesta de 25 partes de solución A (buffer de tartrato-carbonato alcalino), 24 partes de solución B de (ácido Bicinconínico), y 3 partes de solución C (sulfato de cobre). La placa se mantuvo durante dos horas a 37°C y luego se leyó en el lector de microplacas para absorbancia BIORAD a 562 nm. En la misma placa se realizaron curvas de calibración con soluciones de albúmina y acetilhexapéptido-3. Cada determinación se realizó por triplicado (n=3).

4.3 Presentación y discusión de resultados

4.3.1 Preparación de acetilhexapéptido-3 en liposomas

Los sistemas liposomales se han empleado como una de las estrategias para superar las limitaciones atribuidas a las propiedades fisicoquímicas de algunos activos. Los péptidos sintéticos no han sido ajenos a este desarrollo y han sido objeto de numerosos estudios con estos sistemas (99). En esta parte del trabajo se obtuvieron diversas formulaciones de liposomas cargados con acetilhexapéptido-3, los cuales aparentemente fueron similares a los sistemas vacíos, aunque algunas formulaciones parecían un poco más turbias. Su caracterización en cuanto a diámetro promedio y PDI sugirió una aparente diferencia sobre los sistemas vacíos que tenían una fase acuosa conformada por API. Por tanto se realizaron pruebas de significancia (Anexo B) de donde se pudo rechazar la hipótesis nula de que la encapsulación del péptido y la presencia del PBS no afectan las características de las vesículas.

En general se pudo evidenciar un aumento en el diámetro promedio de vesícula respecto a los sistemas vacíos (Tabla 4-4), especialmente en las formulaciones que contenían tensioactivos (FP1 – FP4) mientras que las formulaciones con Chol (FP5) y la realizada únicamente con PC (FP6) mostraron un tamaño menor. En primera instancia se podría sugerir que el aumento de tamaño se puede atribuir al espacio que puede ocupar el acetilhexapéptido-3 en el reservorio interno hidrofílico. También se ha considerado que existe un efecto de la fuerza iónica del PBS sobre la capacidad de encapsulación de los

liposomas de PAs el cual sugiere que entre mayor sea la fuerza iónica menor será la EE (111). Los datos indican que la presencia del PBS, influiría también en el tamaño de las vesículas y su homogeneidad durante el proceso de elaboración. El análisis de la varianza (Anexo B) indica que debe rechazarse la hipótesis nula de que las diferencias en la formulación y la presencia del péptido en ellas no tienen efectos significativos sobre el diámetro promedio y sobre el PDI de las vesículas liposomales.

Tabla 4-4: Tabla comparativa de la caracterización entre los liposomas vacíos (F1 - F6) y liposomas cargados (FP1-0 – FP6-0)

Formulación	Diámetro promedio en nm (CV)	PDI (CV)	Potencial Zeta en mV (CV)
F1	513 (10%)	0,340 (0,94%)	-68,2 (2,73)
F2	343 (8,3%)	0,520 (5,3%)	-70,4 (0,85%)
F3	143 (14,8%)	0,424 (5,4%)	-58,1 (5,4%)
F4	147 (5,0)	0,272 (2,9%)	-62,2 (1,6%)
F5	595 (7,6%)	0,416 (2,2%)	-67,6 (2,9%)
F6	756 (7,3%)	0,451 (22,9%)	-62,3 (2,7)
FP1-0	647 (9,5%)	0,476 (8,3%)	-56,1 (1,9%)*
FP2-0	670 (4,4%)	0,386 (2,7%)	-60,1 (3,3%)*
FP3-0	447 (1,5%)	0,555 (9,1%)	-50,5 (2,8%)*
FP4-0	333 (3,2%)	0,331 (9,3%)	-57,9 (1,16%)*
FP5-0	473 (6,2%)	0,523 (10,8%)	No determinada
FP6-0	516 (9,3%)	0,556 (9,3%)	-48,1 (2,0)*

* Datos obtenidos de las formulaciones con 135 segundos de homogenización.

4.3.2 Aislamiento de Liposomas

4.3.2.1 Porcentaje de recuperación

Con la determinación del porcentaje de recuperación (Tabla 4-5), que estuvo dentro de los ensayos preliminares realizados para la estandarización del proceso de aislamiento de liposomas, se logró comprobar que el péptido atravesaba adecuadamente la membrana del dispositivo AMICON y además dio una idea sobre los tiempos de centrifugación necesarios para minimizar la cantidad de solución acuosa que permanece con los liposomas purificados, ya que por las características del dispositivo usado, siempre van a quedar unos pocos microlitros que no se pueden filtrar. Cuando se realizó el porcentaje de recuperación se determinó que el tiempo de centrifugación debía ser alrededor de media hora (incluyendo el lavado con 100 μ L) pero en el momento del

aislamiento de los liposomas, se encontró que era necesario centrifugar un tiempo mayor (una hora).

Tabla 4-5: Resultados de ensayo de recuperación del péptido en el sistema de purificación empleado.

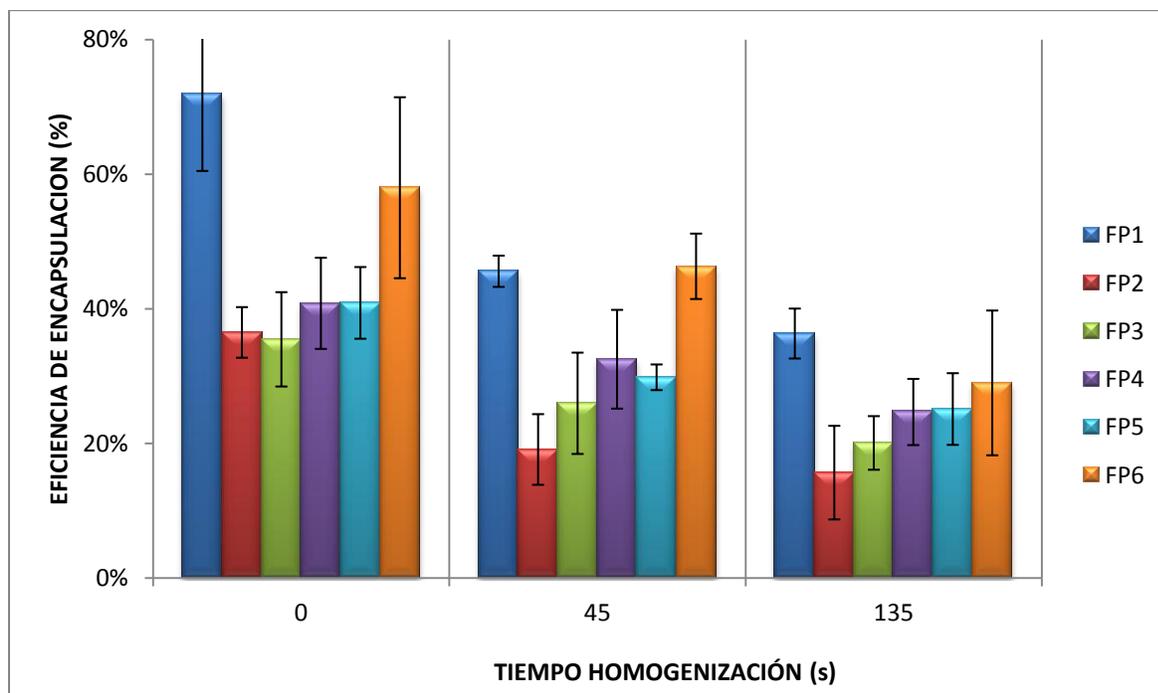
Solución	Área	Promedio	% recuperación
Filtrado 1	35554038		91,3%
Filtrado 2	35685486	36295132	91,6%
Filtrado 3	37645873		96,6%
Solución 1	39987213		Promedio 93,1%
Solución 2	37891012	38962453	
Solución 3	39009134		

4.3.2.2 Eficiencia de encapsulación

La capacidad de los liposomas de encapsular el péptido en su compartimiento acuoso, pudo determinarse al momento de medir la cantidad de péptido que permanecía en el sedimento tras el proceso de purificación. Sin embargo, es importante aclarar que es posible que en el momento de realizar esta cuantificación, y así se haya realizado un lavado con 100 μ L de PBS permanezca algo de péptido no encapsulado en ese pequeño volumen que no pasa al filtrado, lo cual podría aportar error en la cuantificación de las eficiencias. Esto se podría haber resuelto realizando más lavados junto con una centrifugación más exhaustiva. Sin embargo, al no tener a disponibilidad una centrifuga refrigerada un evidente incremento de temperatura podría afectar la estabilidad de los liposomas e inducir una salida de péptido del compartimiento acuoso.

Al cuantificarse el péptido encapsulado en cada sistema liposomal, se encontró que la inclusión de tensioactivos en las formulaciones, provoca una evidente disminución en la EE (Figura 4-2). Al parecer la flexibilidad adquirida por los liposomas debida a la ubicación de los tensioactivos en la bicapa, permite que aumente la permeabilidad de la bicapa fosfolipídica. Además cuando es usado alguno de los dos tensioactivos y especialmente cuando se usa en el nivel alto de proporción frente a la PC (FP2 y FP4), se forman micelas mixtas las cuales presentan un dominio hidrofóbico en su interior lo que impide que el péptido (que es bastante hidrofílico) se encapsule y permanezca en el medio acuoso donde están suspendidos los liposomas.

Figura 4-2: Efecto del de tiempo homogenización por ultrasonido en la eficiencia de encapsulación (EE) del acetilhexapéptido-3 en los sistemas liposomales. Resultados expresados con intervalo de confianza del 90% con $t_{2,0,05} = 2,92$.

