



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA

Estudio *in vitro* del efecto fotoprotector UV de
nanopartículas de melanina formuladas en
diferentes formas cosméticas

Tesis

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
LICENCIADO EN FARMACIA

PRESENTA:

LAURA VANELY BASTIDA FRANCO

DIRECTOR DE TESIS
DR. SERGIO ALCALÁ ALCALÁ

Cuernavaca, Morelos.

Fecha: 2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA
SECRETARÍA DE DOCENCIA

Jefatura de la Licenciatura

Fecha: 02 de marzo de 2021
Asunto: Asignación de Jurado
Medio de Notificación: Vía Electrónica
Folio: FF/D/SAC/JLF0029/2021

C. LAURA VANELY BASTIDA FRANCO
MATRÍCULA: 20161002329
P R E S E N T E

Por medio de la presente me permito hacer de su conocimiento, que para la revisión de su trabajo de tesis "**Estudio *in vitro* del efecto fotoprotector UV de nanopartículas de melanina formuladas en diferentes formas cosméticas.**", sea designado al siguiente Jurado Revisor:

Jurado	Firma y Fecha de recepción de tesis
Dr. Jorge Armando Moreno Escobar	_____
Dr. Sergio Alberto Bernal Chávez	_____
Dr. Jesús Rivera Islas	_____
Dra. Diana Lizbeth Gómez Galicia.	_____
Dra. María Luisa García Betancourt	_____

Sin más por el momento me despido enviando un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR UNA HUMANIDAD CULTA"
Una Universidad de Excelencia

DR. EFREN HERNANDEZ BALTAZAR
DIRECTOR

C.i.p. – Archivo.
*OTA
Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209, Edificio 61
Tel. (777) 329 70 89, Ext. 3365 y 3698 / edder.bahena@uaem.mx



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

EFREN HERNANDEZ BALTAZAR | Fecha:2021-03-15 10:06:26 | Firmante
ImKP4dAx3pFAi75dqFCxysPXc873eb+ZnAbZ/eNcuJckHDNOLQv9CqMYIPB6Zigsqn+7JHU6B8uwYpCqyxnjd9v5KQ1EXtI3bnz2289e6tp3qvx5aiH4i0S9I/mv38J8AB7JF6Pz5wjf
KCY5wCVOGeSGmW4VAKEIKzOIBWCbZWbMTfMibokplHjThwk5YTpTgnOIKWBySagvCIUFEm8smbRkTcPpj7EzXgi1L2ur7iPXLQw+yyyszJv04+JDGZ4G2sCzMedEA7q6
5qDOB1Te28TDGAf5Kirf15GGGDU+Yqs6BcGqDAL9OtvMpaL9DbLFJEzcYGBKX+v50ekA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[AmHw4c](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/nvzVGFyhffMxidKUQ5kwsPhR73QvmDj>





Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JESUS RIVERA ISLAS | Fecha:2021-03-27 08:52:23 | Firmante
 h3xI7JhVtvtjVIBDc4h4EK56WIEUPt6lINPzJ757IElcOVHy7sw798ZpSzYZRoi+DmMl/wrYGOjAlAWBrdYUHaKXj/3F6JX17x4ZQ4JStw+6e6N1hLESKR43wg0clwxiwGUYDtc7yKS+F8noH0Uoaqke5Ny6jPhXvmQBjWFKMrAxtUW3er3+IurAwmyED9QH589afpAgmEua1yxuXpAVHLPPGkLIV/018hn6nAtnUegmaZq9Z11wnfpmcx3VFcmid8uSWsilSL5PhYRob4IGzIfeNHNvno8MStnHv9gm8/mXmMFFCHfB2F3GY5FZkhWFdgV13W5TmyqmUQA==

MARIA LUISA GARCIA BETANCOURT | Fecha:2021-03-27 13:15:24 | Firmante
 A2XPLpWzP0xq3lzEoDtpBD3Lg9cHj0g9WeNpK1cKM5ZnR/zQJUZ66JOFnu4DKCEzzD/3ft+P8nTJVhapGqaLU2VEFPa90ZRTz+/5nnjQik4tLUZaNR50QR5Vf2rc5sOJdNzUW0m135Xpxt2jWJodS0AvV3oXchGDP0uOwiDxCupYvCPmERIQKa/X2aF0P6Lj0y/32qmdBBF7cvJcl.SuAeKzPV4zsS3n2UjdW5Xjv+1c1Yf1el1sJfndfMXCNEBRz0Bg5Wv97SkjCn8e28WdBh8/hGBgB03IHDTODYpZaxflZ8dHZLkvhC1+1uJFTxULwuAGFOY7wQgTj8B/Vsw==

MARIA LUISA GARCIA BETANCOURT | Fecha:2021-03-27 13:15:24 | Firmante
 A2XPLpWzP0xq3lzEoDtpBD3Lg9cHj0g9WeNpK1cKM5ZnR/zQJUZ66JOFnu4DKCEzzD/3ft+P8nTJVhapGqaLU2VEFPa90ZRTz+/5nnjQik4tLUZaNR50QR5Vf2rc5sOJdNzUW0m135Xpxt2jWJodS0AvV3oXchGDP0uOwiDxCupYvCPmERIQKa/X2aF0P6Lj0y/32qmdBBF7cvJcl.SuAeKzPV4zsS3n2UjdW5Xjv+1c1Yf1el1sJfndfMXCNEBRz0Bg5Wv97SkjCn8e28WdBh8/hGBgB03IHDTODYpZaxflZ8dHZLkvhC1+1uJFTxULwuAGFOY7wQgTj8B/Vsw==

JORGE ARMANDO MORENO ESCOBAR | Fecha:2021-03-27 20:10:11 | Firmante
 oYLTKBAJkEeRvrAdJGgdQfPPqYyoAq4XUTJKEAsn8HErXquls73P5Ldhh1f06HW/S9BtIPJfJaOxggZVD1MilrP5rZA50IMablQhmT9XCuPk3KyrYhkwRVYCWTAUY6ft1ZaFJ5H9k6nbC111BPJZqLSCb3BIWwoFrKZ0PFYyKkdObkSGzMWiaZJslfv9R4hG89c176M5uLHw8d1Wa6+eVsvQHbLGNalHQSpEXcRPTYtyk.Jpo9GcxGANBP0xoObI0BKysMKwwijZ7M0yCwE9fmCA214ilk3BTu9B6ZKVSBU0YvmzDjns1N40Y6jYPrShv0NJZjaouUWg==

SERGIO ALBERTO BERNAL CHAVEZ | Fecha:2021-03-28 07:51:49 | Firmante
 cFoaB9pM3qc211TD+AKxR6yPiyAbdssdIgtFVkv3soZKLcj85E0JAGpifzKwoKdyDDUbxprKpql2N9XkLJIS09ByuuZwojXu1ewycVb/6A7wk0dgn8g/263plv9QE87SOQ09GX/ITQ0jTnyPUbHBUqT8H/Bo5SCPZLKBQHR9kg5AR5IabmFFKkEMwMHZdBfULCvHwojxn07V0OCBrKnaKX6DPXehFnc0q4tXDEwMgcQmnNzndQrTo845Y5CpMHIBe7+IP9KwW+ZHK54GLYJmDz1DyYnY3d88BUS16u4d6HAM2tFgKZiaXozjqcEnWVLIm613Gc21bZkQ3QKA==

DIANA LIZBETH GOMEZ GALICIA | Fecha:2021-04-09 09:11:57 | Firmante
 Ah05H62S0CEFKwyx3+656yp0blzu9Ya7aJsWz6noAH0eCrddbPM67ynp95z4N8otS0WnAt0P64pRc7LFFqDHPJXKXyXTc5YeUjyJ8dgdvokdZ34ggPsgRlHskX2vReRiCI5eEDirFyuEiWFR+JNX5jRixvveyi2ny2638OuvC5zWGK+0mSYLbq4i471L8tDg+O0egENhHMPvs56Ani879tmjQdvWBgAwnQ8YrEdQIEGJHd51rFHfKcYz+6rX494lIbtdNMUfh4uakJ+TVxiz2LARGiV7bUDBMYW/6v2Y8wR2Tx944yo4AuVTK99ihC2CRQ2uimjAZw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



0FTwd2

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/pqspmNGuRjw5Ndgvm4Xnz9ktAhqf3xa7>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación en Tecnología Farmacéutica (Laboratorio- 1) de la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, bajo la dirección del Dr. Sergio Alcalá Alcalá.

DEDICATORIA

El presente trabajo está dedicado a mis mejores amigos y compañeros de generación, con los que conviví durante estos últimos años, creciendo, conviviendo y sobre todo apoyándome por sobre todas las cosas en lo personal y lo profesional. Gracias Itzel Aguirre Sandoval, Andrea Gómez Martínez e Israel Torres Arce por estar siempre ahí, para todo.

Dedicado a Fausto Cesar Acevedo Torres, por estar conmigo en estos últimos años en todo sentido y no dejarme caer jamás, por poner toda tu confianza en mí, por tu amor incondicional, por apoyarme y ayudarme en cualquier decisión que pudiera tomar, por hacerme crecer como persona y sobre todo por permitirme estar en esta y mil vidas más a tu lado.

Dedicado a mi compañera de tesis María Betzabeth Vargas Catalán, con quien después de años coincidimos de la mejor manera para trabajar en conjunto y hacer de este último año de carrera un tiempo productivo, gracias por estar conmigo con la actitud en alto. De igual manera, gracias Brenda Quetzalli Pimentel Urzúa, por mantenerte y apoyarme, donde las tres pudimos crecer en lo académico y profesional con nuevos proyectos e ideas.

Quiero dedicar mi trabajo y esfuerzo a todas las personas y familiares que tuvieron un espacio para apoyarme cuando las necesitaba; gracias a mi tía Rocío Franco Salinas y a toda su familia por estar conmigo para ayudarme por más mínima cosa de la que requiriera de ustedes. Gracias a la familia Franco y a la familia Bastida por tanto apoyo de su parte.

Dedico mi trabajo a mis abuelo Isaac Franco Valadéz, y sobre todo a mi abuela, amiga y confidente, mi mami Angelina Salinas González, quién merece una dedicatoria especial por estar desde el primer día conmigo para darme todo lo que estuviera a su alcance, acompañándome en mis desvelos, apoyándome en mi vida desde siempre y por ser mi segunda madre.

Pero sobre todo, quiero dedicarles este logro a mis padres, Laura y Alfredo, quienes han sido parte fundamental en mi vida para llegar hasta donde me encuentro, por formar a la persona que soy hoy en día y por mantener su confianza en mí para poder sacar mi carrera adelante, desde un inicio hasta el final de ella. Nunca me faltó nada gracias a ustedes y estuvieron conmigo a pesar de las adversidades que la vida pudiera traer, para dar, proveer y tenderme una mano cuando lo requería.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Sergio Alcalá Alcalá por la confianza depositada en mí para comenzar con este proyecto, por su apoyo, su confianza, paciencia y su guía para culminar con mi trabajo y mi estancia en la carrera. Gracias por ser un excelente docente y tutor, por brindarme su apoyo en cada obstáculo que se me presentara dentro y fuera de mi estancia en las instalaciones del laboratorio; estoy agradecida por la experiencia obtenida, ya que gracias a ella descubrí lo que en verdad me gusta y sobre lo que me gustaría experimentar hacer con mi vida laboral.

Agradezco al Dr. Jorge Armando Moreno Escobar, al Dr. Sergio Alberto Bernal Chávez, al Dr. Jesús Rivera Islas, a la Dra. Diana Lizbeth Gómez Galicia y a la Dra. María Luisa García Betancourt por formar parte del Comité Revisor de la Tesis, por su tiempo y aporte de observaciones y sugerencias para la mejora y perfeccionamiento de lo expuesto en este trabajo.

Agradezco a las personas que me ayudaron en mi formación, a profesores, técnicos y compañeros, quienes compartieron conmigo parte de sus conocimientos, sabiduría y experiencia para despertar en mí el interés por la carrera y sobre todo por la ciencia.

Agradezco a todas las personas que han estado, que estuvieron y que siguen conmigo, porque cada una de ellas ha dejado parte de su esencia y enseñanzas para volverme la persona que soy hoy en día, y porque gracias a ellas he logrado lo que me ha llevado a estar en este punto de mi vida.

Agradezco infinitamente a mi familia por estar siempre para mí en cualquier cosa que pudiera apoyarme para poder culminar mi carrera, y sobre todo a la familia que formé dentro de las instalaciones de la Facultad, ya que sin ellos, la proeza hubiera sido mayor.

INDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ABREVIATURAS.....	viii
RESUMEN	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES	4
2.1 La piel	4
2.1.1. Anatomía y estructura.....	4
2.1.2 Capas de la piel y sus funciones	5
2.2. Melanina.....	6
2.2.1 Estructura y melanogénesis	6
2.2.2 Funciones de la melanina	7
2.3. Radiación solar.	9
2.3.1 Tipos de radiación solar que llegan a la Tierra.....	9
2.3.2 Efecto de las radiaciones sobre la piel	9
2.3.3. Tratamientos para el daño por radiación solar	11
2.4. Protectores solares.	15
2.4.1 Clasificación de protectores solares.....	15
2.4.2. Normatividad nacional e internacional.....	19
2.4.3. Factor de protección solar (FPS)	23
2.4. Nanotecnología	26
2.4.1. Nanotecnología aplicada a protección solar	26
2.4.2. Conceptos.....	26
2.4.3. Clasificación de las nanopartículas.....	27
2.4.4. Enfoques de manufactura	28
2.4.4. Caracterización física.....	30
2.4.4.3. Caracterizaciones ópticas.....	32
2.4.5. Biocompatibilidad y toxicidad de las nanopartículas	33
2.4.6. Nanopartículas de melanina	34

3. JUSTIFICACIÓN.....	37
4. OBJETIVOS	38
4.1 Objetivo general.....	38
4.2. Objetivos específicos.....	38
5. HIPÓTESIS	39
6. DIAGRAMA DE LA ESTRATEGIA METODOLÓGICA	40
7. METODOLOGÍA.....	41
7.1. Caracterización de la melanina recombinante preformada como materia prima.....	41
7.1.1. Tratamiento de la materia prima	41
7.1.2. Identidad por espectrometría UV-Vis	41
7.1.3. Identidad por espectroscopía infrarrojo	41
7.2. Método analítico por espectrofotometría UV para la cuantificación de la melanina	41
7.3. Obtención de nanopartículas de melanina	42
7.3.1. Método de doble emulsión- evaporación (DE)	42
7.3.2. Optimización, concentración, lavado y recuperación.....	43
7.3.3. Caracterización de nanopartículas de melanina	44
7.4. Obtención de las formulaciones cosméticas para las nanopartículas de melanina	45
7.4.1. Establecimiento de las formas cosméticas bajo el enfoque QbD	45
7.4.4. Caracterización de las formulaciones- medición de los Atributos Críticos de Calidad ...	49
7.5. Determinación del factor de protección solar	51
8. RESULTADOS.	53
8.1. Caracterización de la melanina recombinante preformada como materia prima.....	53
8.1.1. Tratamiento de materia prima.....	53
8.1.2. Identidad por espectrofotometría UV-visible	54
8.1.3. Identidad por espectroscopía IR de la melanina materia prima.....	55
8.2. Método analítico por espectrofotometría UV para cuantificar melanina	55
8.2.1. Exactitud del método analítico por espectrofotometría UV para cuantificar melanina.	56
8.2.3 Medición de la concentración de nanopartículas de melanina	57
8.3. Obtención de nanopartículas de melanina (MNP's)	57
8.3.1. Optimización, concentración, lavado y recuperación.....	57
8.3.2. Caracterización de nanopartículas de melanina	58
8.4 Obtención de las formulaciones cosméticas para las MNP's.....	59
8.4.1. Establecimiento de las formas cosméticas bajo el enfoque QbD	59

8.4.2. Selección de excipientes	70
8.4.4. Caracterización de las formulaciones-medición de CQA's.....	74
8.5. Determinación <i>in vitro</i> del FPS mediante el método de Mansur.....	75
9. DISCUSIÓN.....	77
10. CONCLUSIÓN GENERAL.....	81
11. CONCLUSIONES PARTICULARES.....	82
12. PERSPECTIVAS.....	83
13. REFERENCIAS.....	85
14. ANEXOS.....	90

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Capas de la piel y sitio de alojamiento de los melanocitos.....	04
Figura 2. Vía de síntesis de la melanina. Dopa: dihidroxifenilalanina; DHI: 5,6-dihidroxiindol; DHICA: 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico; TRP: proteína relacionada con la tirosinasa	07
Figura 3. (a) Emulsión cosmética tipo crema; (b) Emulsión cosmética tipo.....	18
Figura 4. Forma cosmética en gel.	18
Figura 5. Forma cosmética de protector solar en forma de aceite corporal.....	18
Figura 6. Forma cosmética de protector solar en forma de espuma.	19
Figura 7. Logotipo del Factor UVA.	20
Figura 8. Métodos sintéticos típicos para NP's para los enfoques de arriba hacia abajo (top-down) y de abajo hacia arriba (bottom-up)	29
Figura 9. (A) Cambio en la densidad de carga alrededor de un coloide; (B) distribución de iones positivos y negativos alrededor del coloide cargado.	32
Figura 10. Diagrama de la estrategia experimental.	40
Figura 11. Sistema de montaje para la elaboración de NPs de melanina por el método de doble emulsión- evaporación de disolvente.....	43
Figura 12. Diagrama de tipos de formulación, bases, diferencias tecnológicas y controles realizados.....	47
Figura 13. Sistema de montaje para la medición de la relación temperatura-viscosidad de geles termosensibles.	50
Figura 14. (A) Melanina materia prima preformada sin tratamiento; (B) Melanina materia prima pulverizada.	53
Figura 15. Espectro UV-visible de la melanina materia prima en NaOH	54
Figura 16. Espectro IR de melanina materia prima.	55
Figura 17. Distribución del tamaño de partícula del lote 7 de NP's de melanina obtenidas por el método de doble emulsión-evaporación de disolvente.	58

Figura 18. Distribución del potencial Z del lote 4 de NP's de melanina obtenidas por el método de doble emulsión-evaporación de disolvente.....	59
Figura 19. Diagrama de Ishikawa para protectores solares con nanopartículas de melanina como activo cosmético.....	66
Figura 20. Relación temperatura sol-gel de gel termosensible.....	75
Figura 21. Curva de calibración de la melanina de origen recombinante como materia prima.....	91

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Funciones de la piel	05
Tabla 2. Tipos de radiación ultravioleta, longitud de onda y su efecto sobre la piel	08
Tabla 3. Fototipos cutáneos.....	09
Tabla 4. Sistema de protección solar recomendado dependiente del índice UV	10
Tabla 5. Afecciones en la piel y su tratamiento.....	11
Tabla 6. Factores de protección solar ajustados según la NOM-141-SSA1/SCFI-2012	22
Tabla 7. Relación entre el efecto eritemogénico y la intensidad de la radiación de cada longitud de onda.....	26
Tabla 8. Clasificación de las nanopartículas basada en sus dimensiones	27
Tabla 9. Condiciones de medición de talla de nanopartículas de melanina por dispersión dinámica de luz.....	44
Tabla 10. Condiciones de medición del PZ de nanopartículas de melanina	44
Tabla 11. Niveles de riesgo de Parámetros Críticos De Proceso y Materiales	46
Tabla 12. Relación entre el efecto eritemogénico y la intensidad de la radiación de cada longitud de onda para el Método Mansur, determinada por Sayre	52
Tabla 13. Perfil de producto objetivo para protectores solares con nanopartículas de melanina.....	60
Tabla 14. Perfil de Calidad de Producto Objetivo (QTPP) para protectores solares con nanopartículas de melanina.	61
Tabla 15. Propuesta de formulación y materiales aplicables para emulsión cosmética (loción) que contenga nanopartículas de melanina.	63

Tabla 16. Propuesta de formulación y materiales aplicables para gel termosensible que contenga nanopartículas de melanina.....	64
Tabla 17. Propuesta de formulación y materiales aplicables para aceite fluido que contenga nanopartículas de melanina.....	65
Tabla 18. Escala del nivel de riesgo que suponen las variables propuestas para los Atributos Críticos de los Materiales (CMA's) y Parámetros Críticos de Proceso (CPP's).....	67
Tabla 19. Atributos Críticos de los Materiales (CMA's) para formulación de la emulsión propuesta	67
Tabla 20. Atributos Críticos de los Materiales (CMA's) para formulación del gel termosensible propuesta	69
Tabla 21. Atributos Críticos de los Materiales (CMA's) para formulación del aceite fluido propuesta	70
Tabla 22. Selección de excipientes para las formulaciones de protectores solares que contienen MNP's como activo cosmético	71
Tabla 23. Estudio de estabilidad de las formulaciones candidatas para su uso como vehículo de MNP's.	74
Tabla 24. Factor de protección solar de protectores solares con MNP's como activo cosmético.....	76
Tabla 25. Absorbancias a diferentes concentraciones para curva de calibración de melanina preformada.....	90
Tabla 26. Exactitud del método.....	91
Tabla 27. Precisión del método.....	92
Tabla 28. Determinación del límite de cuantificación y detección.....	92