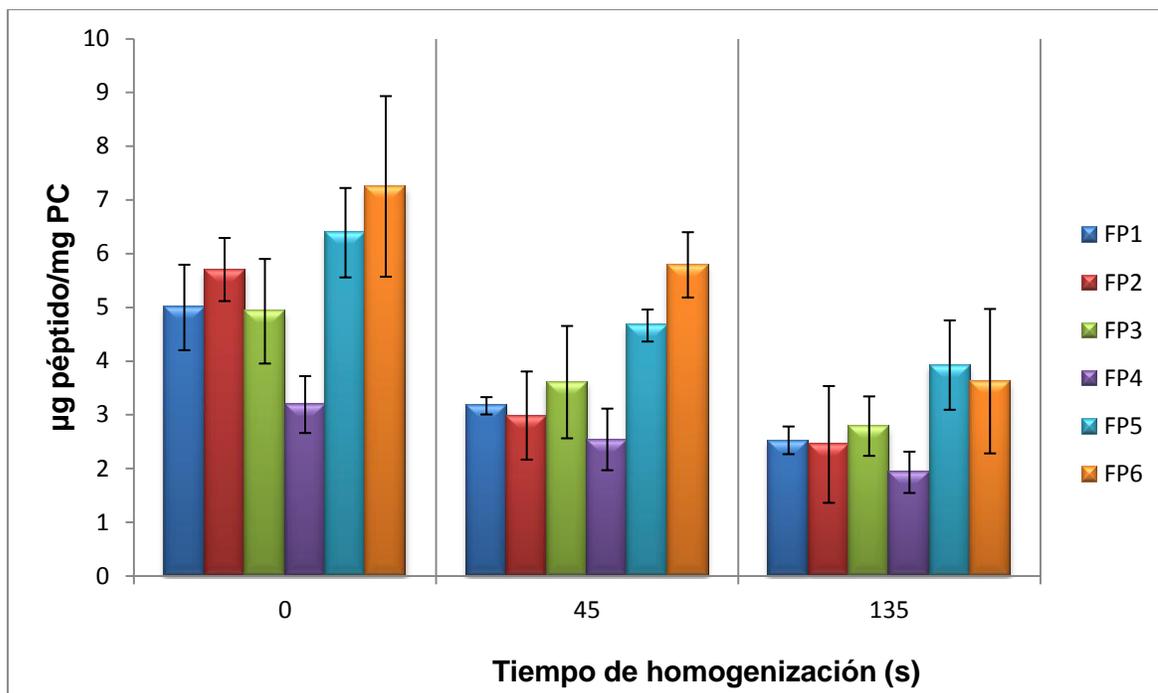


Es posible afirmar que la cantidad de PC utilizada en las formulaciones afectan la encapsulación de péptido, ya que entre más formador exista, se forman más liposomas con compartimentos internos acuosos disponibles para encapsular el péptido. Sin embargo entre mayor sea la proporción total de PC se puede favorecer la formación MLVs en lugar de LUVs, estos últimos con mayor capacidad de encapsular activos hidrofílicos (100). Las formulaciones con nivel alto de PC (FP1 y FP4) mostraron entre ellas una marcada diferencia en la EE del péptido, seguramente debido al tipo de tensioactivo usado y su proporción, mientras que la FP2 y la FP3 con cantidades similares de PC mostraron EE muy similares. Por tanto, para evaluar el efecto de la cantidad de PC en la encapsulación del péptido se expresó la encapsulación del péptido como μg de péptido encapsulado por mg de PC (Figura 4-3), lo que permitió ver que la carga en los sistemas con tensioactivos fue menor. Sin embargo el criterio que se consideró para los análisis fue el de EE en porcentaje.

Al revisar la EE% de la FP4 que presentó condiciones más favorables en cuanto a diámetro promedio y PDI (liposomas más pequeños y más homogéneos), lo cual facilitarían la permeabilidad del péptido, ocuparía el tercer puesto (entre las seis) en lo

que se refiere a EE% y el último lugar con respecto a la carga (μg péptido/mg PC). Por tanto, teniendo presente que uno de los propósitos de esta aproximación es contribuir al desarrollo de un sistema liposomal para la administración tópica cargado con el acetilhexapéptido-3, que facilite su permeabilidad a través de la piel, que lo proteja de una posible degradación antes de llegar a su sitio de acción (28) y además produzca un depósito buscando generar su liberación sostenida, se planteó que en el momento de seleccionar una de las 6 formulaciones, el sistema más apropiado sería aquel que tendría mayor EE. Por esta razón fue seleccionada la FP1-0 para realizar el ensayo preliminar de permeabilidad.

Figura 4-3: Efecto del tiempo homogenización por ultrasonido en la cantidad de Acetilhexapéptido-3 en los sistemas liposomales. Resultados expresados con intervalo de confianza del 90% con $t_{2,0,05} = 2,92$.

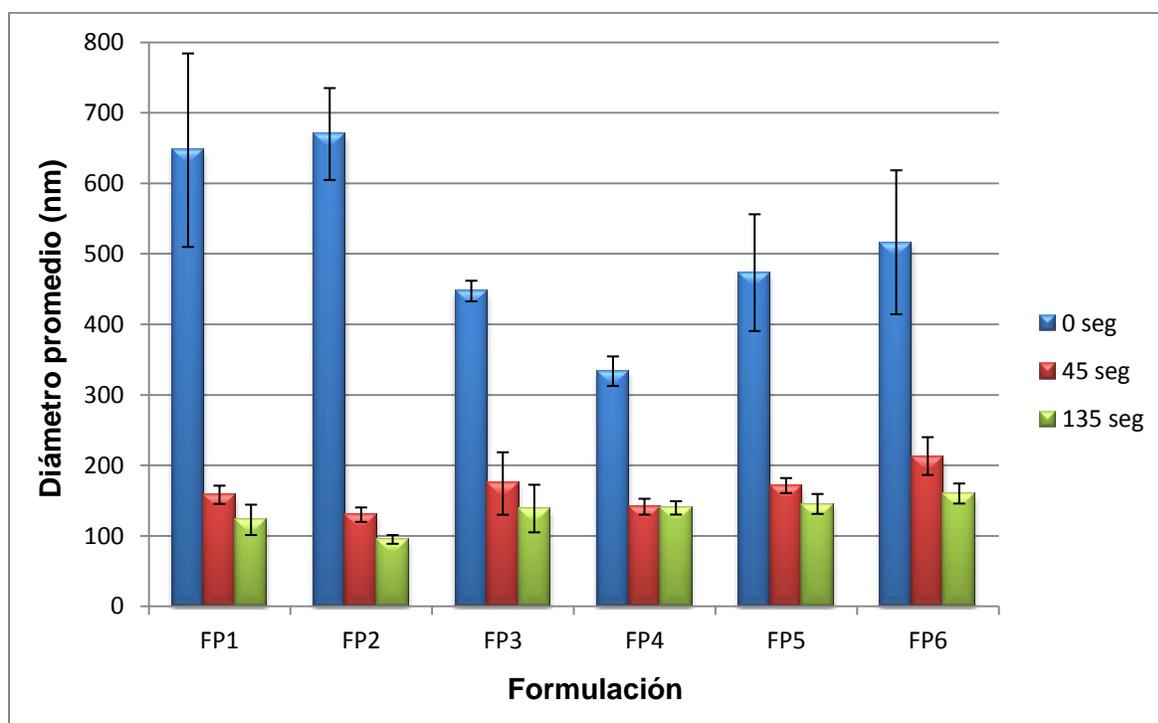


4.3.3 Efecto del proceso de homogenización por sonicación.

Este proceso de homogenización final no debe ser considerado como un proceso de elaboración (como aquel realizado sobre la emulsión (w/o) formada antes de la evaporación), sino como un proceso de acondicionamiento final de la vesícula. El análisis de la varianza (Anexo C) muestra que la homogenización final por sonicación presenta un evidente efecto sobre las tres variables respuestas medidas.

Durante el proceso, la sonda del equipo que se pone en contacto con la dispersión liposomal, produce ondas ultrasónicas (20KH), las cuales se encuentran con las burbujas de aire presentes en el medio acuoso y las comprime a una fracción de su tamaño inicial. La burbuja se vuelve a expandir en el ciclo de baja presión de la onda en un proceso que se repite con cada onda sonora generada, lo que se conoce como cavitación. Tal fenómeno puede ser tan violento que puede aumentar la temperatura y la presión del sistema de manera abrupta, por lo que fue importante la utilización del baño de hielo. La vibración de la burbuja produce una serie de micro-corrientes de importantes gradientes de velocidad lo que causa una fuerza de cizalla que es la responsable de homogenizar el sistema liposomal (113) como se observa en la Figura 4-4 y Figura 4-5.

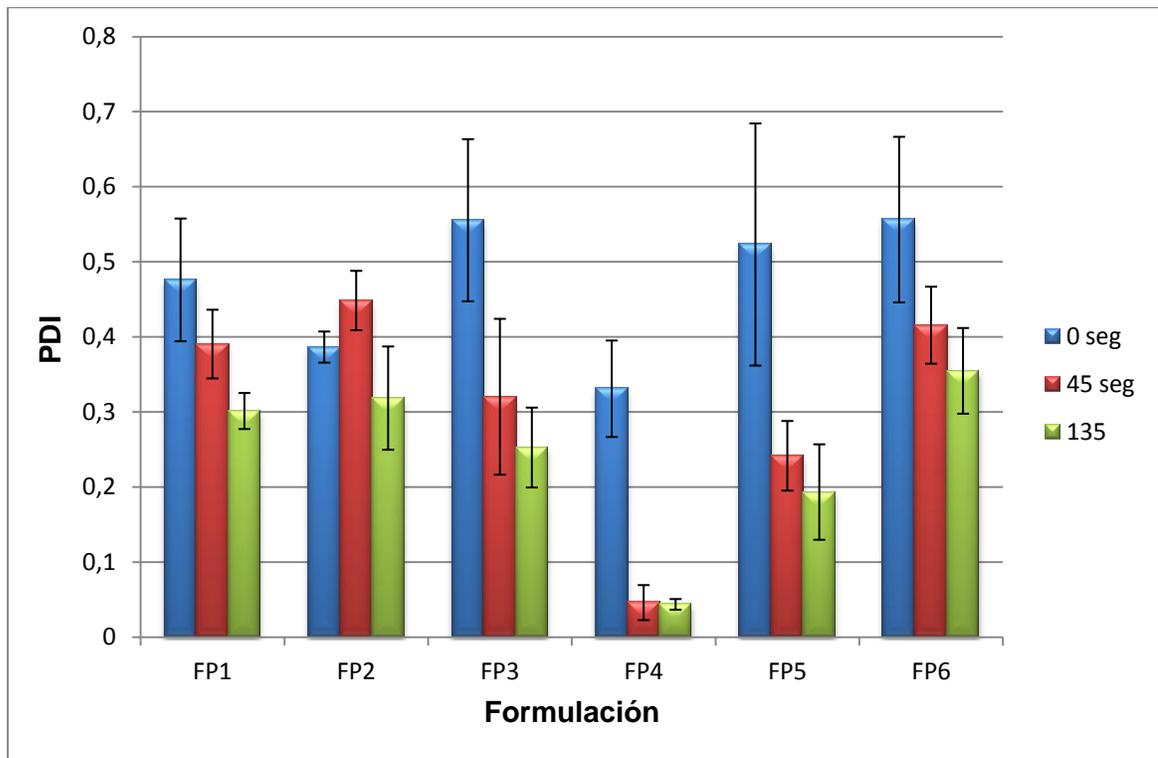
Figura 4-4: Relación del diámetro promedio de los sistemas liposomales cargados (FP1-FP6) en función del tiempo de homogenización por ultrasonido. Resultados expresados con intervalo de confianza del 90% con $t_{2,0,05} = 2,92$.



Todos los sistemas expuestos a un proceso de sonicación de 45 segundos (FP1-FP6) presentaron una acentuada disminución en el diámetro promedio de vesícula, al igual que una disminución en el PDI excepto la FP2 que presento un breve aumento. Aquellos con un proceso de 135 segundos presentaron una mayor disminución en el tamaño pero ya no tan acentuada, lo que sugiere que para reducir el diámetro promedio de un sistema

liposomal debe existir un tiempo óptimo del proceso el cual depende de varios factores, entre ellos la capacidad del sonicador, el volumen de dispersión y las características del material que se trabaja. Aunque se mantuvo fija la potencia de homogenización en ultrasonido (62,5 W), sería un trabajo importante revisar cuáles serían los tiempos de exposición necesarios para alcanzar un valor de determinado diámetro variando la potencia de sonicación.

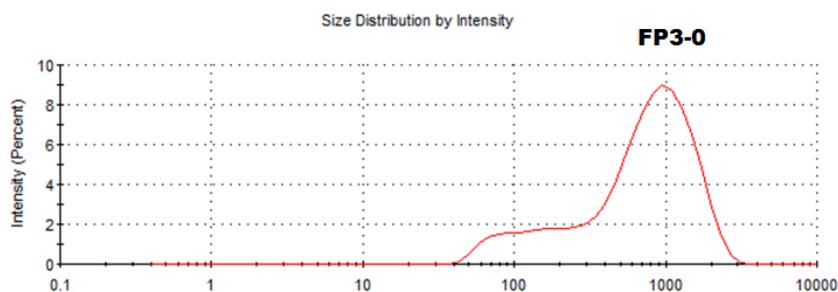
Figura 4-5: Relación del índice de polidispersidad (PDI) de los sistemas liposomales cargados (FP1-FP6) en función del tiempo de homogenización por ultrasonido. Resultados expresados con intervalo de confianza del 90% con $t_{2, 0,05} = 2,92$.



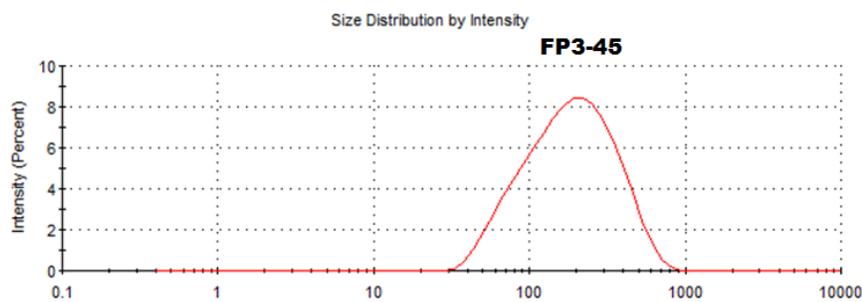
Dos formulaciones, la FP2 y la FP4, mostraron un comportamiento particular tras el proceso de ultrasonido. La FP2 fue la única que mostró una reducción en su diámetro promedio a valores menores de 100 nm (FP2-135), mientras que la segunda presentó un PDI menor de 0,05 con tan solo 45 segundos de ultrasonido lo cual habla de una distribución de tamaño bastante homogénea. El efecto sobre la distribución de tamaño de vesícula en la FP3 puede evidenciarse en la Figura 4-6.

Figura 4-6: Efecto de del proceso de sonicación en la distribución de tamaño en la FP3-0, FP3-45 y FP3-135.

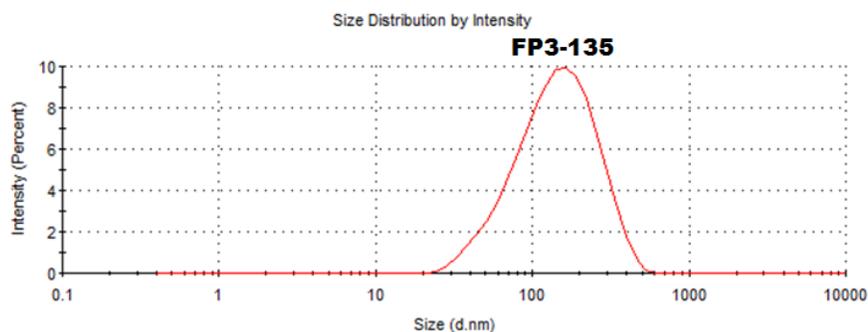
	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 437,4	Peak 1: 839,7	100,0	552,7
Pdl: 0,572	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,950	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality : Good			



	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 154,1	Peak 1: 215,3	100,0	133,8
Pdl: 0,278	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,955	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality : Good			



	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 122,0	Peak 1: 160,6	100,0	87,32
Pdl: 0,246	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,950	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality : Good			



De la misma manera se evidenció que el proceso de ultrasonido produce una disminución de las EE%, que al igual que con el diámetro promedio, es más pronunciada con 45 segundos de sonicación. Como ya se analizó el proceso de cavitación genera micro-corrientes que producen una fuerza de cizalla que se encarga de disminuir el tamaño de las vesículas, podría generar una salida del contenido del compartimiento acuoso, además que el proceso produce vesículas más pequeñas (SUVs) que tienen menor capacidad de albergar el péptido en su interior. En la Tabla 4-6 se presenta la caracterización completa de los sistemas liposomales obtenidos, en donde se puede evidenciar el efecto de las variables independientes sobre cada variable respuesta definida para este estudio.

Tabla 4-6: Resultados de caracterización de los sistemas liposomales elaborados CV: coeficiente de variación, SD= desviación estándar.

Ensayo	Diámetro promedio en nm (CV)	PDI (CV)	EE% (SD)	Potencial Zeta en mV (CV)
FP1-0	647 (9,5%)	0,476 (8,3%)	71,9% (5,1%)	-
FP1-45	158 (3,9 %)	0,390 (5,9%)	45,5% (1,1%)	-
FP1-135	123 (8,9%)	0,301 (3,8%)	36,3% (1,7%)	-56,1 (1,9%)
FP2-0	670 (4,4%)	0,386 (2,7%)	36,5% (1,7%)	-
FP2-45	130 (3,9%)	0,448 (4,0%)	19,1% (2,3%)	-
FP2-135	94 (3,1%)	0,318 (10,5%)	15,7% (3,5%)	-60,1 (3,3%)
FP3-0	447 (1,5%)	0,555 (9,1%)	35,5% (5,1%)	-
FP3-45	174 (12,8%)	0,320 (16,2%)	26,0% (4,7%)	-
FP3-135	139 (12,0%)	0,253 (9,4%)	20,1% (2,9%)	-50,5 (2,8%)
FP4-0	333 (3,2%)	0,331 (9,3%)	40,8% (3,5%)	-
FP4-45	141 (3,6%)	0,046 (22,6%)	32,5% (4,2%)	-
FP4-135	139 (3,2%)	0,044 (7,4%)	24,7% (3,3%)	-57,9 (1,16%)
FP5-0	473 (6,1%)	0,523 (10,8%)	40,8% (2,4%)	-
FP5-45	171 (2,8%)	0,242 (8,6%)	29,8% (0,9%)	-
FP5-135	145 (4,3%)	0,193 (14,2)	25,1% (2,4%)	-
FP6-0	516 (9,3%)	0,556 (9,3%)	58,0% (6,0%)	-
FP6-45	213 (5,6%)	0,416 (5,6%)	46,3% (2,2%)	-
FP6-135	160 (4,3%)	0,355 (7,7%)	29,0% (4,8%)	-48,1 (2,0%)
TFP5-0	1e ⁴	-	44,1% (2,8%)	-
TFP5-45	1e ⁴	-	30,2% (3,0%)	-
TFP5-135	1e ⁴	-	17,3 (1,3%)	-

En cuanto a la formulación FP5 preparada con el método de hidratación de la película de PC formada (TFP5) se encontró que al igual que con el otro método utilizado el acetilhexapéptido-3 se pudo encapsular obteniéndose un 44,1 % sin sonicación final (Tabla 4-6). Sin embargo, el sistema que en apariencia era demasiado turbio, no se logró caracterizar en cuanto diámetro promedio de vesícula y PDI ya que el equipo reportó tamaños superiores a 10 μm .