ABREVIATURAS

μg	Microgramos
\bar{X}	Media
λ	Longitud de onda
0D	Cero dimensión
1D	Unidimensional
2D	Dimensional
3D	Tridimensional
BET	Brunauer-Emmett-Teller
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius
CMA's	Parámetros Críticos De Materiales
cm	Centímetros
CPP's	Parámetros Críticos De Proceso
CVD	Deposición química en fase de vapor
C.V.	Coefficiente de variación
CQA's	Atributos Críticos de Calidad
DCM	Diclorometano
DE	Doble emulsión – Evaporación de disolvente
DLS	Dispersión de luz dinámica
DRS	Espectrómetro de reflectancia difusa UV/vis
EDX	Rayos X de energía dispersiva
FDA	Administración de Fármacos y Alimentos
FPS	Factor de Protección Solar
G.E.	Gravedad específica
h	Hora
HCl	Ácido clorhídrico
HLB	Balance Hidrofílico- Lipofílico
I.C.	Intervalo de confianza
IR	Infrarrojo
L.C.	Límite de cuantificación
LCVD	Técnica de deposición de vapor químico con láser
L.D.	Límite de detección
mg	Miligramos
mL	Mililitros
MNPs	Nanopartículas de melanina
N	Concentración Normal
NaOH	Hidróxido de sodio
nm	Nanómetros
NPs	Nanopartículas
NSMs	Efectos de tamaño novedoso de materiales nanoestructurados
PDI	Índice de polidispersión
PL	Fotoluminiscencia

PNP	Nanopartículas de polímero
POM	Microscopía óptica polarizada
PVA	Alcohol polivinílico
PZ	Potencial zeta
QbD	Calidad por Diseño
QTPP	Perfil de Calidad del Producto Objetivo
r^2	Coefficiente de determinación
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
SEM	Microscopio electrónico de barrido
SERS	Espectroscopia Raman mejorada en superficie
TEM	Microscopio electrónico de transmisión
TPP	Perfil de Producto Objetivo
UV	Ultra Violeta
UVA	Rayos Ultravioleta A de onda larga
UVB	Rayos Ultravioleta B de onda corta
UVC	Rayos Ultravioleta C de onda corta
Vis	Visible
W/O	Emulsión agua/aceite
W/O/W	Emulsión agua/aceite/agua
XPS	Espectroscopia de fotoelectrones de rayos X
XRD	Difracción de rayos X

RESUMEN

La piel es el órgano más grande que posee el cuerpo humano, la cual se encuentra expuesta constantemente a factores externos químicos, mecánicos o físicos que pueden llegar a producirle daño. Tal es el caso de la radiación solar, causante directa de afecciones como quemaduras solares, fotoenvejecimiento, y en los casos más extremos, melanomas. A pesar de que la piel cuenta con mecanismos que la ayudan a protegerse de la radiación solar, siendo la melanina un polímero presente en ella que actúa frente a este tipo de emisiones, los casos de problemas relacionados con la radiación solar continúan en aumento debido a que año con año la capa de ozono que protege a la Tierra de la entrada de radiaciones perjudiciales se encuentra en una constante pérdida de volumen a causa de la contaminación y emisión de gases arrojados hacia la atmósfera de manera descontrolada, haciendo que cada vez sea más necesaria la protección extra que debemos tener ante este factor como lo es el uso de los protectores solares.

Estos productos están a la venta en diferentes presentaciones y contienen diversos filtros que les confieren la característica de proteger frente a la radiación solar mediante la absorción de fotones, la reflexión de la radiación solar o con el impedimento de la formación de radicales libres, sin embargo, estos son difíciles de formular debido a la gran cantidad de filtros e ingredientes necesarios para su manufactura, repercutiendo sobre la potencial toxicidad que poseen al tener un uso constante de estos. En la búsqueda de una alternativa viable frente al uso de los protectores solares convencionales, se propone el uso del polímero presente en la piel que funge con esta misma función: la melanina.

Gracias a los avances en la biotecnología, ha sido posible obtener moléculas en un ambiente controlado que normalmente se encuentran de forma natural en el cuerpo humano, como el caso de la melanina de origen recombinante. Este polímero candidato a activo cosmético por sus propiedades, resulta tener características poco convenientes para su uso en cualquier tipo de formulación puesto que tiene una baja solubilidad. Con la innovación de la nanotecnología, en este trabajo fue posible llevar este material hasta un tamaño nanométrico con tallas de 275.33 ± 83.62 nm con el método de doble emulsión evaporación de disolvente, mejorando así su solubilidad y aumentando el área superficial de las partículas, esperando ofrecer una mayor protección frente a la radiación solar con su uso.

Para contenerlas se realizaron 3 formulaciones con diferentes bases: una emulsión, un gel y un aceite fluido, cada uno pasando por una evaluación de Calidad por Diseño con el fin de evitar en gran medida los problemas resultantes que podrían provocar un fallo en la manufactura, encontrando los materiales adecuados y hallando los factores de riesgo que pudiesen afectar negativamente al producto final, lo que facilitó la integración de las nanopartículas a los diferentes medios propuestos. Obtenidas estas formulaciones, se utilizó la metodología de Mansur para poder calcular el factor de protección solar, utilizando como referencia un simulador para conocer el FPS del control positivo a utilizar.

Los resultados sugieren que las nanopartículas de melanina de origen recombinante pueden fungir como activo cosmético, ya que confieren protección solar con FPS arriba de 6 cuando se utilizan en porcentajes que van arriba del 1% w/v, siendo la formulación del aceite fluido la que presentó mayor capacidad de protección.

1. INTRODUCCIÓN

La piel es el órgano más grande que posee el cuerpo humano y con el que mayormente nos mantenemos en contacto en nuestra vida cotidiana y por tanto se encuentra meramente expuesta a diferentes factores externos como microorganismos, sustancias químicas, variaciones de temperatura y la misma radiación solar. Para tales efectos cuenta con diferentes mecanismos que la protegen, como la membrana celular que ayuda a permear sustancias exógenas o la melanina que es un componente importante para su coloración y el resguardo de los efectos potenciales que se presentan en la piel al permanecer por tiempos prolongados al sol. La melanina es producida por un grupo de células presentes en la piel llamadas melanocitos, quienes la distribuyen en gránulos que son incorporados a los queratinocitos, otro tipo de células que conforman la capa externa de la piel, obteniendo así el color que podemos ver en cada individuo, siendo más o menos oscuro dependiendo de la genética de las personas y de las condiciones en las que se encuentre la persona, ya que la melanina se produce en mayor o menor medida dependiendo de la cantidad y el tiempo a la que estemos sometidos al efecto de la luz o radiación. [1]

A pesar de que la piel cuenta con este mecanismo de protección es necesario contar con un cuidado adicional ya que con el auge de la contaminación, el uso de sistemas de refrigeración y sobre todo la utilización de sustancias químicas que contienen cloro como los clorofluorocarbonos han contribuido a que la capa de ozono, encargada de la protección contra la radiación solar, comenzando con un proceso de deterioro. Esta capa se encuentra en la estratósfera y tiene como función el absorber o reflejar la radiación ultravioleta emitida por el sol mediante mecanismos de dispersión generada por gases y vapor de agua. La protección a los diferentes tipos de radiación, evita o reduce algunos efectos negativos contra la piel, como manchas, quemaduras, fotoenvejecimiento y, en el peor de los casos el cáncer de piel. [2] Para lograr coadyuvar en este cuidado adicional, la ciencia del cuidado de la piel ha propuesto diferentes sistemas para contrarrestar los fotoefectos negativos a través de diferentes cosméticos, por lo que la industria de los protectores solares ha ido creciendo a lo largo de las últimas décadas, incluso la generación de este tipo de productos no cuenta con más de cien años siendo utilizados por las personas.

En la época de la Segunda Guerra Mundial los soldados que trabajaban en cubiertas de portaaviones o en balsas, y que se encontraban en zonas sumamente calurosas como África o Filipinas, las Fuerzas Aéreas de los Estados Unidos de América distribuían el llamado aceite de parafina rojo, un derivado del petróleo que fue utilizado como el primer protector solar de manera no comercial [3]. En contraste a esto, el estilista y perfumero francés Jean-Alexandre Patou en el año de 1927 creó

el primer protector solar denominado *Huile de Chaldée* o aceite de caldea, siendo utilizado para cumplir con los requerimientos estéticos de aquellos tiempos dado que comenzaba la moda de las pieles bronceadas [4], iniciando así la industria dedicada a la venta de los primeros productos cosméticos dedicados al cuidado de la piel frente a la luz emitida por el sol. Actualmente se prevé que la industria dedicada al cuidado de la piel llegue a ser valuada en cerca de \$54 mil millones de dólares estadounidenses para el año de 2025, donde se incluyen los productos dedicados a la protección solar, siendo América Latina una de las regiones con mejor potencial de crecimiento en esta área. [5] En México hay gran variedad de productos para la protección solar, diversas marcas, diferentes tipos de protección, múltiples formas cosméticas, precios y distintos factores de protección, proporcionando así al mercado una complejidad enorme al momento de la elección de un bloqueador que se ajuste mejor a la economía y necesidades de cada individuo.

El gran problema con los protectores solares convencionales es que para generar una formulación que sea eficaz, eficiente y que cumpla con los requerimientos normativos, es necesario utilizar grandes porcentajes de los compuestos que otorgan el impedimento del paso de los rayos solares a la piel dentro de las cremas, geles, aceites o cualquier otra forma cosmética que se encuentre a la venta en el mercado. Recientemente, ha habido un auge importante en el uso de filtros químicos que han presentado irritabilidad, toxicidad o absorción sistémica, lo que no es propio de los cosméticos, pues se utilizan altas concentraciones para lograr el efecto deseado. [6] Los filtros físicos presentan una menor toxicidad, como es el uso de dióxido de titanio o zinc, sin embargo presentan sensoriales no tan bien apreciados como el “efecto payaso”, donde la zona de aplicación del producto se aprecia de un color blanco intenso, debido a su insolubilidad o gran tamaño de partícula, mismos que han sido modificados para mejorar aspectos tecnológicos de dichos productos haciendo uso de nanomateriales con el fin de combatir problemas tanto en su formulación, como en la aceptación del cliente. [1] Por otro lado, en 2019 la FDA aprobó un medicamento llamado Scenesse® el cual favorece la producción de melanina en la piel, independientemente de la exposición a la luz solar o fuentes de luz artificial UV [6], sin embargo, es un tratamiento farmacológico y sistémico que tendría implicaciones biológicas y otros problemas que podrían tener repercusiones sobre la salud del paciente.

Para resolver situaciones como la anterior, los grandes avances en la biotecnología e ingeniería genética han permitido que moléculas biológicas que anteriormente solo se conseguían mediante métodos en animales puedan ser producidas en laboratorio y a escala industrial, de manera que esto sea una ventaja para poder ser empleadas para el uso humano con resultados más precisos y mayormente controlados. Ejemplo de estos materiales es la melanina recombinante, la cual al tener el efecto de protección solar de manera natural en la piel, se podría aprovechar para poder ser usada en productos cosméticos al ser aplicada de forma externa y

poder mejorar la protección contra los diferentes tipos de radiación ultravioleta que existen. Así, con un material biocompatible es posible reducir complicaciones con la piel y disminuir la incidencia de enfermedades en este órgano. Sin embargo, la melanina de origen recombinante es obtenida en forma sólida con un aspecto similar a piedras o gránulos pequeños e irregulares, lo que haría difícil crear una formulación que pudiera contenerla de manera segura y estable, es por ello que ha surgido el interés de autoensamblarla para producir una nanopartícula para potenciar sus efectos de superficie y cuánticos, y entonces evaluar su efecto fotoprotector UV, ya que debido a su tamaño nanométrico se podría potenciar su efecto protector y crear además una suspensión que es transparente al aplicarse. Por lo que el reto es poder buscar la mejor formulación y forma cosmética, que sea estable y con propiedades tecnológicas para emplearse como protector solar.

2. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

2.1 La piel

2.1.1. Anatomía y estructura.

La piel es el órgano de mayor tamaño que posee el ser humano contando con una superficie de aproximadamente 1,8 m² con un 16% del peso corporal (alrededor de 3,6 kg para una persona promedio), protegiendo al cuerpo de su exterior y al mismo tiempo permitiendo la interacción con su ambiente. Es una estructura compleja conformada por tres capas que contienen distintos tipos de células que cumplen con distintas funciones, siendo estas la epidermis, dermis e hipodermis (Figura 1). Estas divisiones son unidades funcionales e interdependientes que dependen de tejido circundante y su conexión para regular y modular la estructura y función normal de la piel.

Los melanocitos se encuentran en la epidermis [7], y se diferencian de otras células del estrato basal por la posesión de procesos dendríticos por los cuales transfieren el pigmento por un grupo de queratinocitos, formando una unidad epidérmica de melanina. El rasgo característico de los melanocitos es un orgánulo citoplasmático especial conocido como melanosoma en el cual se forma la melanina por acción de la enzima tirosinasa. Los melanosomas aparecen como vesículas esféricas, limitadas por membranas, en la zona del aparato de Golgi [8], los cuales se mueven al final de las dendritas de los melanocitos que se encuentran más cerca de la superficie de la piel y se transfieren a los queratinocitos [9], confiriéndole a la piel las tonalidades que la caracterizan, dependiendo del tipo de melanina que el cuerpo produzca, como se explicará más adelante.

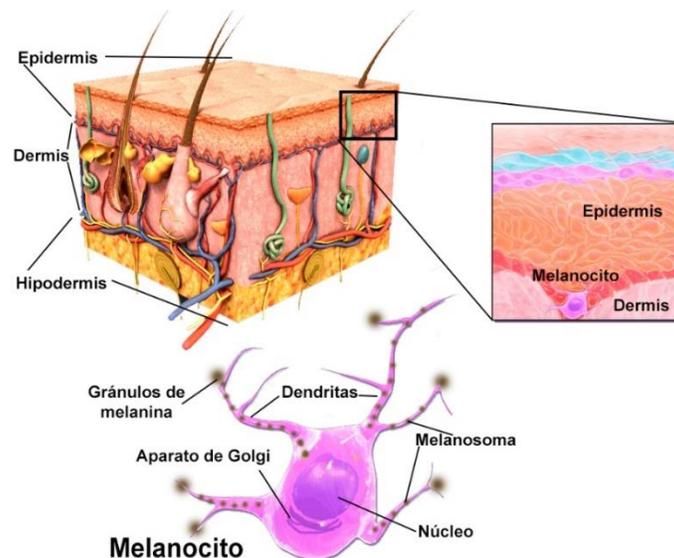


Figura 1. Capas de la piel y sitio de alojamiento de los melanocitos. [Imagen tomada y adaptada de la referencia 1]

2.1.2 Capas de la piel y sus funciones

Algunas de las funciones que cumple la piel y que nos brindan las diferentes células de las que está formada, son la protección contra agentes físicos, químicos y biológicos que se encuentran de manera externa al cuerpo, permeabilidad ante todo tipo de sustancias, termorregulación y protección contra rayos ultravioleta, entre otras, sintetizado en la Tabla 1.

Tabla 1. Funciones de la piel [10]		
Capa de la piel	Células encargadas y/o sitio de alojamiento	Función
Epidermis	Queratinocitos; estrato corneo.	Fabricación y almacenamiento de queratina, dando dureza al cabello, piel y uñas.
		Previene la penetración de microorganismos y la deshidratación de los tejidos subyacentes, y proporciona una protección mecánica contra la abrasión.
	Papilas dérmicas; estrato basal.	Aumentan la fuerza de la conexión entre la epidermis y la dermis.
	Célula de Merkel; estrato basal.	Estimula los nervios sensoriales que el cerebro percibe como tacto.
	Melanocitos; estrato basal.	Produce melanina, que da color al cabello y la piel, y protege el ADN en los núcleos de las células vivas de la epidermis del daño de la radiación ultravioleta (UV).
	Células de Langerhans; estrato espinoso.	Macrófago, engulle bacterias, partículas extrañas y células dañadas.
Dermis	Fagocitos; capa papilar.	Ayudan a combatir las bacterias u otras infecciones que han penetrado la piel.
	Tejido conectivo irregular denso; capa reticular.	Atribuye flexibilidad a la piel.
	Fibras de elastina; capa reticular.	Aportan elasticidad a la piel, permitiendo el movimiento.
	Las fibras de colágeno; capa reticular.	Proporcionan estructura y resistencia a la tracción, con hebras de colágeno que se extienden tanto a la capa papilar como a la hipodermis. Además, el colágeno se une al agua para mantener la piel hidratada.

Hipodermis	Tejido conectivo areolar vascularizado y tejido adiposo	Almacenamiento de grasa, proporciona aislamiento y amortiguación para el tegumento.
	Fascia	Envoltura gruesa de tejido conectivo que rodea los músculos esqueléticos, anclándolos a los tejidos circundantes e invirtiendo grupos de músculos.

2.2. Melanina

2.2.1 Estructura y melanogénesis

La melanina es el principal componente que determina el color de la piel, siendo esta un grupo de polímeros quinoides presentes en distintos reinos que se generan mediante la polimerización oxidativa de compuestos indólicos o fenólicos, que puede presentarse en diferentes colores distintos como parte de un proceso evolutivo en respuesta de los organismos para su supervivencia.

A partir de la evolución, surgieron los siguientes tipos de melanina conocidos:

- Eumelanina. Es un pigmento de color negro o café, la cual se encuentra en diversos organismos, siendo el humano uno de ellos. Se encuentra distribuida en varios tejidos como retinas, cabello, hígado y sobre todo en la piel. Tiene como precursor la (L)-Tirosina o DOPA (3,4 dihidroxifilalanina) o fenilalanina. [11]
- Feomelanina. Se asocia principalmente con el color amarillo y rojo, y al igual que la eumelanina tiene como precursor la fenilalanina o tirosina. Se encuentra en mayor proporción en personas que presentan colores de pelo rojizo. [12]
- Pimelanina. Al igual que la eumelanina, esta es de un color negro o café, que de igual manera tiene como precursor a la tirosina, con características hidrofílicas. Se ha encontrado en hongos como un polímero del ácido homogentísico. [12]
- Alomelanina. Este grupo es el más heterogéneo de melaninas, que de igual manera presentan un color negro o café. Se diferencia de las anteriores debido a que en su composición química no contienen nitrógeno ni azufre. [13]

2.2.1.1. Melanogénesis.

Para que pueda llevarse a cabo la melanogénesis, es necesaria su síntesis dentro del melanocito, al interior de los melanosomas (feomelanosomas si contiene feomelanina y eumelanosomas si contienen eumelanina) y a partir de la tirosina. Una sucesión de oxidaciones de tirosina catalizada por la tirosinasa conduce a la síntesis de DOPA (dihidroxifenilalanina) para producir, a continuación, un compuesto intermediario común: la dopaquinona. A partir de este punto, dos vías

distintas conducen a la formación de las eumelaninas y de las feomelaninas estructuralmente diferentes [14]. La Figura 2 muestra el proceso de síntesis de la melanina, en el cual se aprecia cómo a partir de la tirosina y una serie de oxidaciones, es posible obtener los diferentes tipos de melaninas existentes.

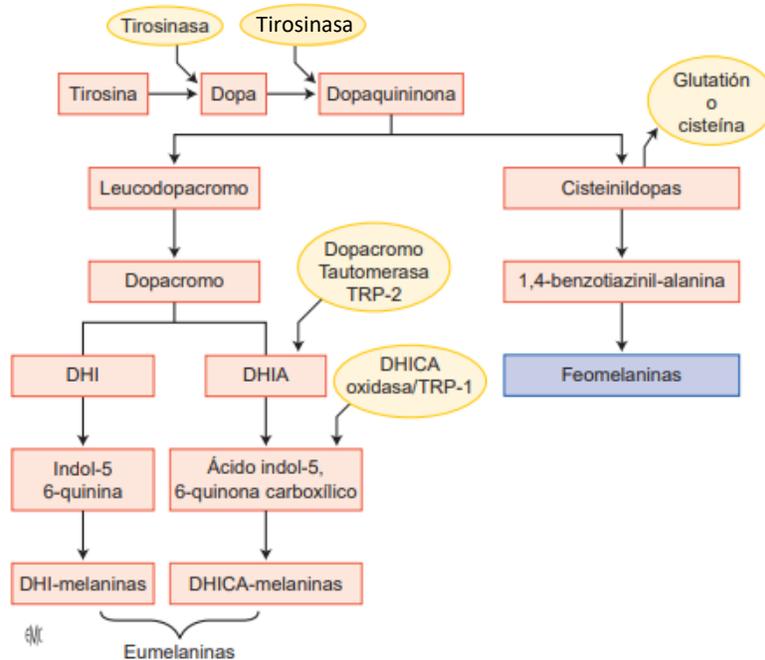


Figura 2. Vía de síntesis de la melanina. Dopa: dihidroxifenilalanina; DHI: 5,6-dihidroxiindol; DHICA: 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico; TRP: proteína relacionada con la tirosinasa. [Imagen tomada y adaptada de la referencia 15]

2.2.2 Funciones de la melanina

Las melaninas se encuentran en especies de los tres dominios de la vida: *Archaea*, *Bacteria* y *Eukarya*. Estos pigmentos tienen diversas funciones relacionadas con la supervivencia de muchas especies en su entorno natural [14] siendo que debido a su diversidad se le han atribuido distintas funciones como la protección contra agentes antioxidantes, protección contra el cambio osmótico, temperatura, y sobre todo la captación de radiación ultravioleta. [16] De hecho, la barrera melánica es el dispositivo más eficaz contra la radiación solar, en el que el espectro de luz ultravioleta es la zona que afecta la piel, la cual actúa absorbiendo radiación con longitudes de onda entre 350-1200 nm. [15].