4.3.4 Ensayos preliminares de permeación *ex vivo*.

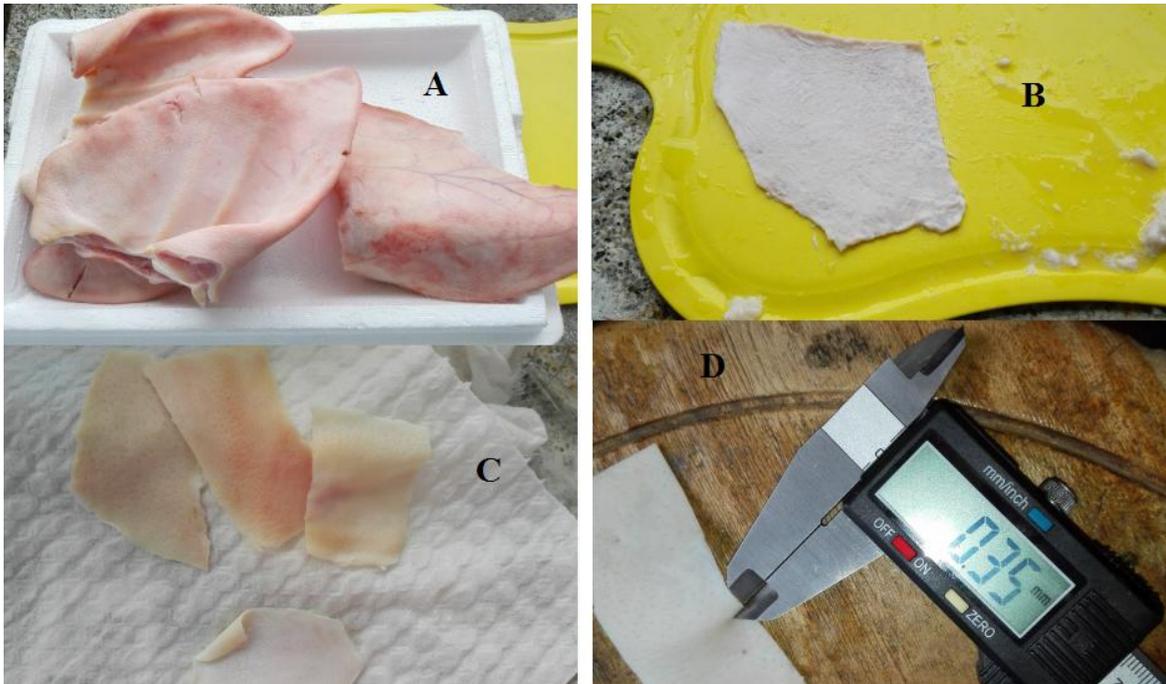
Además de los materiales básicos requeridos para la realización de un ensayo de permeabilidad, el reto principal se basa en disponer de una membrana que se encuentre en condiciones adecuadas y que también sirva como modelo para que se pueda realizar una extrapolación del posible comportamiento de los sistemas en piel humana. Existen una serie de reglas estandarizadas (127) que permiten armonizar los ensayos que se realizan. Sin embargo se requiere una serie de instrumentos para la obtención y evaluación de la integridad de la membrana obtenida. Por tanto el presente ensayo se consideró como preliminar ya que la obtención de la membrana no fue como la reportada en la guía OECD (127) la cual establece condiciones para realizar adecuadamente este tipo de ensayos.

Se realizó un ensayo de permeabilidad *ex vivo* ya que se utiliza como modelo de membrana un injerto de origen animal. Aunque las guías contemplan también la realización de estos ensayos con membranas de origen humano, la utilización de estos injertos se ve restringida debido a que se requieren permisos éticos e infraestructura física especial en el laboratorio (128). La piel de cerdo es uno de los modelos más usados en este tipo de ensayos y su obtención puede ser de tres tipos: Solo la epidermis, cuando se obtienen membranas de espesor cercano a 0,1mm (obtenida con separación con calor o enzimática), piel de mediano espesor obtenida con dermatomo (0,2 mm-0,5 mm) y de grosor completo (0,5 mm a 1 mm) (74). En el ensayo realizado se obtuvieron membranas que a simple vista parecían homogéneas y entraban en el rango entre 0,25 mm y 0,4 mm. Sin embargo, el empleo del calibre para medir espesor, se consideró no ser el más apropiado (Figura 4-7 D).

Una vez obtenidas las membranas, las guías OECD recomiendan constatar su integridad, basada en una inspección visual y posteriormente la revisión por alguna de

las siguientes dos técnicas, la pérdida de agua transepidermal (TELW) o la resistencia eléctrica transcutánea (TER). Como no hubo disponibilidad de estos equipos, la integridad fue medida mediante inspección visual, lo que se consideró como otro aspecto que aportaría error a los resultados, debido a que no se verificó indiscutiblemente que la membrana fuera íntegra.

Figura 4-7: Membranas de piel de cerdo. A) orejas frescas lavadas. B) proceso de desengrasado. C) membranas obtenidas D) medición del espesor.



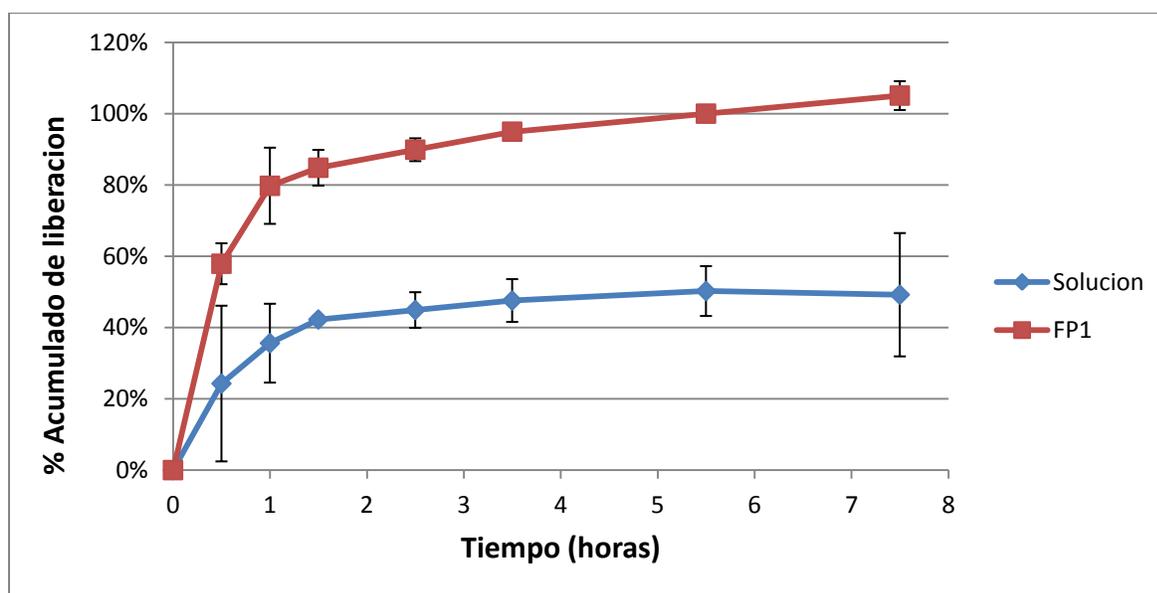
Se realizó la cuantificación del acetilhexapéptido-3 del último muestreo en las celdas en cuyo donador se aplicó la FP1-0 con una EE% que correspondía a $72,7 \% \pm 10,8 \%$. De la misma manera se adicionó a cada uno de las alícuotas del mismo muestreo $20\mu\text{L}$ de Tritón X-100 al 8%, y se sometieron a calentamiento a 60°C durante 10 minutos. Los datos obtenidos (Tabla 4-7) sugieren que existió un paso de vesículas íntegras que protegen el péptido. Por tanto para analizar el péptido contenido del compartimento receptor, se debe hacer una disrupción de los liposomas con un tensioactivo permitiendo que se pueda cuantificar el péptido del compartimiento interior acuoso. Para el análisis cromatográfico se utilizó una curva de calibración con el acetilhexapéptido-3 en PBS y los resultados se pueden observar en la Figura 4-7.

Tabla 4-7: Datos del análisis por HPLC de la de la última muestra tomada del compartimento receptor de las celdas de Franz con la FP1.

Muestra	Área sin tritón X-100	Concentración (mg/mL)	Área con tritón X-100	Concentración (mg/mL)
1	696148	0,01645	1861440	0,04398
2	869735	0,02055	2538187	0,05997
3	770337	0,01820	1743415	0,04119

En general los resultados del ensayo preliminar de permeabilidad (Figura 4-8) mostraron que el acetilhexapéptido-3 encapsulado presentó una permeabilidad mayor a través de la piel, lo cual se puede considerar una ventaja en el acercamiento al diseño de sistemas que incrementen la permeabilidad de PAs hidrofílicos. Sin embargo los datos obtenidos presentan una gran dispersión, como en el caso de la cuantificación de la primera muestra de péptido (30 min), donde se evidenció que en una de las tres celdas no había pasado péptido a través de la membrana, lo cual generó alta desviación de los datos. Debido a esto y a las demás condiciones que no se ajustaron de acuerdo a la guía OECD es que el ensayo fue considerado como una aproximación inicial en lo que se refiere al ensayo de de permeabilidad del sistema liposomal desarrollado, conteniendo el acetilhexapéptido-3 sintético encapsulado.

Figura 4-8: Porcentaje de liberación acumulada de acetilhexapeptido-3 desde la formulación de liposomas flexibles (FP1) y desde solución de PBS, a través de membrana de piel de cerdo.



Una vez sea estandarizado un ensayo de este tipo, se podrían obtener datos que permitieran un análisis completo en cuanto a que tanto la encapsulación en liposomas flexibles incrementaría la constante de permeabilidad (K_p) del acetilhexapéptido-3 en comparación a los liposomas clásicos (con Chol) o a las otras estrategias de vehiculización como las formulaciones que actualmente se comercializan con el péptido.