En humanos, la exposición solar estimula su producción y ello se traduce en bronceado que se distinguen en dos tipos: uno inmediato y otro retardado, siendo el primero iniciado a los 30 minutos de la exposición e inducido por los rayos ultravioleta A de onda larga (UVA). Es bastante transitorio y se atenúa en pocas horas. Se produce por fotooxidación de la melanina ya formada y almacenada en los melanocitos, que es transferida a los queratinocitos. Su intensidad va a depender

por tanto de la melanina preexistente. El segundo de estos, el bronceado retardado, se inicia a los 2-3 días de la exposición y dura de días a semanas, y es consecuencia de un proceso de síntesis de nueva melanina. Los rayos ultravioleta B de onda corta (UVB) (Tabla 2) son la banda más efectiva para estimular este proceso de melanogénesis o nueva síntesis de melanina, aunque también puede conseguirse con exposiciones intensas, a dosis eritematógenas, de UVA (15-50 J/cm²). Este bronceado sí confiere protección frente a la quemadura solar, sin embargo no impide el cáncer cutáneo. [16]

Tabla 2. Tipos de radiación solar y su efecto sobre la piel [15]-[17]

TIPOS DE RAYOS	LONGITUD DE ONDA (nm)	EFFECTOS SOBRE LA PIEL
<i>IR</i>	800- 5000	Poca penetración, sensación de calor, promueve la secreción de ácido urocánico
<i>Visible</i>	400-800	Al igual que la IR tiene escaso poder de penetración sobre la piel.
<i>UVA</i>	320-380	Pigmentación inmediata (oxidación de las melaninas presentes en los melanocitos)
<i>UVB</i>	280-320	Pigmentación retardada (bronceado), eritema solar, engrosamiento del estrato córneo o hiperqueratosis
<i>UVC</i>	200-280	Retenidos por la capa de ozono atmosférico

La tabla 3 muestra los fototipos cutáneos y el efecto que produce la radiación sobre el tipo de piel dependiendo del contenido de melanina. Hay que tener en cuenta que una misma exposición solar sobre el órgano cutáneo no muestra los mismos cambios en todas las personas y encontramos una enorme variabilidad individual, sin embargo, para conocer nuestro fototipo de piel de manera rápida se puede conocer resolviendo dos cuestiones: la primera, sobre la intensidad del eritema a las 24 horas de una exposición al sol de mediodía de verano durante 45-60 minutos, y segunda, con la intensidad del bronceado tras dicha exposición después de una semana. [16] Estos métodos suelen ser incluso dolorosos de realizar, es por eso que existen métodos espectrométricos y cuestionarios específicos para conocer el fototipo cutáneo de cada individuo. [67]

Tabla 3. Fototipos cutáneos [16]		
Fototipo	Características principales del fototipo	Rasgos en la piel y cabello
Fototipo I	Siempre se quema y nunca se broncea	Cabello naranja, rojizo. Piel blanca. Usualmente presencia de pecas.
Fototipo II	Casi siempre se quema y a veces se broncea	Cabello rubio. Piel blanca. Sin presencia de pecas.
Fototipo III	A veces se quema y generalmente se broncea	Cabello castaño claro. Piel morena clara.
Fototipo IV	Raro que se queme y siempre se broncea	Cabello castaño oscuro. Piel morena oscura.
Fototipo V	Razas pigmentadas	Cabello castaño oscuro o negro. Piel morena oscura.
Fototipo VI	Raza negra	Cabello negro. Piel morena oscura o negra.

2.3. Radiación solar.

2.3.1 Tipos de radiación solar que llegan a la Tierra

El sol es el cuerpo celeste que emite la luz que podemos ver durante el día y que permite tener diversos beneficios en el ser humano como la síntesis de vitamina D, sin embargo la exposición prolongada a ella puede conducir a problemas en la piel, ya que dicha luz puede llegar hasta la superficie terrestre un amplio espectro de radiaciones electromagnéticas que no es posible visualizar con el ojo humano [18].

2.3.2 Efecto de las radiaciones sobre la piel

El espectro de radiaciones electromagnéticas es tan amplio que se divide en distintas regiones dependiendo de la longitud de onda, siendo la mayor parte de éste la radiación infrarroja, con una longitud de onda entre los 800 y 5.000 nm, que cuenta con bajo poder energético y un escaso poder de penetración a través de la piel y que además los efectos de exposición se traducen en una sensación de calor que estimula la circulación sanguínea, interviene en los fenómenos de termorregulación y sudación, mediante la cual el organismo secreta el ácido urocánico que, a su vez, actúa como un protector natural contra la radiación solar. El espectro IR es el menos peligroso si se tiene en consideración los demás tipos

de radiación que emite la luz solar, que son los rayos UV, de los cuales hay tres tipos, los UVA, UVB y UVC (ver Tabla 4).

Cerca de un 5% de la radiación que llega a la Tierra corresponde a los rayos UVA, que se caracterizan por tener una gran capacidad para penetrar en el interior de las capas de la piel. De hecho, se calcula que aproximadamente el 39% de la radiación UVA alcanza la dermis, siendo responsable del bronceado. Por otro lado la radiación UVB tiene menor capacidad que la anterior para penetrar en la piel y constituye un 0.1% del total de radiación solar y es la responsable de la quemadura solar y produce la llamada pigmentación indirecta o retardada de la piel, que desencadena el cáncer de piel. Por último la radiación UVC, la más energética de las mencionadas hasta ahora y la más nociva para el ser humano. Esta radiación es absorbida por la capa de ozono, por lo que no alcanza la superficie terrestre, de la misma manera que otras radiaciones de longitudes de onda inferiores a 280 nm, que tampoco llegan a nuestro planeta y que serían incompatibles con la vida humana. [18]

La problemática aquí presente se deriva en que la capa de ozono, a medida que pasan los años, ha ido disminuyendo debido a la contaminación del medio ambiente. Evidencia de esto, figura cuando en 1985 se descubrió que tenía un agujero muy grande en el Polo sur, y que para el año 2018 el tamaño de este alcanzó los 23 millones de km² según explica la Administración Nacional de la Aeronáutica y del Espacio de Estados Unidos (NASA) [19,20]. Dicho caso se ve reflejado en el índice UV solar mundial (IUV), siendo este una medida de la intensidad de la radiación UV solar en la superficie terrestre expresado como un valor superior a cero, y que en cuanto a más alto, mayor es la probabilidad de lesiones cutáneas y oculares, categorizándose de acuerdo con el Sistema de protección solar recomendado descrito en la tabla 4. [21]

Tabla 4. Sistema de protección solar recomendado dependiente del índice UV [21]

ÍNDICE UV	TIPO DE PROTECCIÓN	RECOMENDACIONES
1	No necesita protección	Puede mantenerse en el exterior sin riesgo
2		
3	Necesita protección	Mantenerse a la sombra durante las horas centrales del día. Usar ropa adecuada, crema de protección y sombrero.
4		
5		
6		
7		
8	Necesita protección extra	Evite salir durante las horas centrales del día. Buscar la sombra. Imprescindible usar ropa adecuada, crema de protección y sombrero.
9		
10		
11+		

Este índice UV solar mundial puede ser consultado en diversas páginas de internet tal como en la página de la Secretaría de Medio Ambiente para el caso de México (Disponible en la dirección de internet de dicha Secretaría en <http://www.aire.cdmx.gob.mx/default.php?opc=%27YqBinml=%27>), ya que varía dependiendo la hora del día y la región, o bien, mediante cálculos matemáticos.

Es por lo anterior que la Organización Mundial de la Salud incluya dentro de sus recomendaciones el uso de una protección extra como la que ofrecen los protectores solares o micas, en sus diferentes presentaciones, para disminuir la incidencia de enfermedades y afecciones en la piel [21].

2.3.3. Tratamientos para el daño por radiación solar

La radiación solar puede causar diversos problemas asociados con la piel, entre los cuales los más comunes se encuentran en la Tabla 5 mostrando sus características, síntomas y tratamiento para cada una de las afecciones. Para su diagnóstico en la mayoría de los casos el médico puede confirmar que tiene la piel dañada por el sol realizando una inspección en el área afectada. A menudo, se realiza una biopsia para descartar cáncer de piel en un parche de queratosis actínica.

El enrojecimiento de las quemaduras solares desaparecerá en unos pocos días, siempre que no vuelva a exponer su piel lesionada al sol sin usar un bloqueador solar o protector solar. Algunos daños causados por el sol son permanentes, aunque los medicamentos recetados, los remedios de venta libre y los tratamientos de rejuvenecimiento de la piel pueden mejorar la apariencia de la piel. [22]

Tabla 5. Afecciones en la piel y su tratamiento [22]

AFECCIÓN	DESCRIPCIÓN	SÍNTOMAS	TRATAMIENTO
Piel seca	La piel expuesta al sol pierde humedad y aceites esenciales, lo que la hace parecer seca, escamosa y arrugada prematuramente,	La piel parece seca, escamosa y un poco más arrugada que la piel de otras partes del cuerpo que no han estado expuestas al sol. Suele causar picazón.	Uso de humectante que contenga: glicerina, urea, ácido piroglutámico, sorbitol, ácido láctico y/o sales de lactato.
			Evitar el uso de ácidos en cualquier piel quemada por el sol. Evitar los baños calientes.

	incluso en personas más jóvenes.		Lavarse solo con agua tibia o fría, usando un jabón sin perfume que tenga un alto contenido de aceite o glicerina.
Quemadura de sol	La quemadura de sol es el nombre común de la lesión cutánea que aparece inmediatamente después de que la piel se expone a la radiación ultravioleta. Las quemaduras solares leves solo provocan un enrojecimiento doloroso de la piel, pero los casos más graves pueden producir pequeñas protuberancias llenas de líquido (vesículas) o ampollas más grandes.	Las quemaduras de sol leves causan dolor y enrojecimiento en la piel expuesta al sol. En la mayoría de los casos, existen claros límites donde la piel ha sido protegida del sol por prendas de ropa. Los casos más graves de quemaduras solares producen ampollas dolorosas, a veces acompañadas de náuseas y mareos.	Aplicar compresas con un paño húmedo frío o rociar el área con agua fría.
			El médico puede recetarle medicamentos antiinflamatorios si tiene quemaduras solares extensas con dolor y ampollas intensas.
Queratosis actínica	Es una pequeña protuberancia que se siente como papel de lija o una mancha pequeña y escamosa de piel dañada por el sol que tiene un tinte rosado, rojo, amarillo o marrón. A	Aparece como una pequeña protuberancia que se siente como papel de lija o una mancha persistente de piel escamosa (descamada) que puede tener una superficie irregular o incluso	Depende de muchos factores, incluido el número, el tamaño y la ubicación de sus queratosis actínicas. Las opciones incluyen: Fluorouracilo tópico: medicamento contra el cáncer, 5-fluorouracilo (5-FU) se aplica directamente sobre la piel para eliminar la queratosis actínica.

<p>diferencia de las marcas de bronceado o las quemaduras solares, una queratosis actínica no suele desaparecer a menos que un médico la congele, la trate químicamente o la extraiga. Se desarrolla en áreas de la piel que han sufrido una exposición repetida o prolongada a la luz ultravioleta del sol y es una señal de advertencia de un mayor riesgo de cáncer de piel. Cerca del 10% al 15% de las queratosis actínicas eventualmente se convierten en cánceres de células escamosas de la piel.</p>	<p>afilada y que tiene un tinte rosado, amarillo, rojo o pardusco. Al principio, una queratosis actínica puede tener el tamaño de un grano. En raras ocasiones, una queratosis actínica puede picar o ser levemente sensible.</p>	<p>Imiquimod tópico: regula los mecanismos de defensa del cuerpo para reaccionar contra la queratosis actínica.</p>
		<p>Gel tópico de diclofenaco sódico: se aplica dos veces al día durante tres meses para tratar la queratosis actínica.</p>
		<p>Crioterapia: la queratosis actínica se congela con nitrógeno líquido.</p>
		<p>Exfoliaciones químicas: se usa una solución química para eliminar la capa superior de la piel, con la anticipación de que la piel normal volverá a crecer más tarde.</p>
		<p>Rejuvenecimiento con láser: funciona de la misma manera que una exfoliación química para eliminar la capa superior de la piel, pero utiliza un rayo láser en lugar de una solución química.</p>
		<p>Escisión por afeitado: el médico rasura cuidadosamente el área de piel anormal. Las virutas de piel también se pueden utilizar como muestra de biopsia para detectar cáncer.</p>
		<p>Tratamiento fotodinámico (TFD): la queratosis actínica absorbe una solución sensibilizante a la luz y luego "activa" la luz, destruyendo la queratosis actínica.</p>

			Debido a que es una señal de que usted tiene un mayor riesgo de cáncer de piel, el médico programará exámenes cutáneos de seguimiento regulares para verificar periódicamente si hay nuevas áreas de piel anormal.
Fotoenvejecimiento y otros cambios en el colágeno	La piel desarrolla arrugas y líneas finas debido a cambios en el colágeno de la dermis. En la púrpura actínica, la radiación ultravioleta daña el colágeno estructural que sostiene las paredes de los diminutos vasos sanguíneos de la piel. En las personas mayores, este daño del colágeno hace que los vasos sanguíneos sean más frágiles y es más probable que se rompan después de un impacto leve.	Líneas finas, arrugas más profundas, una textura de piel más gruesa y fácil formación de moretones en las áreas expuestas al sol, especialmente el dorso de las manos y los antebrazos.	No es posible revertir todos los efectos del daño solar a largo plazo, pero puede mejorar la apariencia de la piel con tretinoína. Otras opciones incluyen peelings químicos; criocirugía; rejuvenecimiento con láser; o dermoabrasión, en la que la capa exterior de la piel se frota con un cepillo giratorio especial o una rueda, permitiendo que crezca piel nueva en lugar de la piel dañada por el sol.

Para prevenir las afecciones en la piel anteriormente mencionadas causadas por la radiación solar, existen distintos pasos que pueden seguirse:

- Aplicar protector solar antes de salir al aire libre. Elegir un protector solar resistente al agua que tenga un SPF de 30 o más, con un amplio espectro de protección contra los rayos UVA y UVB. Aplicar con frecuencia para evitar sudar o lavar el protector solar.

- Usar bloqueador solar en los labios. Elegir un producto que haya sido especialmente formulado para los labios, con un factor de protección solar de 20 o más.
- Limite su tiempo al aire libre cuando el sol está en su apogeo (aproximadamente de 10 a.m. a 3 p.m.).
- Usar lentes de sol con protección contra la luz ultravioleta.
- Usar pantalones largos, camisa de manga larga y sombrero.
- Para ayudar a detectar queratosis actínicas y otras anomalías de la piel en sus primeras etapas, examinar toda la superficie de la piel a fondo cada uno o dos meses. Buscar manchas en la piel descolorida o escamosa, lunares, pequeños nódulos nacarados, llagas y otras anomalías de la piel en todas las partes del cuerpo, incluidos el cuero cabelludo y los genitales. Usar un espejo para inspeccionar las áreas más difíciles de ver de su espalda, hombros, brazos, glúteos y plantas de sus pies. Las personas que tienen numerosas queratosis actínicas deben someterse a un examen de la piel por parte de un médico al menos dos veces al año. [22]

2.4. Protectores solares.

Los protectores o filtros solares son formulaciones que se aplican sobre la piel con el fin de reducir los efectos de la radiación solar sobre la misma. Existen diferentes tipos que se clasifican según su mecanismo de acción, función o forma cosmética.

[2.4.1 Clasificación de protectores solares.](#)

[2.4.1.1. Clasificación según su mecanismo de acción.](#)

Los protectores solares actúan de dos formas, desviando o reflejando la radiación, o absorbiéndola; y atendiendo a su composición se les clasifica en tres grupos:

Los filtros físicos, que son sustancias de origen mineral como el dióxido de titanio, óxido de zinc, carbonato de calcio, carbonato de magnesio, óxido de magnesio, cloruro de hierro. Estos actúan reflejando o desviando la radiación solar formando una barrera opaca que actúa a modo de pequeños espejos. Su espectro de actuación es más amplio, de manera que proporcionan protección frente a los UVA, UVB, luz visible e infrarrojos. Son partículas minerales que necesitan una capa de aplicación gruesa, pueden manchar la ropa, aunque cada día se elaboran nuevas partículas microscópicas cosméticamente más aceptables. Es más raro que originen reacciones de tipo alérgico o irritativo. Están menos difundidos en el mercado.

Los filtros químicos, o también denominados orgánicos por su estructura química son moléculas que absorben los fotones de la radiación solar alterando su estructura molecular. Cada molécula presenta un espectro de absorción óptimo que permite clasificarla en filtro UVA o filtro UVB. Los cambios en su estructura molecular

pueden traducirse en cambios en su estructura química, de modo que a veces producen dermatitis de contacto. Son los más difundidos en el mercado porque son transparentes, no manchan la ropa y necesitan una capa de aplicación de menor grosor. Cosméticamente son más aceptables. Las sustancias más habitualmente empleadas son: PABA, salicilatos, ácido cinámico, alcanfor, y bencimidazoles como filtros UVB; benzofenonas, antranilatos y dibenzoilmetanos como filtros UVA. [16]

Los filtros biológicos, que son sustancias antioxidantes que se encuentran en sistemas biológicos de manera natural en plantas, semillas y frutas, entre otros, que evitan la formación de radicales libres, como las vitaminas A (betacarotenos), C y E (en forma de acetato o palmitato). [23]

2.4.1.2. Clasificación según su función.

En cuanto a su función, existen tres tipos de productos que funcionan para las diferentes etapas en las que se está expuesto al sol, siendo antes, durante y después de la exposición, siendo los agentes preventivos, los agentes bronceadores y los agentes para después de la exposición al sol:

- **Los agentes preventivos de quemadura solar.** Se definen como filtros solares que absorben el 95% o más de la radiación ultravioleta dentro de longitudes de onda 390- 320 μm . Los agentes bloqueantes solares opacos, cuyo fin es suministrar la máxima protección en forma de barrera física. Con más frecuencia se utilizan en este grupo son dióxido de titanio y óxido de zinc. El dióxido de titanio refleja y dispersa prácticamente toda radiación en las zonas ultravioleta y visible (290-777 μm), de modo que evita o minimiza tanto la quemadura solar como el bronceado. [1]
- **Los agentes bronceadores al sol.** Se definen como filtros solares que absorben al menos el 85% de la radiación ultravioleta dentro del intervalo de longitudes de onda 290 a 320 μm y producen un ligero bronceado transitorio. Estos agentes producirán cierto eritema, pero no dolor. Son filtros solares químicos que absorben una zona específica de radiación ultravioleta. En alguna circunstancia los mismos filtros solares se pueden emplear en ambos tipos de productos pero a concentraciones diferentes (menores en un producto bronceador solar). [1]
- Los agentes para después de la exposición cumplen con la función de aliviar la piel de los efectos de estar bajo los rayos del sol después de un cierto tiempo calmando la sensación de irritación en la piel, actuando para recuperar el manto hidrolipídico produciendo hidratación y emoliencia. [1]

2.4.1.3. Clasificación según su forma cosmética.

La clasificación por su forma cosmética depende de la formulación con la que el producto esté hecho, dándole las características físicas que se requieren para cumplir su función sobre la piel. Específicamente para los protectores solares, existen por lo menos cuatro tipos de formulaciones base, que son las emulsiones, los aceites, los geles y las espumas.

- Las emulsiones son mezclas de agua con componentes grasos, estabilizadas por medio de unos compuestos químicos denominados tensoactivos, siendo las más habituales las que presentan la forma cosmética de crema. Al llevar a la vez agua y grasas permite la incorporación de principios activos tanto grasos como acuosos, además, no son demasiado desengrasantes para la piel, suelen ser bien toleradas, sobre todo por pieles secas. Principalmente son las cremas y las lociones, y se diferencian en que la crema (Figura 3.a) es más espesa, viscosa y con mayor contenido en grasas, lo que las hace menos adecuadas para pieles con exceso de secreción sebácea. Por su parte, las lociones (Figura 3.b) son más líquidas y con mayor contenido en agua, con tacto acuoso, y menos grasas por lo que son mejor toleradas por pieles grasas [24].

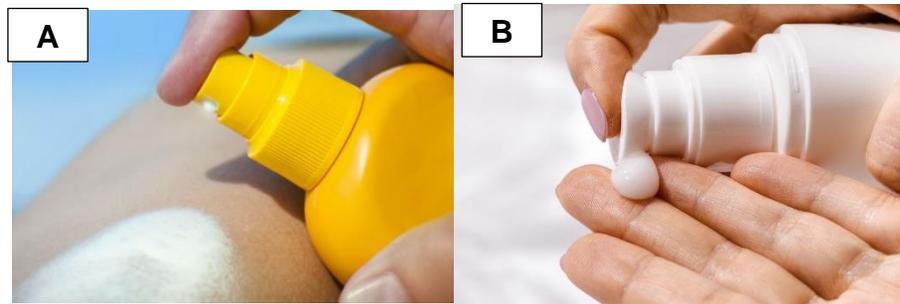


Figura 3. (a) Emulsión cosmética tipo crema; (b) Emulsión cosmética tipo loción [Imagen tomada y adaptada de la referencia 23]

- Los geles (Figura 4) son una forma farmacéutica y cosmética donde el uso de un polímero se encarga de aumentar la viscosidad hasta transformarlo en un líquido denso, un semisólido o incluso un sólido. Los sólidos suelen formarse a partir de disoluciones, es decir, a una mezcla de sustancias le añado el agente gelificante, que aumentará su viscosidad hasta transformarla en un gel. [24]



Figura 4. Forma cosmética en gel [Imagen tomada y adaptada de la referencia 23]

- Los aceites (Figura 5) son una mezcla de ácidos grasos o grasas de baja densidad. Es el caso, por ejemplo, de las brillantinas, compuestas por una mezcla de sustancias aceitosas encargadas de engrasar y fijar el cabello. Para los protectores solares, esta mezcla de aceites tiene los filtros necesarios para ofrecer una protección frente a la radiación solar, además, está comprobado que los aceites son capaces de presentar un Factor de Protección Solar por sí solos. [25] La desventaja de esta forma cosmética es que a altas temperaturas en presencia de aire se producen reacciones de peroxidación lipídica con formación de hidroperóxidos, cuya descomposición generan productos de oxidación secundarios que incluyen compuestos volátiles como aldehídos, cetonas, hidrocarburos, ácidos, ésteres, alcoholes y compuestos aromáticos. [26] Generalmente vienen en una presentación con *spray* para su mejor aplicación y son especialmente utilizados para situaciones que involucren el contacto con el agua por su naturaleza hidrofóbica.



Figura 5. Forma cosmética de protector solar en forma de aceite corporal [Imagen tomada y adaptada de la referencia 23]

Las espumas (Figura 6) son formas cosméticas en las que se incorporará, dentro del excipiente, cierta cantidad de gas en forma de burbujas, para lo cual existen diversas opciones de proceso. Un tipo habitual de espumas es la que vienen envasadas a presión; el gas que viene envasado con el resto del cosmético sale a presión y se forma las burbujas que le dan la típica morfología a la espuma. [24]



Figura 6. Forma cosmética de protector solar en forma de espuma.

2.4.2. Normatividad nacional e internacional

En México, la producción de protectores solares y otros cosméticos está dada por referentes como la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2015, Buenas prácticas de fabricación de medicamentos, para su producción y pruebas de estabilidad. [27] Sin embargo estos productos no se encuentran contemplados en tal normativa. Dentro de la Ley General de Salud en el Capítulo XI se realizó el Decreto por el que se reforman y adicionan diversos artículos de la Ley General de Salud, en materia de cosméticos donde se define a los productos cosméticos como “las sustancias o formulaciones destinadas a ser puestas en contacto con las partes superficiales del cuerpo humano [...] con el fin exclusivo o principal de limpiarlo, perfumarlo, ayudar a modificar su aspecto, protegerlo, mantenerlo en buen estado o corregir los olores corporales o atenuar o prevenir deficiencias o alteraciones en el funcionamiento de la piel sana” [28], entrando los protectores solares dentro de esta definición. Para efectos de este decreto, se creó el “Acuerdo por el que se determinan las sustancias prohibidas y restringidas en la elaboración de productos de perfumería y belleza” con el objetivo de restringir las sustancias de las cuales existen indicios de que su uso represente un riesgo para la salud, y distinguirlas de aquellas que por sus cualidades sí constituyen un peligro para la salud, ofreciendo una lista completa de dichas sustancias, su nombre común, sinónimos, concentraciones máximas de uso y sus condiciones de uso de cada sustancia. [29]

Por otro lado, en el caso del etiquetado de cosméticos, la Norma Oficial Mexicana NOM-141-SSA1/SCFI-2012, Etiquetado para productos cosméticos preenvasados. Etiquetado sanitario y comercial [30] es la única relevante y específica para los protectores solares, dado que, dentro de esta norma, el contenido está principalmente dirigido a estos productos, ya que gran parte de ella habla sobre

especificaciones de su contenido y etiquetado. Dentro de esta Norma Oficial, los puntos más relevantes para los protectores solares son:

- Factor de protección solar, es el cociente entre la dosis eritematológica mínima en una piel protegida por un producto de protección solar y la dosis eritematológica mínima en la misma piel sin proteger.
- Un producto de protección solar o protector solar es cualquier preparado como crema, aceite, gel o aerosol entre otros, de aplicación sobre la piel humana con la finalidad exclusiva o principal de protegerla de la radiación UV absorbiéndola, dispersándola o reflejándola.
- Deben figurar las instrucciones de uso u otros análogos en la superficie de información del envase primario o secundario o instructivo anexo en productos para la piel cuya función primaria sea la protección solar.
- En productos para la piel cuya función primaria sea la protección solar, indicar mediante las frases siguientes o equivalentes:
 - Que se aplique antes de la exposición al sol.
 - Que para mantener la protección, se repita con frecuencia la aplicación del producto, especialmente después de transpirar, bañarse o secarse.
 - Que se aplique a la piel la cantidad suficiente.
- Que se indique el valor del Factor de Protección Solar (FPS), en caso de que se utilicen las siglas FPS o SPF, señalar su significado
 - Que protege contra UVB y UVA.
 - Que no permanezca mucho tiempo expuesto al sol, aunque emplee un producto de protección solar.
 - Que se mantenga a los bebés y niños pequeños fuera de la luz solar directa.
 - Que la exposición excesiva al sol es un riesgo importante para la salud.
 - Que suspenda su empleo si se presentan signos de irritación o salpullido.
 - Evite el contacto con los ojos, puede causar irritación
 - Se podrá incluir el logotipo del Factor UVA (Figura 7), el cual deberá indicarse mediante las siglas "UVA" impresas dentro de un círculo simple y cuyo diámetro no deberá exceder la altura con que se indique el número FPS.



Figura 7. Logotipo del Factor UVA.

- Los productos que ofrezcan protección solar como función secundaria, no se consideran protectores solares por lo que no les aplican estas leyendas.
 - En productos cuya función primaria sea la de broncear estos deben tener un FPS de 2 a 4 (valor medido 2 a 5.9) y declararlo:
 - Que se indique el valor del Factor de Protección Solar (FPS), en caso de que se utilicen las siglas FPS o SPF, señalar su significado.
 - Que suspenda su empleo si se presentan signos de irritación
 - Que no permanezca mucho tiempo expuesto al sol.
 - Que se mantenga a los bebés y niños pequeños fuera de la luz solar directa.
 - Que la exposición excesiva al sol es un riesgo importante para la salud.
 - Que no se recomienda para niños y personas con piel sensible al sol.
- Se establece un plazo de dieciocho meses para ajustar el etiquetado de los protectores solares, considerando:
 - Deben proteger contra ambas radiaciones, UVB y UVA.
 - No deben hacerse declaraciones que conlleven las siguientes características:
 - Protección al 100% frente a la radiación UV (como «bloqueador o bloqueante solar» o «protección total»).
 - No es necesario repetir la aplicación del producto en ningún caso (como «prevención durante todo el día»).
 - Deben llevar advertencias en las que se indique que no constituyen una protección al 100%, y consejos sobre las precauciones que conviene tomar, además de su uso.
 - Deben ofrecer un grado mínimo de protección frente a ambas radiaciones, UVB y UVA.
 - El grado mínimo de protección de los productos de protección solar debe ser el siguiente:
 - Un factor 6 de protección solar frente a la radiación UVB.
 - Un factor de protección frente a la radiación UVA de al menos 1/3 del factor de protección solar UVB.
 - Sólo deben hacerse declaraciones de protección frente a la radiación UVB y UVA cuando la protección sea igual o superior a los niveles establecidos en la Tabla 7.
 - El nivel de protección del producto debe figurar mediante la clasificación como «baja», «media», «alta» y «muy alta». Cada clasificación debe equivaler a un grado de protección frente a ambas radiaciones, UVB y UVA de acuerdo con lo que establece la tabla 6.

Tabla 6. Factores de protección solar ajustados según la NOM-141-SSA1/SCFI-2012 [30]				
Clasificación	FPS que se indica en la etiqueta	FPS medido	Factor mínimo de protección UVA recomendado	Longitud de onda crítica mínima recomendada
Protección baja	6	6 – 9.9	1/3 del factor de protección solar que indica en la etiqueta	370 nm
	10	10 – 14.9		
Protección media	15	15 – 19.9		
	20	20 – 24.9		
	25	25 – 29.9		
Protección alta	30	30 – 49.9		
	50	50 – 59.9		
Protección muy alta	50+	Igual o mayor a 60		

- Para la determinación de la eficacia del factor de protección solar deben utilizar como referencia los siguientes métodos de prueba:
 - ISO24442:2011 *In vivo determination of sunscreen UVA protection.*
 - ISO24443:2012 *Determination of sunscreen UVA photoprotection in vitro.*
 - Colipa 2011 *Method for in vitro determination of UVA protection.*
 - FDA 2011 *SPF test methods and for the UVA protection.* [30]

Para otros países, la regulación es equivalente a la propuesta en México, estando siempre apegada a lo que dicta la *Food & Drugs Administration* de los Estados Unidos de América, el cual lanzó una guía de cumplimiento llamada *Labeling and Effectiveness Testing: Sunscreen Drug Products for Over-The-Counter Human Use—Small Entity Compliance Guide* (Pruebas de etiquetado y eficacia: productos farmacológicos de protección solar para uso humano de venta libre –Guía de cumplimiento para pequeñas entidades) [31], en la cual se hace referencia a los requisitos de etiquetado y prueba para la protección contra la radiación ultravioleta A (UVA) y la radiación ultravioleta B (UVB) y la cual tiene algunas diferencias respecto a la normativa mexicana. Esta guía está altamente relacionada con La Ley Federal de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos en la que se pretende eliminar la adulteración, etiquetado incorrecto alteración, mutilación, destrucción, borrado o eliminación de la totalidad o parte del etiquetado, o la realización de cualquier otro acto con respecto a un alimento, medicamento, dispositivo o cosmético. [32] En concreto, esta ley no contiene especificaciones directas respecto a productos relacionados con la protección de los rayos solares.

2.4.3. Factor de protección solar (FPS)

El sistema de factor de protección solar (SPF) (*SPF, sun protection factor*) ha sido desarrollado por *Plough Corporation* para definir la eficacia relativa de agentes filtros solares para proteger la piel, definiéndolo como la relación entre la exposición a rayos ultravioleta requerida para producir un eritema mínimamente perceptible sobre la piel protegida y la exposición que produciría el mismo eritema sobre la piel no protegida, definido por la Ecuación 1:

$$\text{Valor de FPS} = \frac{MED(PS)}{MED(US)} \quad \text{Ec. 1}$$

Donde:

(PS): Piel protegida (*protected skin*)

(US): Piel desprotegida (*unprotected skin*)

Siendo MED (PS) la dosis de eritema mínimo para la piel protegida después de la aplicación de 2 mg cm⁻² de la formulación final del producto de filtro solar, y MED (US) la dosis de eritema mínima para la piel no protegida, esto es, la piel a la cual no se le ha aplicado ningún filtro solar. [1] Según la FDA para la prueba de FPS se requiere la aplicación de 2 mg/cm² de protector solar en la piel, pero el espesor de aplicación real se estima se encuentra entre 0,5 a 1,0 mg/cm², disminuyendo la efectividad del FPS. [33]

2.4.3.1. Métodos de determinación

La determinación del FPS puede desarrollarse por diferentes metodologías:

- ISO24442:2011 *In vivo determination of sunscreen UVA protection*. [34]
 - Esta norma internacional especifica el procedimiento para determinar el factor de protección ultravioleta A (FPUVA) de los productos de protección solar utilizando el método de oscurecimiento de pigmentos persistentes de acuerdo con los principios recomendados por la Asociación de la Industria Cosmética de Japón (JCIA) en 1995 [35], y está restringida al área de la espalda de sujetos humanos seleccionados.
 - Un área de la piel de cada sujeto se expone a la luz UVA sin ninguna protección y otra área (diferente) se expone después de la aplicación del producto de protección solar bajo prueba. Una zona más queda expuesta después de la aplicación de una formulación de protector solar UVA de referencia, que se utiliza para validar el procedimiento.
 - Para determinar el UVAPF, se administran series incrementales de exposiciones a UVA a cinco o seis pequeños subsitios de la piel para

inducir respuestas de oscurecimiento. Estas respuestas se evalúan visualmente para determinar la oscuridad del pigmento de 2 a 24 h después de la exposición a los rayos UVA, según el criterio de un evaluador capacitado. La dosis mínima de oscurecimiento del pigmento persistente (MPPDD) para piel desprotegida (MPPDDu) y la MPPDD obtenida después de la aplicación de un producto de protección solar (es decir, MPPDD para piel protegida con producto, MPPDDp) se determinan en el mismo sujeto el mismo día. Un factor de protección solar individual (UVAPFi) para cada sujeto evaluado se calcula como la relación de MPPDDp / MPPDDu. [34]

- ISO24443:2012 *Determination of sunscreen UVA photoprotection in vitro*. [36]
 - La prueba se basa en la evaluación de la transmitancia UV a través de una película delgada de muestra de protector solar esparcida sobre un sustrato rugoso, antes y después de la exposición a una dosis controlada de radiación de una fuente de exposición UV definida. Debido a las diversas variables que no se pueden controlar con las técnicas espectroscópicas de película delgada típicas, cada conjunto de datos de transmisión de protector solar se ajusta matemáticamente de modo que los datos de SPF *in vitro* produzcan el mismo valor de SPF medido *in vivo* que se determinó mediante pruebas *in vivo*. A continuación, las muestras se exponen a una dosis específica medida de radiación UV para tener en cuenta las características de fotoestabilidad del producto de prueba. El procedimiento de modelado matemático se ha derivado empíricamente para correlacionarlo con los resultados de la prueba humana *in vivo* (oscurecimiento persistente del pigmento). [36]
- Colipa 2011 *Method for in vitro determination of UVA protection*. [37]
 - La metodología COLIPA utiliza al menos diez y no más de veinte voluntarios, dependiendo de la significancia estadística deseada.
 - Sin embargo, para Pissavini, los valores altos de SPF son más difíciles de medir. Un SPF alto normalmente conduce a una mayor incertidumbre también en el resultado final *in vivo*, debido a las variaciones biológicas de los voluntarios. [37]
 - El método *in vivo* para medir la eficacia del protector solar tiene sus defectos. Principalmente, el SPF mide la capacidad de bloquear la respuesta de la piel a la radiación UVB e ignora la radiación UVA y, a pesar del hecho de que el SPF no proporciona información sobre la capacidad de los protectores solares para resistir condiciones acuosas, como sudoración y natación, es una nueva legislación desde

2012 que requiere la determinación de la resistencia al agua de los filtros solares. [37]

- FDA 2011 *SPF test methods and for the UVA protection*. [38]
 - Para el procedimiento de prueba SPF, es necesario el uso de una Fuente UV, siendo este un simulador solar, y un espectro de emisión, ya que es un método *in vitro*.
 - El espectro de emisión debe determinarse utilizando un radiómetro de mano con una respuesta ponderada. La salida del simulador solar debe medirse antes y después de cada fotoprueba o, como mínimo, al principio y al final de cada día de prueba. Este radiómetro debe ser calibrado usando una comparación lado a lado con el espectrorradiómetro. [38]
- Determinación del factor de protección solar mediante espectrofotometría según Mansur. [39]
 - Los métodos *in vitro* son en general de dos tipos: métodos que involucran la medición de la absorción o la transmisión de radiación UV a través de películas de productos de protección solar en placas de cuarzo o biomembranas, y métodos en los que las características de absorción de los agentes de protección solar se determinan con base en el análisis espectrofotométrico de soluciones diluidas, siendo de estos últimos el método propuesto por Mansur y colaboradores, quienes desarrollaron una ecuación matemática muy simple, utilizando espectrofotometría UV y la siguiente ecuación:

$$FPS = FC \times \sum_{290}^{320} \times EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda) \quad \text{Ec. 2}$$

Donde:

FPS: Factor de protección solar

FC: 10 (factor de corrección)

EE (λ): Efecto eritemogénico de radiación de longitud de onda λ^*

I (λ): Intensidad del sol en la longitud de onda λ^*

Abs (λ): Absorbancia de la solución en la longitud de onda λ

En donde el efecto eritemogénico de radiación de longitud de onda λ^ (EE (λ)) y la intensidad del sol en la longitud de onda λ^* (I (λ)) es una constante determinada por Sayre y Colaboradores, y se desglosa en la Tabla 7.

Tabla 7. Relación entre el efecto eritemogénico y la intensidad de la radiación de cada longitud de onda. [39]

λ (nm)	320	315	310	305	300	295	290
$EE(\lambda) \times I$	0.018	0.1	0.1869	0.3278	0.2874	0.0817	0.015

Para este método, es necesario pesar 1 g de la formulación del protector solar problema, diluirlo en etanol hasta alcanzar una concentración de 0.2 mg/ml y realizar una filtración con un tamaño de poro de entre 5-11 μm . El filtrado debe ser leído en un espectrofotómetro de 320 a 290 nm en intervalos de 5 nm, para después aplicar la fórmula propuesta anteriormente, dando como resultado el valor de FPS del producto.

Se debe dar preferencia a los métodos de prueba *in vitro* en relación con el método de prueba SPF COLIPA *in vivo* como una forma de ratificar la preocupación ética y con fines de detección, como una forma de minimizar los riesgos relacionados con la exposición a los rayos UV de sujetos humanos durante el desarrollo de un producto de protección solar, además, los métodos *in vitro* están atrayendo cada vez más atención porque son más rápidos, menos costosos y evitan la participación de voluntarios humanos en los problemas éticos relacionados. [37]

2.4. Nanotecnología

2.4.1. Nanotecnología aplicada a protección solar

A lo largo de la historia de los productos de protección solar, la industria cosmética se ha enfocado en la mejora continua de éstos con el fin de ofrecer al mercado nuevas alternativas que mejoren dichos artículos, ya sea, por ejemplo, en la parte estética como en la disminución de la tonalidad que dejan como residuo la característica capa de color blanco de los bloqueadores solares convencionales, o en la parte tecnológica, en la cual se pretende disminuir el tamaño de partícula de los activos cosméticos con el fin de aumentar la capacidad de protección que pueden ofrecer dichos productos, mejorando así el proceso de manufactura e incluso disminuyendo costos en la producción de los mismos, beneficiando de esta manera directamente al productor. [1] Estas mejoras son dadas gracias a técnicas basadas en la nanotecnología, ya que nos permite cambiar el tamaño de las partículas utilizadas como activo cosmético utilizado en productos de protección solar con el fin de aprovechar las características que se obtienen a partir de dichos procesos para incrementar su eficacia y eficiencia al momento de su uso. [40]

2.4.2. Conceptos

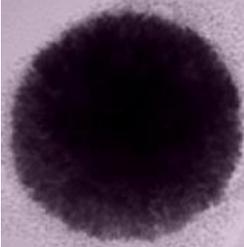
La nanotecnología es la ingeniería de los sistemas funcionales a escala molecular, un área de la ciencia moderna que permite controlar y manipular la materia a una escala que va desde menos de un nanómetro hasta los 1000 nm. [40].