4.3.5 Eficiencia de encapsulación cuantificada con micro BCA.

Debido a la gran cantidad de muestras de acetilhexapéptido-3 que debían ser analizadas en el presente trabajo, se planteó la utilización de un método de análisis alternativo al HPLC, ya que éste presentaba una serie de desventajas, como que el proceso de elución de una muestra requiere 55 minutos para completarse. Por tanto se contempló el método de BCA para realizar una cuantificación. Sin embargo se presentó el inconveniente de la interferencia que presentan los lípidos en el ensayo. En la Tabla 4-8 se muestran las absorbancias de las FP5 (liposomas con colesterol).

Tabla 4-8: Absorbancias obtenidas con micro BCA de los filtrados de diferentes formulaciones. La concentración obtenida es calculada con la curva de calibración de una solución acuosa de péptido.

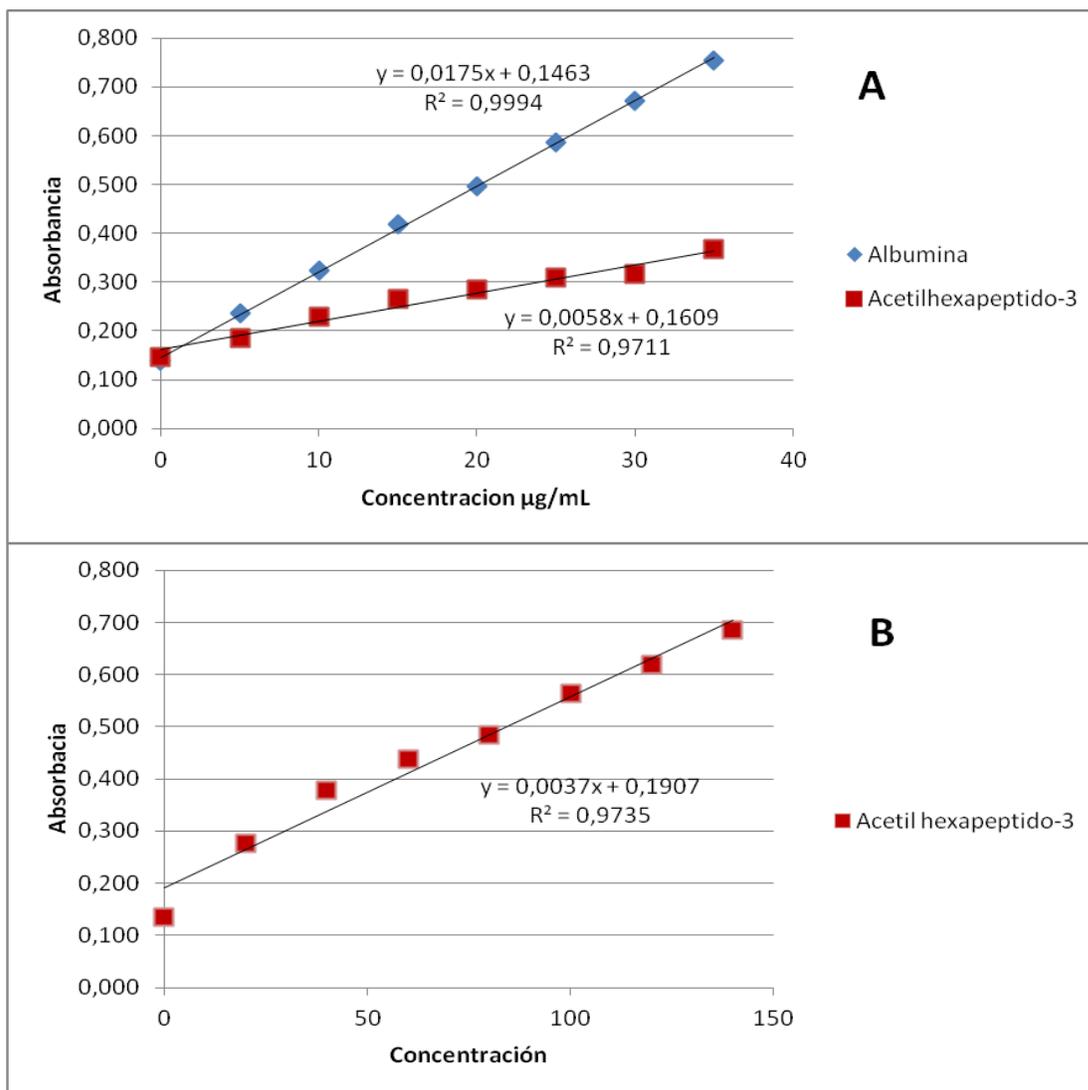
Muestra	Concentración HPLC (mg/mL)	Absorbancia con BCA	Concentración BCA (mg/mL)
FP5 (vacíos)	0	0,637	0,0968
FP5	0	0,549	0,154
FP5	0	0,761	0,0952
FP5-0	0,122	0,951	0,205
FP5-0	0,125	0,867	0,154
FP5-0	0,120	0,601	0,115
FP5-45	0,135	0,615	0,183
FP5-45	-	-	-
FP5- 45	0,136	0,675	0,131
FP5-135	0,149	0,615	0,111
FP5-135	0,144	0,675	0,129
FP5- 135	0,143	0,637	0,205

Basados en los resultados mostrados y en la evidente interferencia de los lípidos en el método de cuantificación, se decidió no continuar con este método para la determinación de las eficiencias de cuantificación, no sin antes tratar comparar la coloración producida entre el estándar del kit (albúmina) y la solución de acetilhexapéptido-3. Se utilizó para el

ensayo una de las fracciones liofilizadas de más alta pureza (aprox 95%) y se hizo una curva de calibración con 8 puntos (n=3).

La Figura 4-9 muestra las rectas obtenidas donde se puede notar la baja capacidad del péptido de producir el complejo coloreado en comparación con la albúmina. Como se explicó anteriormente además del enlace peptídico son responsables del intenso color purpura, la presencia de algunos aminoácidos (cisteína, triptófano y tirosina), junto con la estructura macromolecular de las proteínas (62). Por tanto si se desea cuantificar el acetilhexapéptido-3, no se puede hacer confrontando la curva con una realizada con albúmina, como si se puede hacer con otras proteínas.

Figura 4-9: Curvas obtenidas de A) albúmina en rango de linealidad con la misma concentración de péptido y B) una concentración 4 veces mayor de péptido (n=3).



Como el kit está diseñado para la cuantificación de proteínas en un rango entre 2-40 $\mu\text{g/mL}$, se hicieron curvas de albúmina y acetilhexapéptido-3 entre 0 y 35 μg (Figura 4-9 A). Además se realizaron curvas con concentraciones variables del péptido hasta obtener una que presentaba niveles de absorbancia similares a la de albúmina (Figura 4-9 B). La curva encontrada sugiere que con niveles aproximados de unas 4,3 veces de acetilhexapéptido-3 se puede obtener absorbancias similares a la albúmina.

5 Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

De los resultados obtenidos en la presente investigación es posible concluir:

1. La síntesis en fase sólida (SPPS), empleando la estrategia Fmoc/tBu asistida por microondas, es apropiada para la obtención del acetilhexapéptido-3 en cantidades apreciables.
2. La técnica de extracción en fase sólida (SPE) es aplicable al proceso de purificación del acetilhexapéptido-3 permitiendo obtener fracciones de alta pureza.
3. Mediante la metodología de inversión de fase de la emulsión w/o por evaporación del solvente orgánico, se desarrolló un sistema liposomal con las características apropiadas para la encapsulación del acetilhexapéptido-3 sintético.
4. Algunos de los sistemas liposomales cargados con el acetilhexapéptido-3 tienen las características adecuadas para la aplicación sobre la piel en lo que se refiere a tamaño, potencial zeta, eficiencia de encapsulación.
5. En función de los resultados obtenidos en el estudio preliminar de permeación *ex vivo*, los sistemas liposomales obtenidos se presentan como una potencial alternativa para favorecer el paso del acetilhexapéptido-3 a través de la piel, como una contribución al desarrollo de un novedoso producto cosmeceútico.

5.2 Recomendaciones

1. En posteriores trabajos se sugiere evaluar el efecto de la pureza y de las características de los fosfolípidos formadores en las propiedades de los liposomas.
2. Se recomienda dar continuidad a la implementación del ensayo de permeabilidad transdérmica en las celdas de Franz, siguiendo las recomendaciones reportadas en la guía OECD.
3. Se sugiere realizar un estudio que permita la evaluación física, química y biológica de los sistemas liposomales desarrollados, tanto vacíos como con el acetilhexapéptido-3 encapsulado y la evaluación de la integridad del péptido luego del proceso de encapsulación.

A. ANEXO: ANOVA para liposomas vacíos

Hipótesis nula: Las diferencias en las características de la formulación no tienen efectos significativos sobre el potencial Zeta ($P < 0,05$).

<i>Origen de la variación</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Formulaciones	324,744	5	64,948	15,765	0,00018	3,3258
Replicas	1,6177	2	0,808	0,196	0,82481	4,1028
Error	41,195	10	4,119			
Total	367,557	17				

Conclusión: Se rechaza la hipótesis nula.

Hipótesis nula: Las diferencias en las características de la formulación no tienen efectos significativo sobre el diámetro promedio de las vesículas liposomales ($P < 0,05$).

<i>Origen de la variación</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Formulaciones	929008,773	5	185801,755	188,605	1,4726E-09	3,3258
Replicas	8243,86333	2	4121,93167	4,18412	0,04782572	4,1028
Error	9851,36333	10	985,136333			
Total	947104	17				

Conclusión: Se rechaza la hipótesis nula.

Hipótesis nula: Las diferencias en las características de la formulación no tienen efectos significativo sobre el PDI de las vesículas liposomales ($P < 0,05$).

<i>Origen de la variación</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Formulaciones	0,11352694	5	0,02270539	12,2670	0,00052717	3,3258
Replicas	0,00571078	2	0,00285539	1,54268	0,26065746	4,1028
Error	0,01850922	10	0,00185092			
Total	0,13774694	17				

Conclusión: Se rechaza la hipótesis nula.