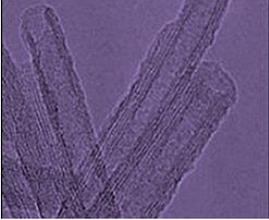
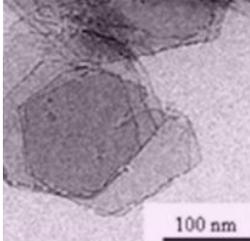
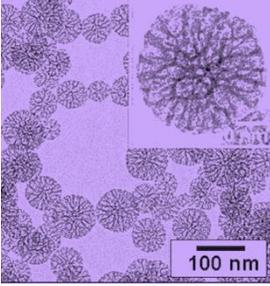
El campo de la nanotecnología implica la creación y utilización de sistemas químicos, físicos y biológicos con características estructurales entre átomos o moléculas individuales a dimensiones submicrónicas, y también la asimilación de nanoestructuras resultantes en sistemas más grandes. Está relacionada con sistemas y materiales, cuyos componentes y estructuras representan propiedades, procesos y fenómenos químicos, físicos y biológicos nuevos y significativamente mejorados debido a su tamaño a nanoescala. Cuando las dimensiones de un material se reducen por debajo de 100 nm, pueden producirse alteraciones drásticas en sus propiedades, por lo que pueden reducirse para proporcionar un rendimiento específico o para proporcionar nuevas propiedades a un material, además de cambios relacionados específicamente con el tamaño y la estructura. [41] Partiendo de lo anterior, las nanopartículas (NPs), son una amplia clase de materiales que incluyen sustancias particuladas, resultan tener una difícil clasificación, a saber, de sus dimensiones, su origen y su composición química, cada una de estas descrita a continuación. [42]

2.4.3. Clasificación de las nanopartículas

2.4.3.1. Clasificación de las nanopartículas según sus dimensiones

Esta clasificación se basa en las medidas que pueden tener las nanopartículas en sus diferentes dimensiones, dividiéndose principalmente en cuatro categorías, que son la de cero dimensiones (0D), unidimensional (1D), bidimensional (2D) y tridimensional (3D), descritas en la Tabla 8 [43]:

Tabla 8. Clasificación de las nanopartículas basada en sus dimensiones [43, 44].		
Clasificación	Características	Imagen representativa
0D	Nanomateriales que presentan en sus 3 dimensiones tamaños menores a 100 nm. Ejemplos: el fullereno, partículas coloidales, puntos cuánticos y nanopartículas de plata y oro.	 <p>Imagen típica de microscopio electrónico de transmisión (TEM) de nanoesferas.</p>

<p>1D</p>	<p>Nanomateriales que presentan en dos de sus dimensiones tamaños menores a 100 nm. Ejemplos: nanocables, nanotubos, nanofibras y nanovarillas.</p>	 <p>Imagen típica de TEM de nanovarillas</p>
<p>2D</p>	<p>Nanomateriales que presentan en una de sus dimensiones tamaños menores a 100 nm. Ejemplos: monocapas, nanorecubrimientos, películas poliméricas y películas multicapa.</p>	 <p>Imagen típica de SEM y TEM de nanohojas</p>
<p>3D</p>	<p>Nanomateriales que en ninguna de sus dimensiones presenta tamaños menores a 100 nm. Ejemplos: policristales, nanobolas, nanobobinas y nanoflores.</p>	 <p>Imagen típica de SEM y TEM de nanoflores.</p>

2.4.4. Enfoques de manufactura

Se han utilizado con éxito numerosos enfoques en nanotecnología para la obtención de nanomateriales. Generalmente, los enfoques empleados hasta ahora han sido dictados por la experiencia previa de los investigadores y la tecnología existente. La "reorganización de los átomos" para construir diferentes nanoestructuras y nanodispositivos, y la consideración del "comportamiento de los átomos a escala nanométrica" representan dos categorías nanotecnológicas, es decir, el enfoque de arriba hacia abajo (*top-down*) y la fabricación a escala atómica que representa el enfoque de abajo hacia arriba (*bottom-up*).

El enfoque "de arriba hacia abajo" se basa en el ensamblaje de estructuras mediante la manipulación de componentes de dispositivos mucho más grandes mediante el procesamiento monolítico, un enfoque que se logra más fácilmente con la tecnología actual. Por otro lado, el enfoque "de abajo hacia arriba", organiza átomos o moléculas en nanoestructuras, implica la fabricación de estructuras de dispositivos a través del autoensamblaje sistemático de moléculas, átomos u otras unidades básicas de materia. [41]

Se han desarrollado muchas técnicas para sintetizar y fabricar nanomateriales con tamaño, forma, dimensionalidad y estructura controlados. Los métodos físicos o químicos se utilizan generalmente para sintetizar y fabricar nanomateriales 0D, 1D, 2D y 3D, existiendo una gran variedad de métodos para la obtención de estas descritos a continuación [44] y como lo muestra la Figura 7, estos enfoques se dividen aún más en varias subclases basadas sobre el funcionamiento, condiciones de reacción y protocolos adoptados. [42]

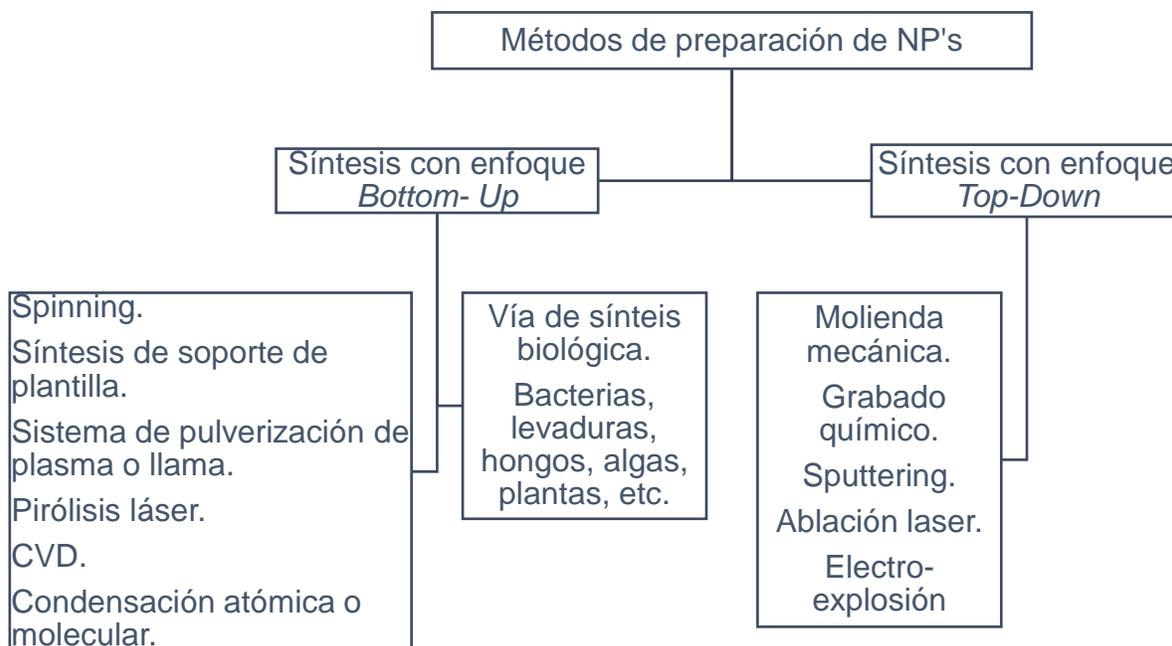


Figura 8. Métodos sintéticos típicos para NP's para los enfoques de arriba hacia abajo (*top-down*) y de abajo hacia arriba (*bottom-up*). [42]

2.4.4.1. Métodos físicos para la obtención de NPs

Se basan en métodos que involucran cambios físicos en la materia, siendo estos una vía ecológica para la obtención de NP's. Actualmente existe gran variedad de métodos de este tipo para su preparación, de los cuales se describirán con mayor detalle a continuación.

- ❖ **Evaporación.** Es un método común de deposición de película delgada. Se utilizan varias técnicas de evaporación, como la evaporación térmica y asistida por iones, para la síntesis y producción de NP's 0D, 1D, 2D y 3D. En esta técnica, los átomos o moléculas evaporados pierden energía a través de colisiones con los átomos o moléculas de gas y se someten a una condensación homogénea para formar grupos de átomos en las proximidades de la superficie de un polvo frío. Para evitar una mayor

agregación o coalescencia, los grupos formados deben eliminarse de la región de deposición. [44]

- ❖ Doble emulsión- evaporación de disolvente. Hace uso de las características fisicoquímicas de los materiales que forman a las NP's y de los disolventes que forman la fase continua y dispersa. La primera condición es saber que la fase continua de la emulsión primaria sea insoluble en la fase dispersa de la emulsión primaria y en la fase continua de la emulsión secundaria. Cuando la doble emulsión se ha formado, el siguiente paso es la eliminación del disolvente orgánico mediante la aplicación de calor, y si se trata de materiales termosensibles, serán tratadas con temperaturas moderadas y la aplicación de vacío. [47]
- ❖ Pulverización. Existen diferentes tipos de sistemas de pulverización catódica, como deposición asistida por iones, haz de iones, reactivo, alta utilización de objetivo, magnetrón de impulso de alta potencia y pulverización catódica de flujo de gas, se utilizan para la obtención de NP's. Un proceso típico de pulverización catódica generalmente implica la expulsión de átomos o grupos de materiales designados sometidos a un haz de gas inerte acelerado y altamente enfocado, como helio o argón. [44,47]
- ❖ Procesos de litografía. Es un proceso más versátil y fácil de implementar para producir el autoensamblado de NP's 0D, 1D, 2D y 3D en diferentes tipos de sustratos. También es un método rápido y eficaz para el modelado de superficies, que es compatible con una gran variedad de materiales. Incluye muchos tipos diferentes de preparación de superficies en las que un diseño se transfiere desde una fotomáscara o retícula a la superficie de un sustrato que permitiría realizar múltiples copias a partir de una exposición. [47]

2.4.4. Caracterización física

Se han practicado diferentes técnicas de caracterización para el análisis de diversas propiedades fisicoquímicas de las NPs, que dependiendo de estas, pueden ser caracterizadas mediante técnicas de caracterización morfológica, estructural, tamaño de partícula y área superficial, y ópticas, descritas en los siguientes apartados.

2.4.4.1. Caracterizaciones morfológicas

Las características morfológicas de los NP siempre adquieren un gran interés ya que la morfología siempre influye en la mayoría de las propiedades de estas. Existen diferentes técnicas de caracterización para estudios morfológicos, pero las técnicas microscópicas como la microscopía óptica polarizada (MOP), SEM y TEM son las más importantes de ellas.

2.4.4.2. Caracterizaciones estructurales

Las características estructurales son de primordial importancia para estudiar la composición y naturaleza de los materiales de unión. Proporciona información diversa sobre las propiedades generales del material en cuestión. XRD, rayos X de energía dispersiva (EDX), XPS, IR, Raman, BET y el analizador de tamaño son las

técnicas comunes que se utilizan para estudiar las propiedades estructurales de las NPs. [44]

2.4.4.3. Caracterizaciones del tamaño de partícula y área superficial

Se pueden utilizar diferentes técnicas para estimar el tamaño de las NP. Estos incluyen SEM, TEM, XRD, AFM y dispersión de luz dinámica (DLS). SEM, TEM, XRD y AFM pueden dar una mejor idea sobre el tamaño de partícula, pero el analizador de tamaño de potencial zeta /DLS se puede utilizar para encontrar el tamaño de NP en un nivel extremadamente bajo. En caso de aglomeración e hidrofobicidad, el DLS podría resultar incapaz de realizar una medición precisa, por lo que en ese caso deberíamos confiar en la técnica de alta resolución de sedimentación centrífuga diferencial.

BET es la mejor técnica para determinar la superficie de los materiales NP, basándose en el principio de adsorción y desorción y en el teorema de Brunauer-Emmett-Teller (BET). Normalmente se utiliza gas nitrógeno para este propósito. BET produce cuatro tipos de isotermas específicamente, que están etiquetados como Tipo I, Tipo II, Tipo III y Tipo IV. [44]

El potencial zeta es una propiedad de los materiales que miden el potencial electrocinético en sistemas coloidales, denominándose con la letra griega *zeta*. [48] Por el tamaño que presentan las NP's, las fuerzas de unión en la superficie del coloide y el líquido son las que determinan su comportamiento. Cada coloide contiene una carga eléctrica que suele ser de naturaleza negativa, aunque también puede ser positiva. Si la carga es suficientemente elevada los coloides permanecen discretos, dispersos y en suspensión. Reduciendo o eliminando estas cargas se obtiene el efecto opuesto y los coloides se aglomeran y sedimentan fuera de la suspensión [49], es decir, que el potencial zeta indica el grado de repulsión entre partículas adyacentes, cargadas en una dispersión. [48] Se usa el modelo de la doble capa (Figura 9) para visualizar la atmósfera iónica en la proximidad del coloide cargado y para explicar cómo actúan las fuerzas eléctricas de repulsión. Es posible entender este modelo como una secuencia de etapas que ocurren alrededor de un solo coloide negativo, si los iones que neutralizan sus cargas son repentinamente sacados. Veamos primero el efecto del coloide sobre el ión positivo (llamado contra-ión) en la solución. Inicialmente, la atracción del coloide negativo hace que algunos iones positivos formen una rígida capa adyacente alrededor de la superficie del coloide; esta capa de contra-iones es conocida como la capa de Stern.

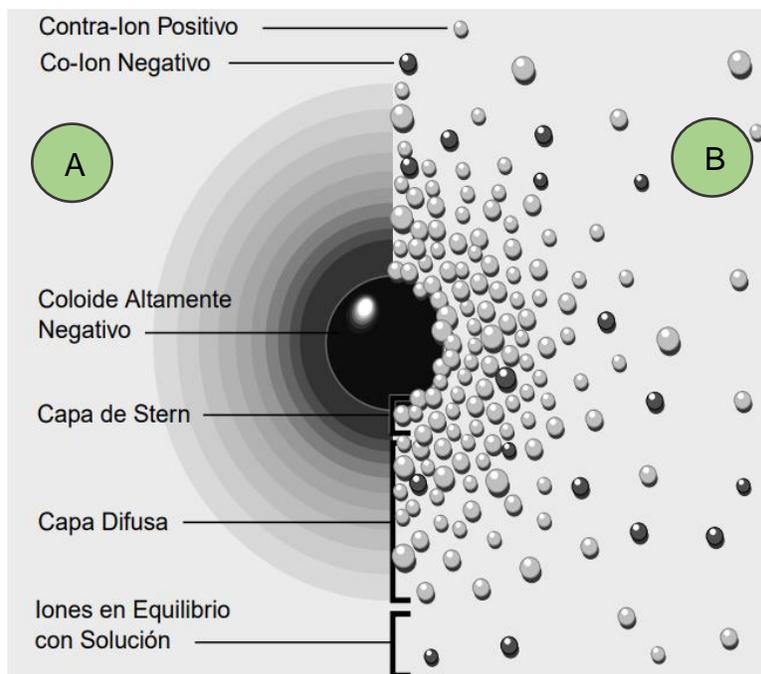


Figura 9. (A) Cambio en la densidad de carga alrededor de un coloide; (B) distribución de iones positivos y negativos alrededor del coloide cargado [Imagen tomada y adaptada de la referencia 49]

Otros iones positivos adicionales son todavía atraídos por el coloide negativo, pero estos son ahora rechazados por la capa de Stern, así como por otros iones positivos que intentan acercarse al coloide. Este equilibrio dinámico resulta en la formación de una capa difusa de contra-iones. Los contra-iones tienen una alta concentración cerca de la superficie, la cual disminuye gradualmente con la distancia, hasta que se logra un equilibrio con la concentración de los contra-iones en el seno de la disolución. [49]

2.4.4.3. Caracterizaciones ópticas

Las propiedades ópticas son de gran interés en las aplicaciones fotocatalíticas y por ello, especialistas en el tema adquirieron un buen conocimiento de esta técnica para revelar el mecanismo de sus procesos fotoquímicos. Estas caracterizaciones se basan en la famosa ley de Lambert-Beer y los principios básicos de la luz. Estas técnicas brindan información sobre las propiedades de absorción, reflectancia, luminiscencia y fosforescencia de los NP. Es ampliamente conocido que las NP, especialmente las metálicas y semiconductores, poseen colores diferentes y, por lo tanto, están mejor armonizados para aplicaciones relacionadas con la fotografía. El ultravioleta-visible (UV-Vis), la fotoluminiscencia (PL) y el elipsómetro nulo son los

instrumentos ópticos más conocidos, que pueden utilizarse para estudiar las propiedades ópticas de los materiales NP. [44]

2.4.5. Biocompatibilidad y toxicidad de las nanopartículas

La biocompatibilidad es definida como “la capacidad de un biomaterial para realizar su función deseada con respecto a una terapia médica, sin provocar ningún efecto local o sistémico no deseado en el receptor o beneficiario de esa terapia, pero generando la respuesta celular o tisular beneficiosa más apropiada en esa situación específica, y optimizar el desempeño clínicamente relevante de esa terapia”. [50]. Para efectos de las NP's, la toxicidad se refiere a la capacidad de las partículas para afectar negativamente la fisiología normal, así como para interrumpir directamente la estructura normal de órganos y tejidos de humanos y animales. Está ampliamente aceptado que la toxicidad depende de parámetros fisicoquímicos como el tamaño de las partículas, la forma, la carga superficial y la química, la composición y la posterior estabilidad de las NP. [51]

De acuerdo con los diferentes métodos de síntesis de las NP's, estas pueden tener diferentes tamaños, composición química y forma y pueden tener o no un recubrimiento superficial. Cada uno de estos factores puede afectar las interacciones entre los nanomateriales y las células o tejidos. Los NP pueden penetrar las células de la membrana y diseminarse a lo largo de las sinapsis de las células nerviosas, los vasos sanguíneos y el sistema linfático vascular. Al mismo tiempo, los NP se acumulan selectivamente en las diferentes células y en cierta estructura celular. [51] Es a partir de aquí, en donde los biomateriales deben cumplir ciertas características o ensayos que deben realizarse a las partículas para asegurar que son biocompatibles:

- Citotoxicidad. Se debe demostrar que la toxicidad es nula o baja, obteniéndose una respuesta aceptable.
- Actividad celular. Las NP's no deben influir en la actividad de las células ni inferir con sus funciones principales, lo que desencadena en su muerte o inmortalidad.
- Proliferación celular. No deben interferir con los tiempos de duplicación.
- Crecimiento celular. No deben interferir en el tamaño o velocidad de crecimiento.
- Morfología. Se evalúan cambios en la morfología de las células expuestas al nanomaterial.
- Ensayos bioquímicos. Los biomateriales no deben interferir en los procesos bioquímicos de las células. [52]

2.4.5.1. Biocompatibilidad y toxicidad de las MNPs

Un estudio ha revelado que usando una línea celular modificada embrionaria de riñón humano (HEK293), y utilizando una técnica colorimétrica de MTT para medir la viabilidad en ensayos de proliferación celular en los que las células fueron sometidas a concentraciones de 0.1, 1, 3, 5, 10, 25, 50 y 100 mg/ml de MNP's,

donde se muestra que para las 8 concentraciones la viabilidad promedio no disminuye de 95.22%, concluyendo que a estas concentraciones, las MNP's no son citotóxicas ni afectan a la proliferación celular a estas concentraciones. [12]

En comparación con las partículas de mayor tamaño, las reducidas dimensiones de las nanopartículas implican que los tejidos pueden captarlas con mayor facilidad. También puede darles una capacidad poco común de desplazarse en el cuerpo, incluso de entrar en las células y en los núcleos de éstas, así como atravesar la placenta y la barrera hematoencefálica, como lo demuestran los estudios realizados en roedores. [53]

2.4.6. Nanopartículas de melanina

2.4.6.1. Melanina de origen recombinante como materia prima

La melanina puede ser extraída de fuentes naturales, como tejidos animales o vegetales, siguiendo métodos relativamente económicos. Sin embargo, estas fuentes generalmente contienen una mezcla de diferentes tipos de melaninas y sustancias relacionadas, que complican los procedimientos de purificación y pueden producir un producto de composición variable. [14]

Estos polímeros también se pueden obtener mediante oxidación química o enzimática de sustratos fenólicos o indólicos. Estas metodologías pueden generar melaninas con un alto grado de pureza, pero a un costo relativamente alto. Otra opción para obtener estos polímeros se basa en el cultivo de microorganismos productores de melanina o que han sido modificados genéticamente para producir melaninas. Este enfoque tiene el potencial de generar esta clase de productos con un costo relativamente bajo y un alto rendimiento. [12]

La producción de melanina se ha observado en varias especies de microorganismos y hongos tanto en su entorno natural como en condiciones de crecimiento de laboratorio. Las especies de organismos con capacidad melanogénica que se han empleado para desarrollar procesos de producción incluyen *Pseudomonas stutzeri*, *Gliocephalotrichum simplex*, *Rhizobium* sp., *Brevundimonas* sp., *Aspergillus fumigatus*, *Bacillus safensis*, *Streptomyces lusitanus*, and *Streptomyces kathirae*. Se observó una correlación positiva con la producción de polímero al aumentar en los medios de cultivo la cantidad de L-tirosina o componentes que la contienen. Por tanto, el polímero producido es probablemente eumelanina. Los medios de cultivo que incluyen extracto de levadura o hidrolizados de proteínas durante el proceso de formación de melanina, algunos componentes del medio además de L-tirosina se pueden incorporar al polímero, produciendo un pigmento que no es eumelanina pura. Este es un inconveniente importante de la mayoría de los procesos desarrollados con organismos melanógenos que requieren medios complejos para su crecimiento y producción. [14]

2.4.6.1. Métodos de obtención de MNP's

Para la obtención de nanopartículas de melanina a partir de melanina de origen recombinante, Casarrubias y colaboradores en el Laboratorio de Investigación en Tecnología Farmacéutica han desarrollado principalmente 3 métodos [12]:

1. Método de nanocrystalización. Este método se basa en la neutralización de PVA en HCl con una solución de melanina a concentración de 1 mg/ml en NaOH 1N en un dosificador que adiciona 14 μ l de una solución básica de melanina, manteniendo una agitación de 600 rpm, por dos horas. Con esta metodología se obtienen MNP's de un rango de 160 a 958 nm aproximadamente y con cargas que varían de -1 a -30mV.
2. Método de doble emulsión evaporación de disolvente. Para este método, se aprovechó la capacidad de no solubilizarse en solventes orgánicos para implementarlo. Se basa en generar una emulsión W/O, donde la fase acuosa fue una solución de melanina 1mg/ml en NaOH 1N que es dispersa en una fase oleosa compuesta por diclorometano en presencia de Tween 80. Las mezclas se homogenizan con Ultra Turrax a 12,000 rpm, seguido de añadir PVA al 1% en HCl a 0.25 N con una agitación de 600 rpm por 30 minutos. Transcurrido el tiempo, se realiza un calentamiento a una temperatura menor de 80°C para eliminar el disolvente orgánico. Con esta metodología se obtienen MNP's de un rango de 167 a 874 nm aproximadamente y con cargas que varían de -18 a -40mV. Este método es el más reproducible y genera MNPs esféricas.
3. Método de homogenización a alta presión o microfluidización. Se utiliza una solución de 1,5 mg/ml de melanina pulverizada en agua desionizada para este método con enfoque *top-down*, donde se utiliza un microfluidizador empleando presión, y que, dependiendo de esta, variará el tamaño final de las partículas obtenidas, así como su morfología. [12]

2.4.6.2. Usos en el área médica y cosmética

Existen diversas aplicaciones de las nanopartículas de melanina en el área, teniendo una finalidad diferente médica según el medio en el que se han obtenido. Por ejemplo, durante la radioterapia, la irradiación ionizante interactúa con los sistemas biológicos para producir radicales libres, que atacan varios componentes celulares. Se reconoce fácilmente que el sistema hematopoyético es radiosensible y su daño puede ser grave. En este caso las MNP's actúan como captadores de radicales libres preparados mediante la polimerización de la dopamina, demostrando que las MNP's sintéticas proporcionan una radioprotección significativa a los tejidos hematopoyéticos. [54]

La protección de la médula ósea contra la radiotoxicidad durante la radioinmunoterapia y, en algunos casos, la radioterapia de haz externo, permitiría la administración de dosis significativamente más altas a los tumores, lo que aumentaría la eficacia y seguridad del tratamiento. La melanina, un pigmento natural, posee propiedades radioprotectoras. La melanina, que es insoluble, puede

ser administrada a la médula ósea mediante nanopartículas administradas por vía intravenosa, reduciendo así la toxicidad hematológica en ratones tratados con radiación externa o radioinmunoterapia. [55]

Dentro de las formulaciones cosméticas que ofrecen protección contra la radiación solar, tales como protectores solares, en los últimos años se han desarrollado formulaciones que contienen nanopartículas de zinc y titanio que han demostrado ofrecer un FPS elevado [56], sin embargo dentro del área de la nanotecnología y la cosmética, el uso de nanopartículas de melanina de origen recombinante aún no ha sido desarrollado. Existen estudios en donde se han creado versiones sintéticas de melanosomas, usando dopamina para producir nanopartículas similares a la melanina con capas y núcleos hechos de polidopamina; cuando se incubaron en una placa de Petri con queratinocitos humanos, las partículas sintéticas fueron absorbidas por las células de la piel y distribuidas alrededor de sus núcleos como la melanina natural, no obstante, es un procedimiento que solo fue realizado de manera *in vitro*, además de que no existe aún un protocolo seguro o comprobado en el que su uso en humanos pueda ser administrado, o alguna forma farmacéutica o cosmética con la cual aplicarse. [64] De manera similar, se han obtenido nanopartículas de melanina de origen natural a partir de sacos de tinta de una especie de molusco llamado *Sepia Separdreana*, método de obtención poco sostenible frente a los requerimientos de la industria a pesar de ofrecer una protección solar frente a radiación, y de la misma forma, sin contar con una forma farmacéutica viable apta para uso humano. [65]

3. JUSTIFICACIÓN.

Día con día la incidencia de contaminación en el ambiente ha ido en aumento, provocando que la capa de ozono que nos protege de los rayos UV absorba cada vez menos este tipo de radiación y en consecuencia repercute sobre la población provocando diferentes afecciones en la piel que pueden desembocar en enfermedades tan graves como lo son los diferentes tipos de cáncer que pueden darse a nivel cutáneo. Existen diversos tipos de productos que protegen a la piel de la radiación solar con el fin de evitar estas enfermedades cutáneas a largo plazo, sin embargo, estos productos suelen contener altos porcentajes de filtros químicos en sus formulaciones, provocando su difícil manufactura además de que pueden llegar a tener repercusiones toxicológicas sobre el cuerpo.

Se ha demostrado que las nanopartículas de melanina poseen mejores propiedades de protección frente a radiación solar en comparación con la melanina con tamaño de partícula mayor; aprovechando estas características, el uso de nanopartículas de melanina de origen recombinante podría resolver algunas de las cuestiones mencionadas anteriormente, como la prevención de afecciones en la piel, la obtención de una formulación estable, con propiedades para la vía tópica, y con función cosmética no invasiva que facilite su uso sobre la piel, y que sobre todo, ofrezca una protección contra la radiación solar tal que pueda reducir cantidades de activo cosmético y pueda ser medible mediante técnicas *in vitro*.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar el efecto fotoprotector UV de manera *in vitro* de nanopartículas de melanina preformada formuladas en diferentes formas cosméticas

4.2. Objetivos específicos

4.2.1. Caracterizar físicamente la melanina recombinante preformada como materia prima.

4.2.2. Reproducir el método de doble emulsión- evaporación de disolvente para la obtención y caracterización física de nanopartículas a partir de melanina de origen recombinante preformada.

4.2.3. Desarrollar y validar un método espectrofotométrico para la cuantificación de melanina y MNP's.

4.2.4. Definir y desarrollar las formas cosméticas a emplear como vehículos para la formulación de las nanopartículas de melanina obtenidas.

4.2.5. Realizar la caracterización fisicoquímica de las formulaciones cosméticas obtenidas para evaluar su calidad, incluyendo estudios estabilidad física en las formulaciones obtenidas.

4.2.6. Determinar el factor de protección solar (FPS) *in vitro* para las nanopartículas de melanina y sus formulaciones, empleando el método de Mansur.

5. HIPÓTESIS

Las nanopartículas de melanina recombinante preformada generadas mediante el método de doble emulsión- evaporación presentarán un efecto de fotoprotección ultravioleta a diferentes concentraciones cuando sean formuladas en vehículos cosméticos de diferentes bases (emulsión, aceite y gel), los cuales presentarán estabilidad física y propiedades tecnológicas para ser aplicados sobre la piel.

6. DIAGRAMA DE LA ESTRATEGIA METODOLÓGICA

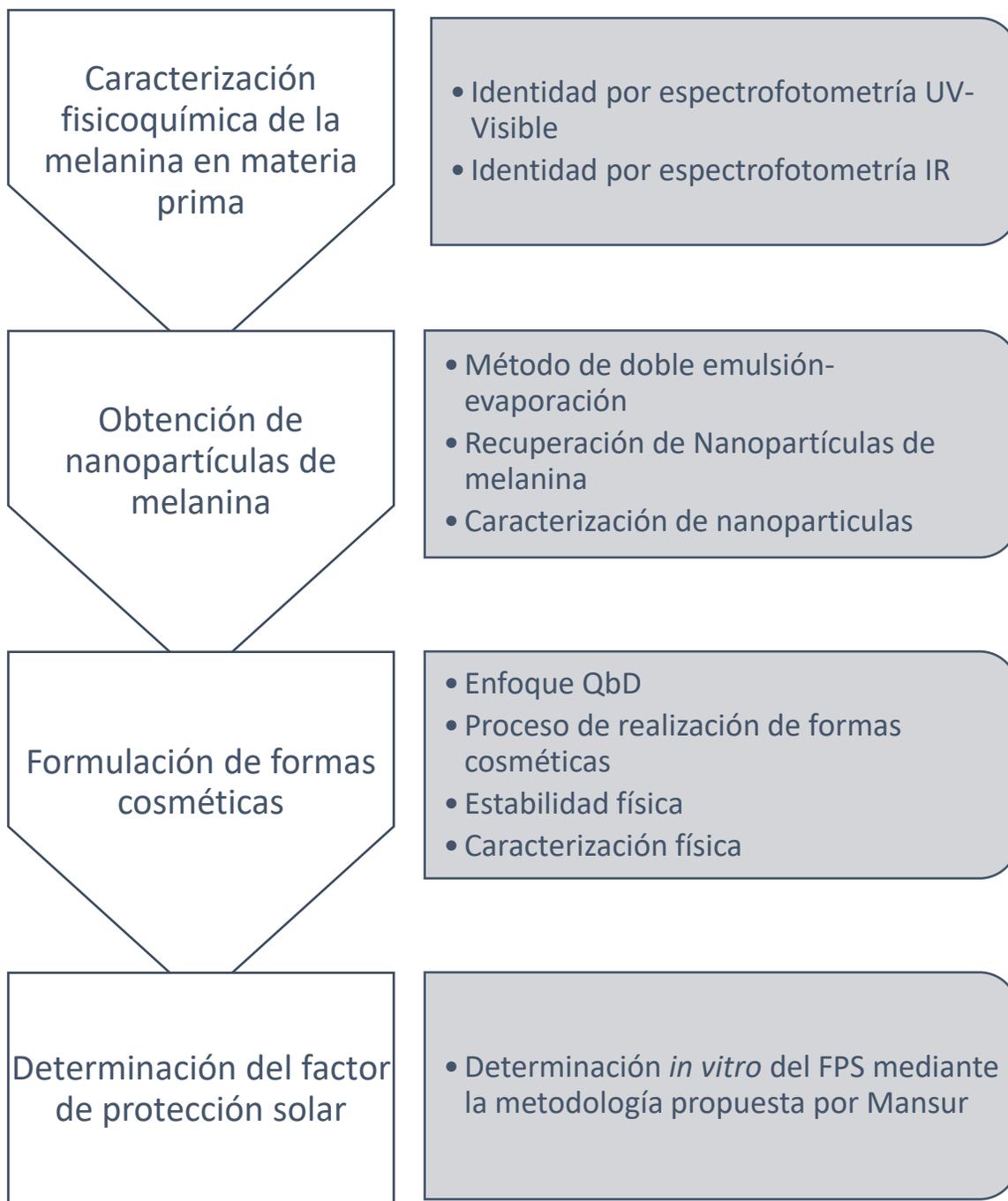


Figura 10. Diagrama de la estrategia experimental.

7. METODOLOGÍA

7.1. Caracterización de la melanina recombinante preformada como materia prima.

7.1.1. Tratamiento de la materia prima

Los gránulos de melanina preformada donados por el Dr. Guillermo Gosset del Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México en Cuernavaca, Morelos, fueron colocados en pequeñas cantidades en un mortero, pulverizándolos por aproximadamente 15 minutos hasta obtener un polvo fino. Una vez obtenido, se almacenó en un tubo con rosca de polipropileno de 50 mL cubierto con su respectiva tapa, a temperatura ambiente y en un lugar seco.

7.1.2. Identidad por espectrometría UV-Vis

Se preparó una solución de 25 $\mu\text{g/mL}$ de la melanina materia prima en NaOH 1N para realizar un barrido en la región de luz UV y Visible en un rango de 200 a 800 nm en un espectrofotómetro Cary® 60 con una celda de cuarzo con dimensiones de 1x1x5 cm, tomando como línea base la solución de NaOH y así evitar interferencias de los máximos de absorción entre la melanina y el disolvente, obteniendo con esto los picos de mayor absorción de luz ultravioleta de la melanina y comparar los espectros con el de referencia. [6]

7.1.3. Identidad por espectroscopía infrarrojo

Para obtener el espectro IR y confirmar la identidad de la melanina materia prima, se tomó una muestra de 10 mg de la melanina pulverizada y seca, siendo leída en un espectrofotómetro IR en un rango de 1000 a 3500 cm^{-1} .

7.2. Método analítico por espectrofotometría UV para la cuantificación de la melanina

Para conocer la concentración tanto de la melanina de origen recombinante tanto como de la obtenida de NPs de melanina, se realizó una curva de calibración con concentraciones de 2.5, 5, 10, 15, 20 y 25 $\mu\text{g/mL}$ con NaOH como matriz acuosa, replicando por triplicado. A partir del barrido realizado para la identidad espectrofotométrica UV- visible, se seleccionó uno de los picos de máxima absorción para hacer las mediciones de absorbancia en un espectrofotómetro Cary® 60 UV-V con una celda de cuarzo con dimensiones de 1x1x5 cm, utilizando $\lambda=227\text{nm}$ como referencia.

Para este método, se evaluaron los siguientes parámetros de desempeño:

1. Linealidad. A partir de la curva de calibración, se determinó el coeficiente de determinación con $r^2 > 0.99$, la ordenada al origen y la pendiente, obteniendo la ecuación de la curva.
2. Exactitud. Se realizaron diluciones por sextuplicado a concentraciones de 5 y 25 $\mu\text{g/ml}$, obteniendo sus absorbancias a $\lambda = 227 \text{ nm}$., y calculando la cantidad recuperada a partir de la ecuación de linealidad. Para cada concentración se determinó el porcentaje de recobro con la siguiente expresión:

$$\% \text{Recobro} = \frac{\text{Concentración real de la muestra}}{\text{Concentración teórica}} \times 100$$

A los resultados obtenidos se les calculó la media, desviación estándar, intervalo de confianza, límite superior y límite inferior.

3. Límites de cuantificación y detección. Se calcularon mediante las siguientes expresiones:

LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

LÍMITE DE DETECCIÓN

$$L.C. = \frac{10\delta}{S}$$

$$L.D. = \frac{0.33\delta}{S}$$

δ = Desviación estándar del intercepto

S = Pendiente de la curva de calibración

Una vez cumplidos los parámetros anteriores, para calcular la concentración de nanopartículas se hizo una dilución 1:100 de la muestra de NPs con NaOH, y se leyó su absorbancia a 227 nm. Los resultados de las absorbancias se usaron junto con la ecuación de la curva de calibración para calcular la cantidad de NPs obtenidas.

7.3. Obtención de nanopartículas de melanina

7.3.1. Método de doble emulsión- evaporación (DE)

Para realizar la fase acosa de la primera emulsión W/O se usaron 10 mL de una solución de melanina a una concentración de 1 mg/mL completamente disuelta en NaOH 1 N, que después fue dispersada en 20 mL de diclorometano al que se le agregó Tween[®] 80 al 1% para generar la fase oleosa. Esta mezcla heterogénea, fue homogenizada con un dedo ultrasónico de dispersión marca Ultra Turrax[®] (IKA T18

Digital) a 12,000 rpm por 12 minutos, montando un sistema como lo muestra la Figura 11.



Figura 11. Sistema de montaje para la elaboración de NPs de melanina por el método de doble emulsión- evaporación de disolvente.

Terminado el tiempo de homogenización, habremos generado la primera emulsión W/O, que después fue vertida inmediatamente, de manera continua y sin tocar las paredes, en 40 mL de una solución de PVA al 1% en HCl 0.25 N. Posteriormente, el sistema se colocó bajo agitación en un homogenizador IKA Eurostar 60 Control a 600 rpm por 30 minutos. Al finalizar, se calentó esta mezcla a no más de 80 °C con la finalidad de eliminar por completo el disolvente orgánico, obteniendo así una suspensión acuosa de NPs de melanina.

7.3.2. Optimización, concentración, lavado y recuperación

Una vez obtenidas las nanopartículas de melanina, las suspensiones se vertieron en tubos cónicos de 15 o 50 ml para ser centrifugadas a 12,000 rpm por 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se desechó el sobrenadante y el *pellet* resultante fue resuspendido con 5 ml de agua destilada, repitiendo este último proceso por triplicado, finalizando con la resuspensión de las MNP's con 5 ml de agua destilada después del último ciclo de lavado.

Para la obtención de las nanopartículas estado sólido, se sometieron a calentamiento a 70°C para la evaporación parcial del agua. Al obtener la menor cantidad de líquido, se utilizó papel filtro dentro de una caja de Petri para ser depositadas y posteriormente se introdujo en una estufa a 40°C por una hora

7.3.3. Caracterización de nanopartículas de melanina

7.3.3.1. Tamaño de partícula

La medición del tamaño de partícula se realizó mediante la técnica de dispersión dinámica de luz en un equipo Zetasizer® Nano ZS90 de Malvern Panalytical® con las condiciones mostradas en la Tabla 9.

Parámetro	Condición
Índice de refracción del material	1.45
Dispersante	Agua
Índice de refracción del dispersante (agua)	1.33
Tiempo de equilibrio	120 s
Resolución	16 lecturas, por triplicado
Temperatura	25° C

Bajo estas condiciones y para su medición, se realizó una dilución 1:10 con el dispersante, homogenizando en un vortex por 30s y utilizando 1 mL de ésta en una celda para Zetasizer adecuándola según el reporte de calidad de la medición dada por el equipo.

7.3.3.2. Potencial zeta

La medición de potencial zeta se realizó en un equipo Zetasizer Nano ZS90 de Malvern con una celda capilar plegada con electrodos para PZ de Malvern Panalytical®. Para obtener las lecturas, se hizo una dilución 1:10 con el dispersante utilizado, en este caso, agua; se añadió 1mL de ésta dentro de la celda, sujetándose a las condiciones del equipo. El equipo se ajustó para la medición del PZ a las condiciones siguientes:

Parámetro	Condición
Dispersante	Agua
Tiempo de equilibrio	120 s
Resolución	16 lecturas, por triplicado
Temperatura	25 ° C

7.4. Obtención de las formulaciones cosméticas para las nanopartículas de melanina

7.4.1. Establecimiento de las formas cosméticas bajo el enfoque QbD

7.4.1.1 Selección de excipientes

Se realizó la ejecución de la fase I del desarrollo cosmético bajo un enfoque de Calidad por diseño, estableciendo un Perfil de Calidad del Producto (QTPP), Análisis de Riesgos para definir los Atributos Críticos de Calidad (CQA's) y la Identificación de Parámetros Críticos De Proceso y Materiales (CPP's y CMA's). Para cada uno de estos, se usaron tablas y diagramas distintos dependiendo del objetivo que cada parámetro requiriera con las características siguientes:

- Perfil de producto objetivo (TPP). Se usó una tabla que contuviera en el eje vertical los parámetros de ingrediente activo cosmético, forma cosmética, vía de administración, indicación y régimen de aplicación; esto en relación con el eje horizontal que contuviera el parámetro del perfil, objetivo y anotaciones sobre justificación y/o criticidad. Se hizo la relación, búsqueda bibliográfica y anotaciones correspondientes para que la tabla sea llenada correctamente.
- Perfil de Calidad de Producto Objetivo (QTPP). Se hizo una tabla que contuviera en el eje vertical parámetros de atributos físicos, atributos químicos y atributos fisicoquímicos, los cuales se relacionaran en el eje horizontal con parámetros del perfil, objetivo y/o especificación, justificación y si es o no un parámetro de calidad. Se llenó con base en los requerimientos normativos como fabricante.
- Propuesta de formulación y materiales. Se usó una tabla contraponiendo el ingrediente activo, los excipientes y los materiales de empaque en el eje vertical, contra el material, la justificación y/o función en la fórmula, y el porcentaje en la fórmula. Para llenar esta tabla, se hizo una investigación bibliográfica para conocer interacciones, materiales y cantidades. Además, se utilizó el programa *HLB Computagraph* para conocer los porcentajes de tensoactivos a utilizar en las formulaciones que lo requerían.
- Análisis de Riesgos para definir los Atributos Críticos de Calidad (CQA's). Para identificar los elementos que podrían influir en la calidad del producto final, se tomó en consideración el QTPP y los elementos del Método de las 5 M's (maquinaria, mano de obra, método, medio ambiente y materia prima) mediante un diagrama de Ishikawa o de pescado, identificando así los elementos que presentan un mayor riesgo o impacto sobre los QA's, para entonces definirlos como CQA's.
- Identificación de Parámetros Críticos De Proceso y Materiales (CMA's y CPP's). Derivado del análisis causa- efecto del diagrama de Ishikawa, se

determinaron los riesgos de las variables que podrían afectar la calidad del producto mediante las siguientes matrices:

- CMA's. Mediante una tabla, se introdujeron los datos de manera horizontal con los materiales, factores de riesgo, si afecta o no a un CQA's y a cuál, y su nivel de riesgo calificándolo según la Tabla 11.
- CPP's. Mediante una tabla, se introdujeron los datos de manera horizontal con el proceso, parámetro, factor de riesgo, si afecta o no a un CQA's y a cuál, y su nivel de riesgo calificándolo según la tabla 11.

Tabla 11. Niveles de riesgo de Parámetros Críticos De Proceso y Materiales		
Nivel de riesgo		¿Requiere investigación?
Bajo	B	No se requiere
Medio	M	Puede requerirse
Alto	A	Alto

Se usaron los anteriores análisis para cada formulación propuesta como vehículo para las diferentes formas cosméticas del protector solar con MNPs.