B. Anexo: ANOVA evaluación del efecto de la encapsulación del péptido

Hipótesis nulas: La encapsulación del péptido y la presencia del buffer, las características de cada formulación, y una posible interacción entre los dos, no tienen efectos significativos sobre el diámetro promedio de las vesículas liposomales ($P < 0,05$).

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Formulación	768090,691	5	153618,138	112,029092	6,8656E-15	2,66127392
Presencia péptido	83651,1006	1	83651,1006	61,0042342	8,7679E-08	4,30094946
Interacción	392160,981	5	78432,1963	57,1982441	7,1938E-12	2,66127392
Replicas	3949,29292	2	1974,64646	1,44005033	0,25839019	3,44335678
Error	30167,1554	22	1371,23434			
Total	1278019,22	35				

Conclusión: Se rechazan las hipótesis nulas.

Hipótesis nulas: La encapsulación del péptido y la presencia del buffer, las características de cada formulación, y una posible interacción entre los dos, no tienen efectos significativos sobre el PDI de las vesículas liposomales ($P < 0,05$).

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Formulación	0,166336667	5	0,03326733	19,3697118	2,1329E-07	2,66127392
Presencia péptido	0,039933361	1	0,03993336	23,2509678	8,1159E-05	4,30094946
Interacción	0,081612222	5	0,01632244	9,50364858	6,1503E-05	2,66127392
Replicas	0,008738167	2	0,00436908	2,54387342	0,10142565	3,44335678
Error	0,037784833	22	0,00171749			
Total	0,33440525	35				

Conclusión: Se rechazan las hipótesis nulas.

C. ANEXO: ANOVA para la evaluación del efecto del proceso de sonicación y la formulación en variables respuesta

Hipótesis nulas: Las diferencias en las características de la formulación, el efecto de proceso de homogenización y una posible interacción entre los dos, no tienen efectos significativo sobre el diámetro promedio de las vesículas liposomales ($P < 0,05$).

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Formulación	67457,36056	5	13491,472	24,8297	1,86801E-10	2,4936
T Homogenización	1593161,448	2	796580,724	1466,0261	1,01883E-33	3,2759
Interacción (F-T)	183743,6703	10	18374,367	33,8162	8,97612E-15	2,1231
Replicas	92,4229	2	46,211	0,0850	0,918663428	3,2759
Error	18474,25797	34	543,361			
Total	1862929,159	53				

Conclusión: Se rechazan las hipótesis nulas.

Hipótesis nulas: Las diferencias en las características de la formulación, el efecto de proceso de homogenización y una posible interacción entre los dos, no tienen efecto significativo sobre el índice de polidispersidad (PDI) de vesículas liposomales ($P < 0,05$).

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Formulación	0,50427	5	0,10085	92,4284541	8,59816E-19	2,49361595
T Homogenización	0,49108	2	0,24554	225,025282	2,46603E-20	3,27589799
Interacción	0,14676	10	0,01467	13,4499595	3,91917E-09	2,12313967
Replicas	0,00128	2	0,00064	0,58902647	0,560429543	3,27589799
Error	0,03709	34	0,00109			
Total	1,18050	53				

Conclusión: Se rechazan las hipótesis nulas.

Hipótesis nulas: Las diferencias en las características de la formulación, el efecto de proceso de homogenización y una posible interacción entre los dos, no tienen efectos significativo sobre la eficiencia de encapsulación de acetilhexapeptido-3 en las vesículas liposomales ($P < 0,05$).

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Formulación	0,50766488	5	0,10153298	104,964592	1,15103E-19	2,49361595
T Homogenización	0,44515035	2	0,22257518	230,097782	1,73325E-20	3,27589799
Interacción	0,07238153	10	0,00723815	7,48278797	3,81656E-06	2,12313967
Replicas	0,00314945	2	0,00157472	1,62794678	0,211264661	3,27589799
Error	0,03288844	34	0,00096731			
Total	1,06123464	53				

Conclusión: Se rechazan las hipótesis nulas.

Bibliografía

1. Van del Walle C, Olejnik O. An Overview of the Field of Peptide and Proteins Delivery. Peptide and proteins delivery. 2011.
2. Kimmerlin T, Seebach D. "100 Years of Peptide Synthesis": Ligation Methods for Peptide and Protein Synthesis With Applications To Beta-Peptide Assemblies. *J Pept Res* [Internet]. 2005 Feb;65(2):229–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15705167>
3. Gorouhi F, Maibach HI. Textbook of Aging Skin. Farage MA, Miller KW, Maibach HI, editors. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2010 [cited 2014 Oct 19]; Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-89656-2>
4. Barry BW. Is transdermal drug delivery research still important today? *Drug Discov Today*. 2001;6(19):967–71.
5. Betz G, Aeppli A, Menshutina N, Leuenberger H. In vivo comparison of various liposome formulations for cosmetic application. *Int J Pharm* [Internet]. 2005 May 30 [cited 2013 Jun 6];296(1-2):44–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15885454>
6. Choi CM, Berson DS. Cosmeceuticals. *Semin Cutan Med Surg* [Internet]. 2006 Sep [cited 2014 Oct 19];25(3):163–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17055397>
7. Gasco-buisson MC. Textbook of Aging Skin. Farage MA, Miller KW, Maibach HI, editors. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2010 [cited 2014 Oct 19]; Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-89656-2>
8. Tedeschi A, West LE, Guzzardi L, Bhatt KH, Reid EE, Scapagnini G. Update in Cosmetic Dermatology. Tosti A, Hexsel D, editors. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013 [cited 2014 Oct 7];87–113. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-34029-1>
9. Vernon J, Nwaogu T. Comparative Study on cosmetics Legislation in the EU and Other Principal Markets with Special Attention to so called Borderline Products. 2004.

10. Draelos ZD. The cosmeceutical realm. *Clin Dermatol* [Internet]. 2008 [cited 2014 Oct 19];26(6):627–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18940543>
11. Huang C, Miller T. The Truth About Over-the-Counter Topical Anti-Aging Products: A Comprehensive Review. *Aesthetic Surg J*. 2007;27(August):402–12.
12. Manela-azulay M, Bagatin E. Cosmeceuticals vitamins. *Clin Dermatol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2009;27(5):469–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clindermatol.2009.05.010>
13. Bissett DL, Johnson MB. Textbook of Aging Skin. Farage MA, Miller KW, Maibach HI, editors. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2010 [cited 2014 Oct 19]; Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-89656-2>
14. Draelos ZD. The Art and Science of New Advances in Cosmeceuticals. *Clin Plast Surg*. 2011;
15. Lintner K, Peschard O. Biologically active peptides: from a laboratory bench curiosity to a functional skin care product. *Int J Cosmet Sci* [Internet]. 2000 Jun;22(3):207–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18503476>
16. Kang Y-A, Na J-I, Choi H-R, Choi J-W, Kang H-Y, Park K-C. Novel anti-inflammatory peptides as cosmeceutical peptides. *Peptides* [Internet]. Elsevier Inc.; 2011 Oct [cited 2014 Oct 19];32(10):2134–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21889965>
17. Fields K, Falla TJ, Rodan K, Bush L. Bioactive peptides: signaling the future. *J Cosmet Dermatol* [Internet]. 2009 Mar;8(1):8–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19250159>
18. Malerich S, Berson D. Next generation cosmeceuticals. The latest in peptides, growth factors, cytokines, and stem cells. *Dermatol Clin* [Internet]. Elsevier Inc; 2014;32(1):13–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.det.2013.09.003>
19. Gorouhi F, Maibach HI. Role of topical peptides in preventing or treating aged skin. *Int J Cosmet Sci* [Internet]. 2009 Oct [cited 2014 Oct 19];31(5):327–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19570099>
20. Reszko AE, Berson D, Lupo MP. Cosmeceuticals: Practical applications. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2010;37(4):547–69.
21. Zhou W, Wang PG, Krynitsky AJ, Rader JI. Rapid and simultaneous determination of hexapeptides (Ac-EEMQRR-amide and H₂N-EEMQRR-amide) in anti-wrinkle cosmetics by hydrophilic interaction liquid chromatography-solid phase extraction preparation and hydrophilic interaction liquid chromatography with. *J Chromatogr A* [Internet]. Elsevier B.V.; 2011;1218(44):7956–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21959380>

22. Krishnan G, Roberts MS, Grice J, Anissimov YG, Moghimi HR, Benson H a. E. Iontophoretic skin permeation of peptides: an investigation into the influence of molecular properties, iontophoretic conditions and formulation parameters. *Drug Deliv Transl Res* [Internet]. 2013 Nov 5 [cited 2014 Oct 19];4(3):222–32. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13346-013-0181-8>
23. González A, Flórez J. Transmisión colinérgica. *Fármacos agonistas colinérgicos*. Farmacol Humana Editor Masson SA [Internet]. 1997;213–28. Available from: <http://www.fitoica.com/Biblioteca/Libros/Farmacologia/F009/02130228.PDF>
24. Hodel a. Snap-25. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 1998 Oct;30(10):1069–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9785471>
25. Viniegra S. A Peptide That Mimics the C-terminal Sequence of SNAP-25 Inhibits Secretory Vesicle Docking in Chromaffin Cells. *J Biol Chem* [Internet]. 1997 Jan 31 [cited 2013 Jun 12];272(5):2634–9. Available from: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.272.5.2634>
26. Ferrer-Montiel a V, Gutiérrez LM, Aplan J, Canaves JM, Gil a, Viniegra S, et al. The 26-mer peptide released from SNAP-25 cleavage by botulinum neurotoxin E inhibits vesicle docking. *FEBS Lett* [Internet]. 1998 Sep 11;435(1):84–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9755864>
27. Gutierrez LM, Viniegra S, Rueda J, Ferrer-Montiel a V, Canaves JM, Montal M. A peptide that mimics the C-terminal sequence of SNAP-25 inhibits secretory vesicle docking in chromaffin cells. *J Biol Chem* [Internet]. 1997 Jan 31;272(5):2634–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9006897>
28. Blanes-Mira C, Clemente J, Jodas G, Gil a, Fernández-Ballester G, Ponsati B, et al. A synthetic hexapeptide (Argireline) with antiwrinkle activity. *Int J Cosmet Sci* [Internet]. 2002 Oct;24(5):303–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18498523>
29. Zhang L, Falla TJ. Cosmeceuticals and peptides. *Clin Dermatol* [Internet]. Elsevier B.V.; 2009;27(5):485–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clindermatol.2009.05.013>
30. Wang Y, Wang M, Xiao S, Pan P, Li P, Huo J. The anti-wrinkle efficacy of argireline, a synthetic hexapeptide, in chinese subjects: A randomized, placebo-controlled study. *Am J Clin Dermatol*. 2013;14:147–53.
31. Wisconsin-Madison) SD (University of. *Aminoácidos, péptidos y proteínas* .pdf. 2000. p. 384–412.
32. Considerations B, Acids A, Bond P. *Peptides and Proteins : the “ Protein World .”* 2008;(Chapter 6):125–44.
33. Belitz H, Grosch W, Schieberle P. *Amino Acids , Peptides , Proteins*. Food Chemistry. 2009. p. 8–92.

34. Weil A. Síntesis de proteínas y el código genético. Harper Bioquímica Ilustrada. 28th ed. McGraw-Hill; 2009. p. 353-368.
35. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, et al. *Biología Celular y Molecular*.
36. Moreno-arribas MV. *Wine Chemistry and Biochemistry*. Moreno-Arribas MV, Polo MC, editors. New York, NY: Springer New York; 2009 [cited 2014 Mar 19];191–212. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-74118-5>
37. Han S-Y, Kim Y-A. Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis. *Tetrahedron* [Internet]. 2004 Mar [cited 2014 Jul 10];60(11):2447–67. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040402004000651>
38. Eichler J. Synthetic peptide arrays and peptide combinatorial libraries for the exploration of protein-ligand interactions and the design of protein inhibitors. *Comb Chem High Throughput Screen* [Internet]. 2005 Mar;8(2):135–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15777177>
39. Miriyala B. *Fluorous Methods for the Synthesis of Peptides and Oligonucleotides*. 2012;(October 2011).
40. Merkel L, Moroder L, Budisa N. *Chemical Protein Engineering : Synthetic and Semisynthetic Peptides and Proteins*. 2009;
41. Chandrudu S, Simerska P, Toth I. *Chemical Methods for Peptide and Protein Production*. *Molecules*. 2013;18:4373–88.
42. Merrifield B. *Solid Phase Peptide Synthesis*. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. 1963;85:2149–54.
43. Katritzky AR, Khashab NM, Yoshioka M, Haase DN, Wilson KR, Johnson J V, et al. Microwave-assisted solid-phase peptide synthesis utilizing N-Fmoc-protected (α -aminoacyl)benzotriazoles. *Chem Biol Drug Des* [Internet]. 2007 Nov [cited 2013 Jun 6];70(5):465–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17949361>
44. Maude S, Tai R, Davies B, Liu S, Harris S, Kocienski P, et al. *Peptide Synthesis and Self-Assembly*. *Top Curr Chem*. 2012;
45. Nelson DL, Cox MM. *PRINCIPLES OF BIOCHEMISTRY*. 2004.
46. Kaiser E, Colescott RL, Bossinger CD, Cook PI. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal Biochem* [Internet]. 1970;34(2):595–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5443684>
http://ac.els-cdn.com/0003269770901466/1-s2.0-0003269770901466-main.pdf?_tid=9d56b76c-97a3-11e2-99dd-00000aab0f26&acdnat=1364474155_53b0b0355ffd0d110c8036536c0ae637

47. Wallace JM, Fox PF. Rapid spectrophotometric and fluorimetric methods for monitoring nitrogenous (proteinaceous) compounds in cheese and cheese fractions: A review. *Food Chem.* 1998;62(2):217–24.
48. Forns P, Fields G. *The Solid Support. Solid-Phase Synthesis.* 2000.
49. Sasikumar PG, Kumar KS, Rajasekharan Pillai VN. Tri(propylene glycol) glycerolate diacrylate cross-linked polystyrene: a new resin support for solid-phase peptide synthesis. *J Pept Res [Internet].* 2003 Jul;62(1):1–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12787445>
50. Van Den Nest W, Albericio F. *The Choice of Solid Support. Optimization of Solid-Phase Combinatorial Synthesis.* 2002.
51. Garcia F, Albericio F. Solid supports for the synthesis of peptides From the first resin used to the most. *Chem Today.* 26(4):29–34.
52. Merrifield B. *Solid-Phase Peptide Synthesis. Peptides: Synthesis, Structure and Applications.* 1995.
53. Moreda-Piñeiro A, García-Otero N, Bermejo-Barrera P. A review on preparative and semi-preparative offgel electrophoresis for multidimensional protein/peptide assessment. *Anal Chim Acta.* 2014;836:1–17.
54. Snow NH. Solid-phase micro-extraction of drugs from biological matrices. *J Chromatogr A.* 2000;885(1-2):445–55.
55. Kamysz W, Okrój M, Lempicka E, Ossowski T, Lukasiak J. Fast and efficient purification of synthetic peptides by solid-phase extraction. *Acta Chromatogr [Internet].* 2004;(14):180–6. Available from: http://www.us.edu.pl/universytet/jednostki/wydzialy/chemia/acta/ac14/zrodla/17_A_C14.pdf
56. Hørning OB, Theodorsen S, Vorm O, Jensen ON. Solid phase extraction-liquid chromatography (SPE-LC) interface for automated peptide separation and identification by tandem mass spectrometry. *Int J Mass Spectrom.* 2007;268(2-3):147–57.
57. Huang J, Guiochon G. Applications of Preparative High-Performance Liquid Chromatography To the Separation and Purification of Peptides and Proteins. ... *Chromatogr B Biomed Sci ... [Internet].* 1989;492. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378434700844771>
58. Odagami T, Kogami Y, Kouji H, Okada Y. Peptides for Youth. *Adv Exp Med Biol [Internet].* 2009;611(Table 1):159–60. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-73657-0>
59. Daşbaşı T, Saçmacı Ş, Ülgen A, Kartal Ş. A solid phase extraction procedure for the determination of Cd(II) and Pb(II) ions in food and water samples by flame

- atomic absorption spectrometry. *Food Chem* [Internet]. 2015;174:591–6. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814614017786>
60. Chutipongtanate S, Watcharatanyatip K, Homvises T, Jaturongkakul K, Thongboonkerd V. Systematic comparisons of various spectrophotometric and colorimetric methods to measure concentrations of protein, peptide and amino acid: Detectable limits, linear dynamic ranges, interferences, practicality and unit costs. *Talanta* [Internet]. Elsevier; 2012;98:123–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2012.06.058>
 61. Huang T, Long M, Huo B. Competitive Binding to Cuprous Ions of Protein and BCA in the Bicinchoninic Acid Protein Assay. *Open Biomed Eng J*. 2010;4:271–8.
 62. Wiechelman et al. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem*. 1988;175:231–7.
 63. Kapoor KN, Barry DT, Rees RC, Anthony Dodi I, McArdle SEB, Creaser CS, et al. Estimation of peptide concentration by a modified bicinchoninic acid assay. *Anal Biochem* [Internet]. Elsevier Inc.; 2009;393(1):138–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2009.06.016>
 64. Yang Y, Boysen RI, Chowdhury J, Alam A, Hearn MTW. Analysis of peptides and protein digests by reversed phase high performance liquid chromatography–electrospray ionisation mass spectrometry using neutral pH elution conditions. *Anal Chim Acta* [Internet]. Elsevier B.V.; 2015;872:84–94. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267015002342>
 65. Rauh M. LC-MS/MS for protein and peptide quantification in clinical chemistry. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* [Internet]. Elsevier B.V.; 2012;883-884:59–67. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.09.030>
 66. Van Eeckhaut A, Mangelings D. Toward greener analytical techniques for the absolute quantification of peptides in pharmaceutical and biological samples. *J Pharm Biomed Anal* [Internet]. Elsevier B.V.; 2015; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708515002009>
 67. Greenfield NJ. Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data. *Anal Biochem*. 1996;235(1):1–10.
 68. Bertucci C, Tedesco D. Advantages of electronic circular dichroism detection for the stereochemical analysis and characterization of drugs and natural products by liquid chromatography. *J Chromatogr A* [Internet]. Elsevier B.V.; 2012;1269:69–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.09.046>
 69. Weiner N, Lieb L. Developing uses of topical liposomes : Delivery of biologically active macromolecules. In: Lasic, Papahadjopoulos, editors. *Medical application of liposomes*. 1998.