7.4.1.2. Procedimiento de manufactura de las formas cosméticas

Para efectos tecnológicos y de comparación, se realizaron diferentes tipos de formas cosméticas, con diferencias tecnológicas en la formulación, además se realizaron controles positivos y negativos como lo muestra el siguiente diagrama:

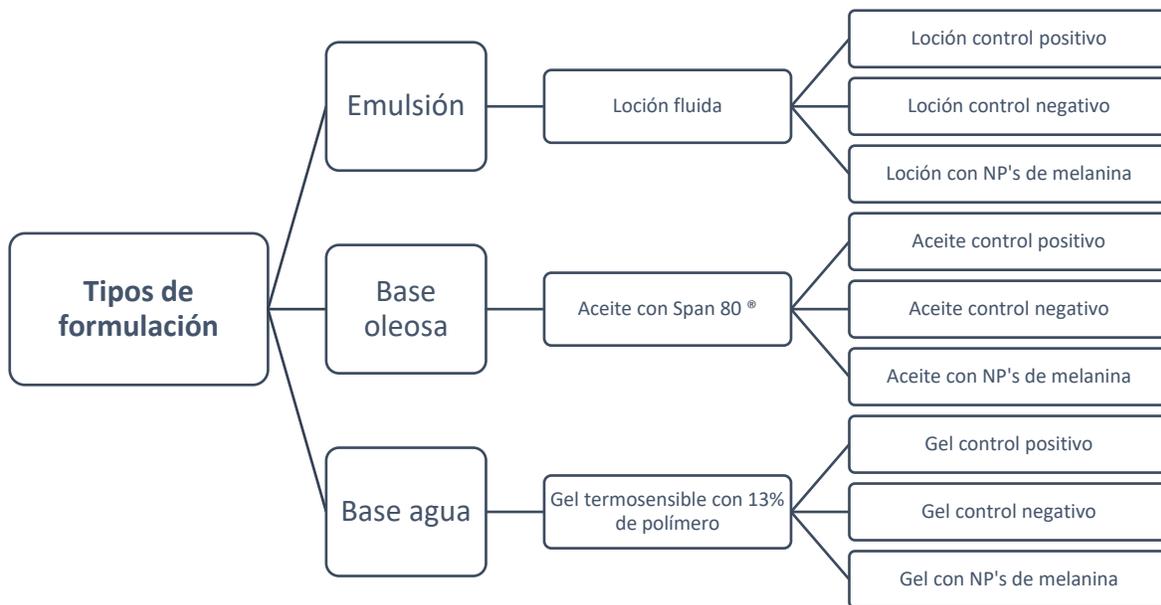


Figura 12. Diagrama de tipos de formulación, bases, diferencias tecnológicas y controles realizados.

7.4.1.3. Realización de emulsiones

Se propuso una crema fluida y una loción debido a que estas presentaciones tienen una mejor aceptación en el mercado. Para ambas formas cosméticas, se realizaron controles negativos que solo contuvieran los ingredientes propuestos en el QbD, controles positivos que contuvieran filtros a sabiendas de que tienen un efecto protector usando como referencia el simulador de Basf® para predecir el FPS de la formulación; por último, y utilizando la misma formulación que se usó para el control negativo, se realizaron emulsiones con las NP's de melanina, sustituyendo en la formulación la cantidad de agua por las de las NP's en suspensión en agua con su concentración conocida. Para conocer la cantidad de NP's necesarias para obtener el mayor FPS posible, se utilizó el 1% de NP's en suspensión como lo marcaban las referencias [54,55]; para que a partir de ahí hacer ajustes.

Para mantener a las emulsiones estables, se calculó el Balance Hidrofílico- Lipofílico requerido para la formulación mediante la ecuación siguiente:

$$HLB_{req. emul} = \sum \left(\frac{\% \text{ componente de la } f. \text{ oleosa}}{\Sigma \% f. \text{ oleosa}} * HLB_{req} \right) \quad \text{Ec. 3}$$

Siendo:

% componente de la f. oleosa. Fracción del componente de la fase oleosa dentro de la formulación.

Σ %f. oleosa. La suma de la fracción de los componentes de la fase oleosa.

HLB req. HLB requerido de cada componente en la formulación, dado por tablas preestablecidas en la literatura.

Con base en el HLB requerido para la emulsión que se obtuvo, se seleccionaron los emulsificantes a emplear para una mezcla binaria, utilizando el programa *HLB Computagraph* para conocer el porcentaje requerido de cada uno de ellos para mantener su estabilidad. Una vez obtenidos estos porcentajes, se hizo una relación para establecer la cantidad a utilizar de cada uno de ellos respecto al porcentaje determinado de estos.

Una vez resueltas estas cuestiones, se procedió a realizar las emulsiones bajo el siguiente procedimiento:

- Pesar los ingredientes de la formulación según el tamaño de lote que se vaya a fabricar.
- Fase oleosa. Adicionar todos los componentes lipofílicos incluyendo el tensoactivo de elección con bajo HLB en un recipiente idóneo. Calentar a 70-72°C, agitando hasta su completa incorporación.
- Fase acuosa. En un recipiente distinto, colocar el agua suficiente y calentar a 70-72°C Tomar en cuenta para cada formulación:
 - El control positivo contendrá en esta fase el filtro a utilizar. Éste debe ser disuelto antes de agregar los ingredientes hidrofílicos restantes a la formulación.
 - El control negativo contendrá toda la cantidad de agua suficiente requerida, sin más.
 - En la formulación que contenga las NP's de melanina, sustituir en el porcentaje que corresponda de agua, la concentración deseada de NP's de melanina.

Una vez añadidos todos los componentes hidrofílicos, se añadió el tensoactivo de la misma naturaleza hasta incorporar por completo.

- Se vertió la fase oleosa en la fase acuosa, ambas a 70-72 °C, agitando y manteniendo la temperatura durante 5 minutos. Se redujo la velocidad de agitación hasta enfriar. Se adicionó el aroma agitando hasta su incorporación total, y se dejó enfriar a temperatura ambiente.
- Se llenó el envase propuesto en el QbD con las formulaciones resultantes. Se conservaron a temperatura ambiente hasta su utilización.

7.4.1.4. Realización de aceites fluidos

Se realizó la mezcla de distintos ingredientes lipofílicos en diferentes proporciones según la propuesta descrita en el enfoque de Calidad por Diseño. Éstos fueron pesados en las proporciones sugeridas, posteriormente mezclados y calentados a 40°C durante 10 minutos hasta su completa incorporación. La mezcla se dejó enfriar hasta llegar a temperatura ambiente.

Se hicieron pruebas de solubilidad de la mezcla anterior con Span® 40, Span® 60, Tween® 80 y Span® 80. Se seleccionaron dos de los tensoactivos que contaran con la mejor afinidad a la formulación y se produjeron aceites fluidos conteniendo 1% de tensoactivo dentro de la formulación, teniendo en cuenta para cada tipo de formulación propuesta lo siguiente:

- El control negativo contenía solo los ingredientes propuestos en el QbD.
- El control positivo deberá ser agregado a la mezcla durante su calentamiento hasta estar completamente incorporado a la formulación.
- A la formulación que contenga NP's de melanina, se le agregará directamente la cantidad necesaria de la suspensión de NP's en agua para que contenga la concentración deseada de éstas. Calentar a 75°C y mantener en agitación hasta que el agua se haya evaporado por completo.

Se llenaron los envases propuestos en el QbD con las formulaciones resultantes. Se conservaron a temperatura ambiente hasta su utilización.

7.4.1.5. Realización de geles

Se propusieron formulaciones con dos diferentes concentraciones del polímero formador de gel con el fin de presentar viscosidades que demostraran tener características tecnológicas distintas entre sí.

Para su preparación, a la cantidad de agua suficiente se le agregaron los ingredientes hidrosolubles propuestos en el QbD y se mantuvo en agitación hasta su completa incorporación; para la formulación que contuvo las NP's de melanina y para el control positivo, este fue el momento en el que se les fue agregado las NP's y el filtro en sus proporciones correspondientes. En seguida, esta mezcla se sometió a refrigeración hasta alcanzar los 12°C; al llegar a esa temperatura se le fue agregado el polímero seleccionado y fue llevado nuevamente a refrigeración durante 1 hora. Terminado el tiempo, se mantuvo en agitación hasta su completa incorporación.

Las formulaciones se incorporaron a sus respectivos envases y se conservaron a temperatura ambiente hasta su utilización.

7.4.4. Caracterización de las formulaciones- medición de los Atributos Críticos de Calidad

Una vez fabricadas todas las formulaciones, se les realizaron diferentes pruebas fisicoquímicas en distintas etapas, siendo la primera de estas el mismo día de

realización del lote; después, las pruebas fueron realizándose cada 7 días a las formas cosméticas sometidas a estabilidad durante un mes, manteniéndolas a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de realizarlas. Estos ensayos se llevaron a cabo de la siguiente manera:

- Apariencia. Se tomó nota de la homogeneidad de las formulaciones, si hay separación de fases, turbidez, solidez y otras características visibles en cada una de ellas.
- Viscosidad. Se tomó una muestra de 15 ml de cada una de las formulaciones, vaciándola sobre el tubo para su medición en un viscosímetro Brookfield DV3T®. Una vez calibrado, se midieron las viscosidades a diferentes revoluciones por minuto y en los casos requeridos, distintas temperaturas.
- Temperatura sol-gel. En un viscosímetro Brookfield DV3T® se montó un sistema como el mostrado en la Figura 13, ajustando y regulando la temperatura con ayuda de una parrilla de calentamiento, haciendo pasar agua a través del tubo que contenía las muestras de gel termosensible.



Figura 13. Sistema de montaje para la medición de la relación temperatura-viscosidad de geles termosensibles.

Con este método, se midió la viscosidad de los geles desde los 12°C hasta los 40°C.

- pH. Se calibró un potenciómetro según sus especificaciones, introduciendo el electrodo dentro de una muestra de las formulaciones hasta la obtención de un resultado estable por el aparato.
- Gravedad específica. Utilizando un picnómetro, éste se pesó vacío, después lleno de agua y por último con una cantidad de la muestra de cada formulación. Con ayuda de la siguiente fórmula, se calculó la gravedad específica de cada formulación:

$$G. E. = \left(\frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \right) * \rho_w$$

donde:

m_0 = masa del picnómetro vacío.

m_1 =masa del picnómetro con agua

m_2 =masa del picnómetro con muestra de la formulación

ρ_w = densidad del agua a 25°C

- Color. Se tomó nota del color obtenido al final del proceso de formulación, evidenciando esto con una fotografía para hacer una comparación del día 1 contra el día 30, observando si se presentaron cambios significativos.
- Olor. Se describió el olor de cada formulación. Durante el tiempo que se sometieron a estabilidad se siguió monitorizando para detectar cambios u olores extraños.
- Estabilidad de las formulaciones. Las formulaciones fueron sometidas a las condiciones de almacenamiento descritas por las Normas Oficiales Mexicanas 059 y 073 de Buenas Prácticas de Fabricación de medicamentos y la de Estabilidad de Fármacos y Medicamentos, respectivamente. Se usaron los parámetros de la estabilidad acelerada, que indica condiciones de 40°C ± 2°C con una Humedad Relativa de 75% ± 5% o 40°C ± 2°C/ no más de 25% HR. Las formas cosméticas se mantuvieron en una estufa bajo estas condiciones durante un mes, siendo evaluadas y monitoreadas cada 7 días con las pruebas de caracterización para cada una de ellas.

7.5. Determinación del factor de protección solar

Para la determinación del factor de protección solar de las diferentes formas cosméticas y MNP's, se tomó como referencia el procedimiento descrito por Mansur [39], haciendo los ajustes necesarios para su optimización. Se pesó 1 gramo de la formulación bajo estudio en un matraz de 10 ml, añadiendo 5 ml de etanol y homogenizando por 5 minutos. Recurrido este tiempo, se llevó al aforo y se filtró con ayuda de un portafiltros Swinnex® y papel filtro. Se tomó una alícuota de esta

solución, se depositó en un matraz de 10 ml y se llevó nuevamente al aforo con etanol. Se realizó una última dilución tomando una alícuota de de 200 µl de esta solución, homogenizándola en otro matraz aforado de 10 ml y llevando al aforo con etanol. Se tomó una muestra de la dilución final en una celda de cuarzo con dimensiones de 1x1x5 cm³ la cual fue llevada a un espectrofotómetro Cary® 60 UV-V, calibrándolo con etanol y haciendo un barrido de 320 a 290 nm en intervalo de 5 nm para cada caso.

Una vez obtenidas las absorbancias, se utilizó la siguiente fórmula:

$$FPS = FC \times \sum_{290}^{320} \times EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda)$$

Donde:

FPS: Factor de protección solar

FC: 10 (factor de corrección)

EE (λ): Efecto eritemogénico de radiación de longitud de onda λ*

I (λ): Intensidad del sol en la longitud de onda λ*

Abs (λ): Absorbancia de la solución en la longitud de onda λ

En donde el efecto eritemogénico de radiación de longitud de onda λ (EE (λ)) y la intensidad del sol en la longitud de onda λ* (I (λ)) es una constante determinada por Sayre y Colaboradores, y se desglosa en la Tabla 12.

Tabla 12: Relación entre el efecto eritemogénico y la intensidad de la radiación de cada longitud de onda para el Método Mansur, determinada por Sayre

λ (nm)	320	315	310	305	300	295	290
EE(λ)xI	0.018	0.1	0.1869	0.3278	0.2874	0.0817	0.015

Para el caso del control positivo, se usó benzofenona-4 en sus porcentajes permisibles y utilizando el simulador de FPS de BASF para que el valor teórico fuese similar al propuesto en la norma ISO 24443 *Determination of sunscreen UVA photoprotection in vitro*. Este control fue utilizado para ajustar los resultados obtenidos de las demás formulaciones. [36]

8. RESULTADOS.

8.1. Caracterización de la melanina recombinante preformada como materia prima

8.1.1. Tratamiento de materia prima

En la Figura 14 (A) se muestra la melanina de origen recombinante preformada, teniendo un aspecto brillante, de color negro, amorfo, bordes irregulares y con gránulos de diferentes tamaños macroscópicos. Después de pulverizarla durante 15 minutos aproximadamente, se obtuvo un polvo fino como el que muestra la Figura 14 (B), obteniendo así la materia prima con la que se realizaría la caracterización fisicoquímica, la generación de las NP's de melanina y su cuantificación.

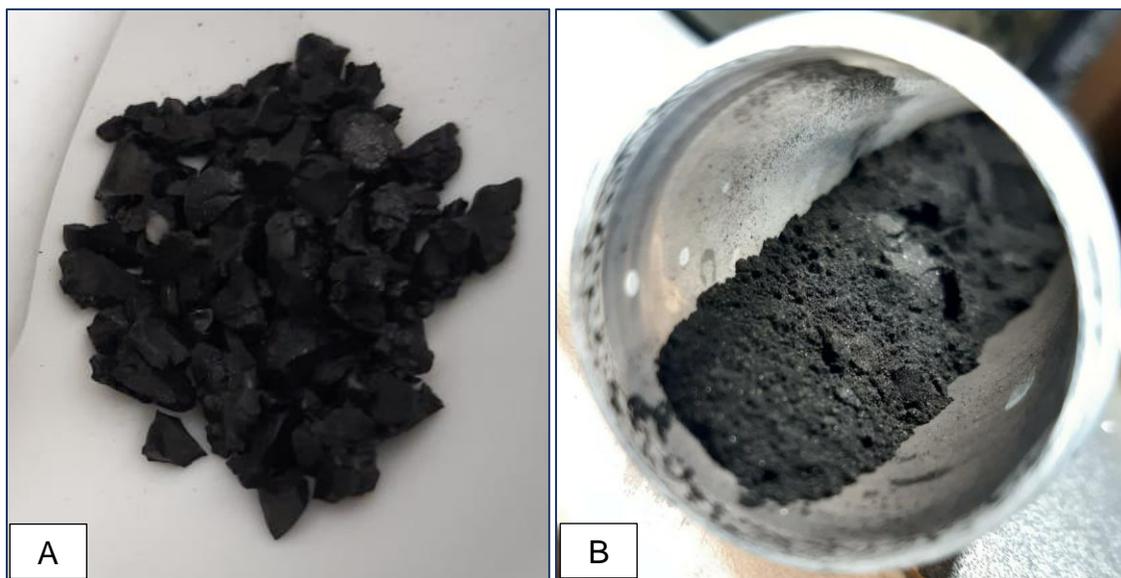


Figura 14. (A) Melanina materia prima preformada sin tratamiento; (B) Melanina materia prima pulverizada.

Debido a su baja solubilidad [12] y a que en experimentos posteriores sería necesaria de manera totalmente disuelta, se colocó la cantidad necesaria para una solución 1N de NaOH en un matraz aforado junto con la melanina requerida para formar una solución de 1 mg/mL; sin llegar al aforo, se mantuvo en agitación a 40 rpm por 24 horas. Transcurrido el tiempo, se llevó al aforo y se mezcló nuevamente por 5 minutos. Una vez obtenida la solución, se almacenó en recipientes de vidrio para su posterior uso.

8.1.2. Identidad por espectrofotometría UV-visible

En la Figura 15 se muestra el barrido realizado en un rango de 200 a 400 nm en el espectro ultravioleta, y de 400 a 800 nm en el espectro visible de la melanina materia prima en NaOH con una concentración de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La línea azul representa el espectro de la melanina, donde el escaneo de longitud de onda UV-Vis mostró que la absorción fue más alta en la región UV de 200 a 300 nm y disminuyó hacia la región visible, presentando un pico máximo de absorción a 227 nm, siendo similar a lo obtenido por Mboniyirivuze y Colaboradores [68]; la línea naranja representa el barrido de 200 a 800 nm del NaOH 1N ya que éste fue utilizado como disolvente de la melanina, observándose que no presenta una interferencia con la λ_{max} obtenida de la melanina.

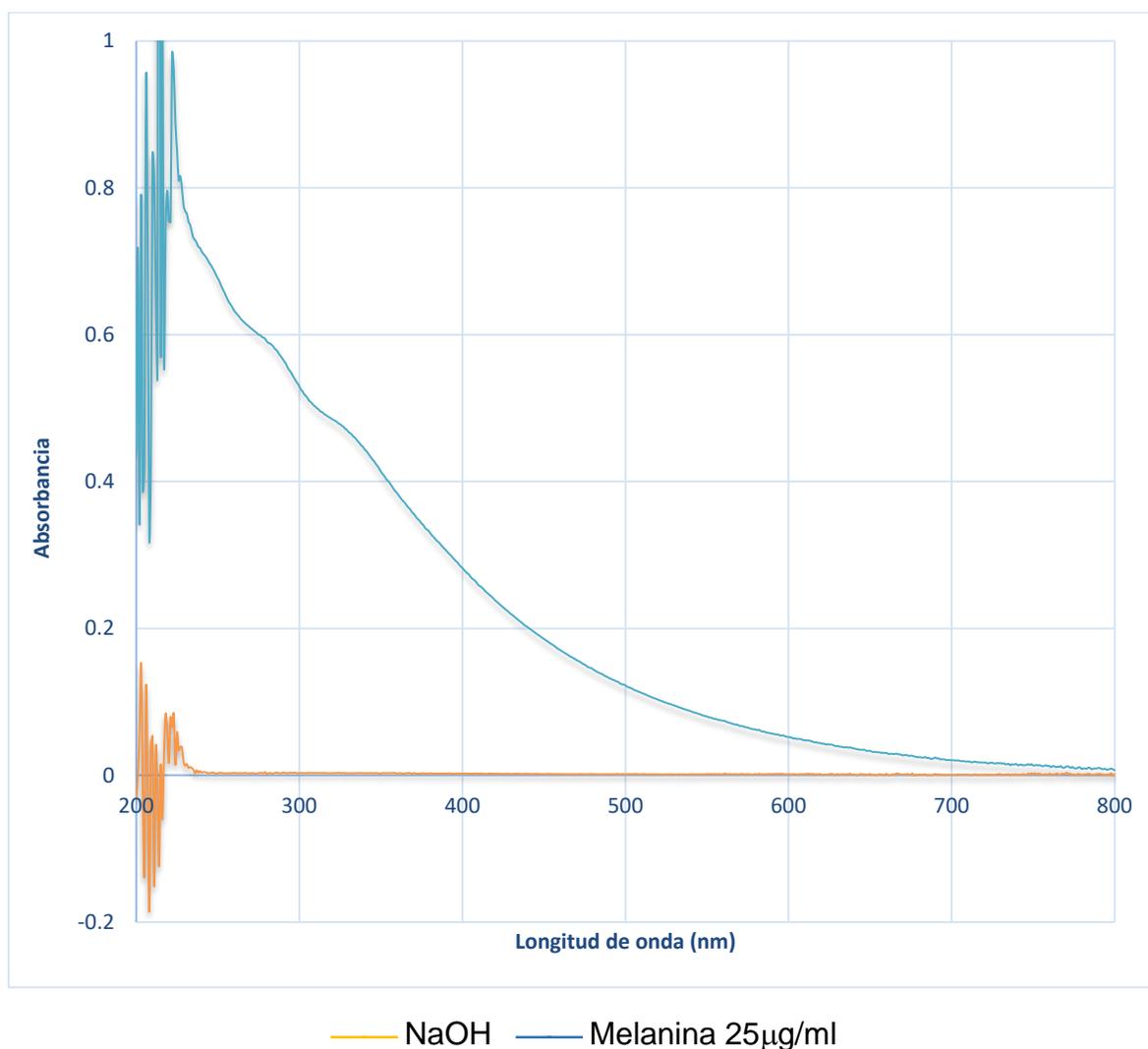


Figura 15. Espectro UV-visible de la melanina materia prima en NaOH.