70. Flores MP, Perpetua A, Rocha C, Nascimento S. Analgésicos Tópicos. 2012;62.
71. Godin B, Touitou E. Transdermal skin delivery: predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2007 Sep 30 [cited 2014 Jul 22];59(11):1152–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17889400>
72. Emeritus D. Skin biology. *Dermatol Ther*. 2012;24(5):464–70.
73. Menon GK, Cleary GW, Lane ME. The structure and function of the stratum corneum. *Int J Pharm* [Internet]. Elsevier B.V.; 2012 Oct 1 [cited 2014 Oct 24];435(1):3–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22705878>
74. Bartosova L, Bajgar J. Transdermal Drug Delivery In vitro Using Diffusion Cells. *Curr Med Chem*. 2012;19:4671–7.
75. Cevc G. Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. *Adv Drug Deliv Rev*. 2004;56:675–711.
76. Rawlings a. V., Matts PJ, Anderson CD, Roberts MS. Skin biology, xerosis, barrier repair and measurement. *Drug Discov Today Dis Mech*. 2008;5(2):127–36.
77. Cevc G, Vierl U. Nanotechnology and the transdermal route: A state of the art review and critical appraisal. *J Control Release* [Internet]. Elsevier B.V.; 2010 Feb 15 [cited 2013 Feb 28];141(3):277–99. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19850095>
78. Hadgraft J, Lane ME. Skin permeation: The years of enlightenment. *Int J Pharm*. 2005;305(1-2):2–12.
79. Prausnitz MR, Langer R. Transdermal drug delivery. *Nat Biotechnol*. 2009;26(11):1261–8.
80. Bhowmik D, Chandira M, Jayakar B, Sampath KP. Recent Advances in Transdermal Drug Delivery System. 2010;2(1):68–77.
81. P SU, B PH, D BS, K PY, J RM, N SR, et al. Recent advances in Transdermal Drug Delivery System. *J Pharm Res* [Internet]. 2012;5(1):447–56. Available from: <http://ezproxy.csu.edu.au/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=74455181&site=ehost-live>
82. Cronin MTD, Dearden JC, Moss GP, Murray-Dickson G. Investigation of the mechanism of flux across human skin in vitro by quantitative structure-permeability relationships. *Eur J Pharm Sci*. 1999;7(4):325–30.
83. Benson H a E. Transdermal drug delivery: penetration enhancement techniques. *Curr Drug Deliv* [Internet]. 2005 Jan;2(1):23–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16305405>

84. Karande P, Jain A, Ergun K, Kispersky V, Mitragotri S. Design principles of chemical penetration enhancers for transdermal drug delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(13):4688–93.
85. Choi J, Choi MK, Chong S, Chung SJ, Shim CK, Kim DD. Effect of fatty acids on the transdermal delivery of donepezil: In vitro and in vivo evaluation. *Int J Pharm* [Internet]. Elsevier B.V.; 2012;422(1-2):83–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.10.031>
86. Lee JW, Gadiraju P, Park JH, Allen MG, Prausnitz MR. Microsecond thermal ablation of skin for transdermal drug delivery. *J Control Release* [Internet]. Elsevier B.V.; 2011;154(1):58–68. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.05.003>
87. Hasson A. Iontoforesis : definición y aplicaciones en dermatología. *Piel*. 2003;18(1):68–71.
88. Lavon I, Kost J. Ultrasound and transdermal drug delivery. *Drug Discov Today*. 2004;9(15):670–6.
89. Liu KS, Sung KC, Al-Suwayeh S a., Ku MC, Chu CC, Wang JJ, et al. Enhancement of transdermal apomorphine delivery with a diester prodrug strategy. *Eur J Pharm Biopharm* [Internet]. Elsevier B.V.; 2011;78(3):422–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.01.024>
90. Yang F, Jin C, Jiang Y, Li J, Di Y, Ni Q, et al. Liposome based delivery systems in pancreatic cancer treatment: from bench to bedside. *Cancer Treat Rev* [Internet]. 2011 Dec [cited 2013 Jun 6];37(8):633–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21330062>
91. Sharma S, Mishra L, Grover ISH, Gupta A, Kaur K. LIPOSOMES : VESICULAR SYSTEM AN OVERVIEW. 2010;2(4).
92. Lasic DD. Novel applications of liposomes. *Trends Biotechnol* [Internet]. 1998 Jul;16(7):307–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9675915>
93. Dermofarmacia PEN. Liposomas (I). Conceptos generales y relación con las estructuras cutáneas. 2015;21(1):188–90.
94. Pichot R, Watson RL, Norton IT. Phospholipids at the interface: current trends and challenges. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2013 Jan [cited 2013 Oct 3];14(6):11767–94. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3709755&tool=pmcentre&z&rendertype=abstract>
95. Bhagavan N. Lipids II: Phospholipids, Glycosphingolipids, and Cholesterol. *Medical Biochemistry*. 2002.

96. Ohvo-Rekilä H, Ramstedt B, Leppimäki P, Slotte JP. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Prog Lipid Res* [Internet]. 2002 Jan;41(1):66–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11694269>
97. Rydhag L, Wilton I. The function of phospholipids of soybean lecithin in emulsions. *J Am Oil Chem Soc.* 1981;58(8):830–7.
98. Mukhamedova KS, Glushenkova AI. As reported previously [1], the position specificities of the fatty acids (FAs) in the main components of the phospholipids (PhLs) -- phosphatidylcholines (PhCs), phosphatidylethanolamines (PhEs) and phosphatidylinositols (PhIs) -- of soybeans. 1997;33(6):884–5.
99. Da Silva Malheiros P, Micheletto YMS, Silveira NP Da, Brandelli A. Development and characterization of phosphatidylcholine nanovesicles containing the antimicrobial peptide nisin. *Food Res Int* [Internet]. Elsevier Ltd; 2010;43(4):1198–203. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2010.02.015>
100. New R. Preparation of Liposomes. *Liposomes: a Practical Approach.* 1st ed. Oxford: IRL Press; 1990. p. 33–102.
101. Anderson M, Omri A. The Effect of Different Lipid Components on the In Vitro Stability and Release Kinetics of Liposome Formulations. *Drug Deliv.* 2004;11(1):33–9.
102. Franzen U, Østergaard J. Physico-chemical characterization of liposomes and drug substance-liposome interactions in pharmaceuticals using capillary electrophoresis and electrokinetic chromatography. *J Chromatogr A* [Internet]. Elsevier B.V.; 2012 Dec 7 [cited 2013 May 28];1267:32–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22824223>
103. Tseng LP, Liang HJ, Chung TW, Huang YY, Liu DZ. Liposomes incorporated with cholesterol for drug release triggered by magnetic field. *J Med Biol Eng.* 2007;27(1):29–34.
104. Del I, Sobre C, Encapsulación L a, Prados IQ, José P, Benavides H, et al. Anfotericina B En Liposomas Multilaminares. 1974;221–3.
105. Brgles M, Jurasin D, Sikirić MD, Frkanec R, Tomasić J. Entrapment of ovalbumin into liposomes--factors affecting entrapment efficiency, liposome size, and zeta potential. *J Liposome Res.* 2008;18(3):235–48.
106. Elsayed MM a, Abdallah OY, Naggat VF, Khalafallah NM. Lipid vesicles for skin delivery of drugs: reviewing three decades of research. *Int J Pharm* [Internet]. 2007 Mar 6 [cited 2013 May 30];332(1-2):1–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17222523>
107. El Maghraby GM, Barry BW, Williams a C. Liposomes and skin: from drug delivery to model membranes. *Eur J Pharm Sci* [Internet]. 2008 Aug 7 [cited 2013 May 29];34(4-5):203–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18572392>

108. Santana MH a, Zanchetta B. Elastic Liposomes. *Nanocosmetics and Nanomedicines*. 2011;139–62.
109. Cevc G, Gebauer D, Stieber J, Schätzlein a, Blume G. Ultraflexible vesicles, Transfersomes, have an extremely low pore penetration resistance and transport therapeutic amounts of insulin across the intact mammalian skin. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 1998 Jan 19;1368(2):201–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9459598>
110. Ravichandiran V, Masilamani K, Senthilnathan B. Liposome- A Versatile Drug Delivery System. 2011;2(1):19–30.
111. Szoka F. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation *Biochemistry* : 1978;75(9):4194–8.
112. Torchilin. *Liposome a practical approach*. 2003. p. 12–6.
113. Woodbury DJ, Richardson ES, Grigg AW, Welling RD, Knudson BH. Reducing liposome size with ultrasound: bimodal size distributions. *J Liposome Res* [Internet]. 2006 Jan [cited 2013 Jun 6];16(1):57–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16556550>
114. Kulkarni VS. *Liposomes in Personal Care Products. Delivery System Handbook for Personal Care and Cosmetic Products*. 2005.
115. Hannu, K. Anne P. Production and functionality. *Int Dairy J*. 2006;(16):945–60.
116. Lax R. The Future of Peptide Development in the Pharmaceutical Industry. *PharManufacturing Int Pept Rev*. 2010;10–5.
117. 9-Fluorenylmethoxycarbonyl function, a new base-sensitive amino-protecting group. *J Am Chem Soc*. 1970;92:5748–9.
118. Vergel, C. Rivera, Z. Rosas, J. García J. Efficient Synthesis of Peptides with 4-Methylpiperidine as Fmoc Removal Reagent by Solid Phase Synthesis. *J Mex Chem Soc*.
119. Gillet a, Lecomte F, Hubert P, Ducat E, Evrard B, Piel G. Skin penetration behaviour of liposomes as a function of their composition. *Eur J Pharm Biopharm* [Internet]. Elsevier B.V.; 2011 Sep [cited 2013 Jun 6];79(1):43–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21272638>
120. Zheng WS, Fang XQ, Wang LL, Zhang YJ. Preparation and quality assessment of itraconazole transfersomes. *Int J Pharm* [Internet]. Elsevier B.V.; 2012;436(1-2):291–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.07.003>
121. Hinkelmann C, Kempthorne O. *Design and Analysis of Experiments. Introductio to Experimental Desing*. 2007.

122. Kuehl R. Diseño de experimentos. 2001.
123. Maestrelli F, González-Rodríguez ML, Rabasco AM, Mura P. Effect of preparation technique on the properties of liposomes encapsulating ketoprofen-cyclodextrin complexes aimed for transdermal delivery. *Int J Pharm.* 2006;312:53–60.
124. Kale M, Suruse P, Singh R, Malhotra G, Raut P. Effect of Size Reduction Techniques on Doxorubicin Hydrochloride Loaded Liposomes. *Int J Biol Pharm Res.* 2012;3(3):308–16.
125. Hunter RJ. Zeta Potencial in colloids Science. Principles and Applications. 8th ed. London: ACADEMIC PRESS INC; 1988.
126. Preparation L. Size and zeta potential characterisation of anionic and cationic liposomes on the Zetasizer Nano. *Analysis.* :1–4.
127. OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS. Skin Absorption: invitro Method. 428. 2004.
128. Flaten GE, Palac Z, Engesland A, Filipović-Grčić J, Vanić Ž, Škalko-Basnet N. In vitro skin models as a tool in optimization of drug formulation. *Eur J Pharm Sci* [Internet]. 2015; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928098715000858>