8.1.3. Identidad por espectroscopía IR de la melanina materia prima

En la Figura 16 se muestra el espectro IR de la melanina en un rango de 1000 a 3500 cm^{-1} . El espectro coincide con el reportado por Casarrubias [12]; permitiendo verificar la identidad de la melanina.

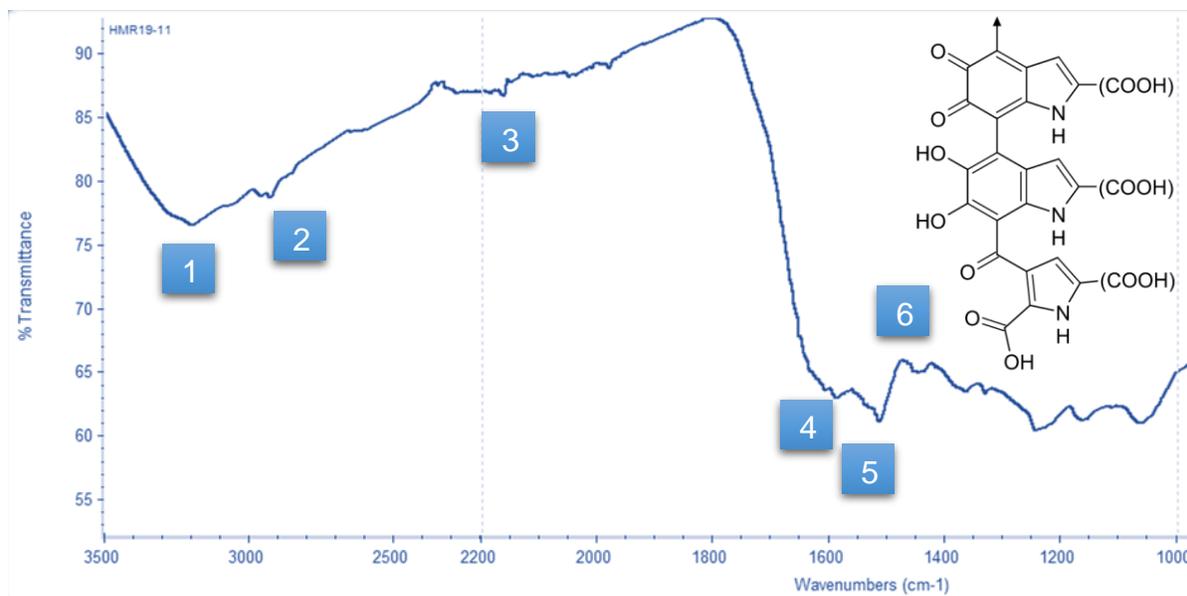


Figura 16. Espectro IR de melanina materia prima y fragmento de la estructura química de la melanina. [Imagen tomada y adaptada de la referencia 69]

Este espectro reveló contar con 6 bandas de absorción características de la melanina:

1. 3200 cm^{-1} . La banda ancha corresponde a la extensión N-H y O-H.
2. 2920 cm^{-1} . Señal correspondiente al enlace C-H.
3. 2385 cm^{-1} . Puede atribuirse a la amina protonada del DHICA, no siempre aparece.
4. 1595 cm^{-1} . Señal atribuida al enlace C=O del COOH.
5. 1500 cm^{-1} . Atribuida a enlaces de grupos aromáticos C=C o COO⁻.
6. 1450 cm^{-1} . Atribuida al enlace C-H. [12]

8.2. Método analítico por espectrofotometría UV para cuantificar melanina

A partir de las concentraciones propuestas desde 5 hasta 25 $\mu\text{g/ml}$ en intervalos de 5 $\mu\text{g/ml}$, se obtuvieron las absorbancias mostradas en la Tabla 24 del Anexo 1, a partir de las cuales se graficó la curva de calibración mostrada en la misma sección en la Figura 20. Mediante estos resultados, fue posible determinar la ecuación que representa a la recta, siendo esta:

$$y=0.0304x-0.0269$$

Esta fórmula permitió su manipulación para la obtención de la fórmula:

$$x=\frac{y+0.0269}{0.0304}$$

Siendo “x” la concentración problema, y “y” la absorbancia obtenida.

8.2.1. Exactitud del método analítico por espectrofotometría UV para cuantificar melanina

Se realizaron 6 lecturas a 227 nm en un espectrofotómetro UV a concentraciones de melanina en NaOH 1N de 5 µg/ml y 25 µg/ml. Usando el despeje de la ecuación de la recta [$x=(y+0.0269)/0.0304$] fue posible conocer las concentraciones experimentales, las cuales sirvieron como referencia para conocer el porcentaje de recobro, usando la fórmula:

$$\%Recobro = \frac{Conc. Experimental}{Conc. Teórica} * 100$$

Con estos porcentajes, se obtuvieron los siguientes resultados (Anexo 1, Tabla 25):

- Media=100.1612
- Desv.Std.=3.4169
- C.V. %=3.4114
- I.C.= 0.94086271
- Lím. Sup.= 101.1020
- Lím. Inf.= 99.2203

8.2.1.1. Precisión del método analítico por espectrofotometría UV para cuantificar melanina

Se realizaron lecturas a 227 nm en un espectrofotómetro UV a una concentración de melanina en NaOH 1N de 15 µg/ml en dos diferentes días por sextuplicado. A las absorbancias obtenidas se les calculó la media, desviación estándar y el porcentaje de variación, obteniendo los resultados mostrados en el Anexo 1, en la Tabla 26.

8.2.1.2. Determinación del límite de cuantificación y detección

Usando las fórmulas para los límites de cuantificación y detección mostradas en la sección 7.2. *Método analítico por espectrofotometría UV para la cuantificación de la melanina*, se obtuvieron los siguientes valores (Anexo 1, Tabla 27):

- Límites de cuantificación: 18.2895 µg/ml.
- Límites de detección: 0.6036 µg/ml.

8.2.3 Medición de la concentración de nanopartículas de melanina

Para calcular la concentración de nanopartículas se realizó una dilución 1:100 a partir del lote obtenido de MNP's con NaOH, y se leyó su absorbancia a 227 nm. Los resultados de las absorbancias se usaron junto con la ecuación obtenida de la curva de calibración $[x=(y+0.0269)/0.0304]$ para calcular la cantidad de NPs obtenidas, sustituyendo en "y" la absorbancia obtenida, siendo "x" la concentración obtenida, y realizando los cálculos pertinentes para conocer la concentración real del lote usando el factor de dilución.

8.3. Obtención de nanopartículas de melanina (MNP's)

8.3.1. Optimización, concentración, lavado y recuperación

Para la producción de nanopartículas, se llevaron a cabo distintos métodos de separación para su concentración y recuperación, así como distintos tipos de lavados para su optimización.

En los lotes 1, 2 y 3 se usaron membranas de nylon de 0.22 μ m de VWR® para un volumen de 10 ml de la solución de melanina en NaOH a concentración de 1mg/mL, utilizando un método de filtrado inverso en el cual los lotes se hicieron pasar por las membranas para posteriormente ser regresadas por el mismo filtro con agua destilada. Esta agua contendría las nanopartículas en suspensión, confirmando esto haciendo una medición en el Zetasizer® con las condiciones mencionadas en la metodología, realizando la lectura con 1ml de la suspensión directamente en el aparato.

Para los lotes 4 y 5 se hizo un escalamiento usando 100 mL de la misma solución de 1mg/ml de melanina en NaOH 1N, usando las mismas cantidades de PVA al 1% en HCl a 0.25 N obteniendo las NP's de melanina sin necesidad de utilizar los filtros de nylon, reiterando la presencia de estas con una lectura a una dilución de 1:10 en el Zetasizer®. Para este caso en el que no pasaron por el proceso de filtrado inverso, se optó por realizar lavados para retirar el NaOH. Las NP's se centrifugaron a 7,000 rpm por 15 minutos, retirando el sobrenadante y agregando 5 mL de agua destilada, y resuspendiendo el pellet; repitiendo 2 veces más, se obtuvieron las NP's suspendidas en agua.

En materia de los lotes 6 y 7, se realizó un escalamiento a 500 ml de la solución de 1mg/ml de melanina en NaOH 1N, con mismas cantidades de disolvente y el mismo porcentaje de tensoactivo; después del proceso de la obtención de la emulsión W/O/W y la evaporación del disolvente, estos dos últimos lotes no necesitaron ningún otro método de separación, ya que se encontraban dispersas en el líquido que lo contenía, confirmando esto por los resultados obtenidos en el Z-sizer Nano-2590, utilizando para su medición una dilución 1:10 de las nanopartículas en agua destilada. Sin embargo, para retirar los residuos de NaOH se hicieron lavados que consistieron en centrifugar las nanopartículas a 7,000 rpm por 15 minutos; terminando este tiempo se desechó el sobrenadante y el pellet obtenido fue

resuspendido con 10 ml de agua destilada, repitiendo este proceso 3 veces más. Terminado el proceso de lavado, se procedió a calentar a 70°C hasta evaporar la mayor cantidad de agua posible, siendo el resultante vertido en un papel filtro dentro de una caja de Petri y posteriormente introducido dentro de una estufa a 40°C por una hora, obteniendo así un polvo color café fácilmente resuspendible en agua para reafirmar su tamaño nanométrico y ser utilizado con fines prácticos.

8.3.2. Caracterización de nanopartículas de melanina

8.3.2.1. Tamaño de partícula

Se realizaron 7 lotes distintos bajo el método de doble emulsión-evaporación de disolventes utilizando los diferentes procesos de separación anteriormente mencionados para conseguir nanopartículas de melanina en todos los casos.

Para su medición, se requirió de 1ml de la suspensión de los lotes 1, 2 y 3 para ser introducidos dentro del analizador de tamaño de partícula, mientras que para los lotes del 4 al 7 fue necesaria 1ml de una dilución de la MNP's en agua destilada de 1:10; todos los lotes fueron medidos en una celda desechable bajo las condiciones propuestas en la metodología (índice de refracción del material 1.45; dispersante: agua; índice de refracción del dispersante (agua): 1.33; tiempo de equilibrio: 120 s; resolución: 16 lecturas por triplicado y temperatura: 25°C).

La distribución del tamaño de partícula de la Figura 17 muestra que dentro de los lotes de nanopartículas existen dos picos, representando el primero al 97.75±2.45% de la población con un tamaño de 275.33±83.62 nm, y un segundo al restante 2.25±2.44% con un tamaño de partícula de 3938.5±2443.74nm, resaltando que en el lote 2 y 6 se obtuvo un porcentaje de 100% de MNP's.

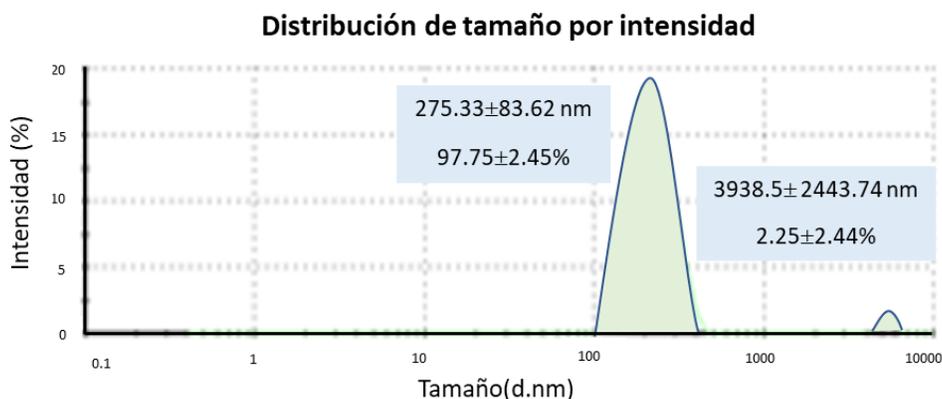


Figura 17. Distribución del tamaño de partícula del lote 7 de NP's de melanina obtenidas por el método de doble emulsión-evaporación de disolvente.

8.3.2.2. Potencial Z

Para todos los lotes producidos, se tomó el mililitro de muestra utilizado para cada caso descrito anteriormente y fue vertido dentro de una celda capilar plegada desechable con diodos, haciendo una lectura bajo los criterios propuestos en la metodología.

Empleando este método, se observó un potencial Z negativo que oscilaba entre los -16 y -24 mV aproximadamente.

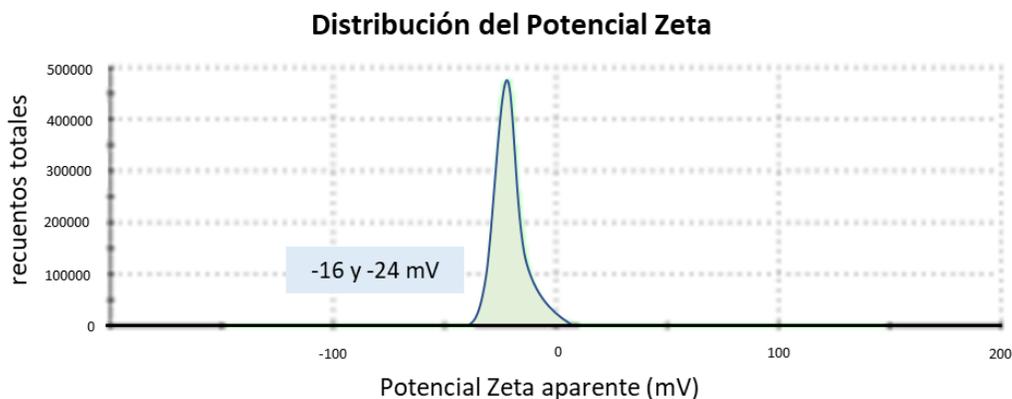


Figura 18. Distribución del potencial Z del lote 4 de NP's de melanina obtenidas por el método de doble emulsión-evaporación de disolvente.

8.4 Obtención de las formulaciones cosméticas para las MNP's

8.4.1. Establecimiento de las formas cosméticas bajo el enfoque QbD

8.4.1.1. Perfil de Producto Objetivo (TPP)

Se elaboró un Perfil de Producto Objetivo (TPP) que aplica para el desarrollo de protectores solares con nanopartículas de melanina con base en la bibliografía aplicable [1, 14, 28- 30] obteniendo los resultados en la Tabla 13.

Tabla 13. Perfil de producto objetivo para protectores solares con nanopartículas de melanina.

En relación con	Parámetro del perfil	Objetivo	Anotaciones Justificación/Criticidad
Activo cosmético	Partículas de melanina.	Ofrecer un efecto fotoprotector.	Usar melanina recombinante con mayor área superficial para ofrecer un efecto fotoprotector.
Forma cosmética	Emulsión.	Contener las nanopartículas en un medio estable que pueda aplicarse sobre la piel.	Forma cosmética mejor aceptada para protectores solares; contiene tensoactivos para estabilizar a las MNP's.
	Gel termosensible.	Contener las nanopartículas en un medio estable que pueda aplicarse sobre la piel.	Solidifica a temperatura corporal, permitiendo una mejor distribución.
	Aceite fluido.	Contener las nanopartículas en un medio estable que pueda aplicarse sobre la piel.	A prueba de agua; contiene tensoactivos para estabilizar a las MNP's.
Vía de administración	Cutánea.	Proveer a la piel protección extra frente a los rayos solares.	Uso externo, cumpliendo con la normativa vigente sobre productos cosméticos.
Indicación	Exposición solar prolongada.	Bloquear la radiación solar durante su exposición sobre la piel.	Evita las quemaduras, enrojecimiento y otras afecciones en la piel provocadas por el sol.
	Uso diario.	Ofrecer una protección extra ante la radiación solar además de los mecanismos intrínsecos en la piel.	Evita efectos a largo plazo en la piel, como manchas o melanomas.
Indicación y régimen de aplicación	Posterior a la exposición con el agua.	Renovar la capa del producto después de haber tenido contacto con el agua.	Reaplicación del producto que el agua haya podido quitar de la piel.

	4 horas después de su aplicación.	Renovar la capa del producto después del contacto con agentes físicos externos.	Reaplicación del producto después de la sudoración, cambios de temperatura, aseo personal, rozamientos, cambios de ropa, etc.
--	-----------------------------------	---	---

Utilizando esta tabla, se establecieron las características de los productos a elaborar, tales como el activo cosmético, que en este caso son las MNP's, las formulaciones candidatas que actuarán como vehículo del activo, vía de administración, que sería cutánea por mera legislación [30], indicaciones de uso y de aplicación.

8.4.1.2. Perfil de Calidad del Producto Objetivo (QTPP)

Se elaboró un Perfil de Calidad de Producto Objetivo (QTPP) que aplica para el desarrollo de protectores solares con nanopartículas de melanina con base en la bibliografía aplicable [1, 14, 28- 30] obteniendo los resultados en la Tabla 14.

Tabla 14. Perfil de Calidad de Producto Objetivo (QTPP) para protectores solares con nanopartículas de melanina.

En relación con	Parámetro del perfil (QA)	Objetivo/ Especificación	Justificación	¿Es un CQA?
Atributos físicos	Apariencia.	Proporcionar un producto visiblemente aceptable.	Obtención de un producto homogéneo, con buena presentación, consistencia.	Sí.
	Olor.	Presentar un aroma agradable para el consumidor.	Mejor aceptabilidad al colocar un aroma agradable.	No.
	Color.	Proporcionar un producto visiblemente aceptable, que no ensucie ni influya con el color natural de la piel.	No provocar manchas en la ropa, intervenciones en el color natural de la piel, ni coloraciones no homogéneas sobre la misma.	No.

	Densidad (gravedad específica).	Dar conocimiento sobre la cantidad de excipientes utilizados en las formulaciones.	Obtención de una densidad optima que permita contener las MNP's.	No.
	Estabilidad física.	Conocer el tiempo en el que el producto permanezca en un estado físico óptimo de uso.	Permite conocer el tiempo de separación de fases, cambios de apariencia, aglomeración, enranciamiento, etc.	Sí.
Atributos Químicos	pH.	Homologar el pH de las formulaciones con el de la piel.	Evita el desbalance del pH, así como el desarrollo de afecciones cutáneas tales como dermatitis, rosácea o prurito.	Sí
	Estabilidad química	Conocer las interacciones que hay entre los mismos excipientes de las formulaciones, o en conjunto con las MNP's.	Permite prevenir cambios en las formulaciones, evitando las reacciones químicas que pudiera haber entre las materias primas.	Sí.
Atributos fisicoquímicos/ biofarmacéuticos	Toxicidad	Conocer las dosis que pudieran causar afecciones en el organismo.	Evita intoxicaciones provocadas por el mal uso de los productos.	Sí.
	Viscosidad	Mejorar la aplicación de los productos; en el caso del gel termosensible, permitir que este tenga un cambio de viscosidad a temperatura corporal.	Permite una mejora en la aplicación y distribución de las MNP's sobre la piel.	Sí.
	Carga eléctrica	Compatibilizar las cargas de las MNP's con las formulaciones propuestas.	Obtención de una mayor estabilidad.	Sí.

Bajo este enfoque, se obtuvo que la apariencia, la estabilidad física, el pH, la estabilidad química, la toxicidad, la viscosidad y la carga eléctrica son Atributos

Críticos de Calidad, ya que son de gran importancia para que el producto terminado tenga el acabado que se busca para cumplir sus funciones sobre su uso en la piel.

8.4.1.3. Propuesta de formulación y materiales

A partir de bibliografía pertinente para el caso de excipientes utilizados en formulaciones cosméticas, además del uso del programa computacional el *HLB Computagraph* para el caso de la emulsión, se propusieron los excipientes y porcentajes correspondientes, además de los posibles materiales que pudieran contener las formas cosméticas mostrados en las Tablas 15-17, de emulsión, gel termosensible y aceite fluido, respectivamente.

Tabla 15. Propuesta de formulación y materiales aplicables para emulsión cosmética (loción) que contenga nanopartículas de melanina. [29,57]

Componente	Material	Justificación / Función en la fórmula	Porcentaje en la fórmula
Activo cosmético	Nanopartículas de melanina	Estudios han demostrado que son capaces de ofrecer una protección ante radioterapia, proponiendo esta característica para su uso como protector solar.	1%
	Excipientes		
	Monoestearato de glicerilo	Emoliente	1%
	Alcohol estearílico	Agente emulsionante y solubilizante	1%
	Cera de abejas	Agente endurecedor	0.5%
	Goma xantana	Agente gelificante	0.1%
	Aceite mineral	Emoliente, lubricante	5%
	Propilenglicol	Antimicrobiano, humectante, estabilizador.	5%
	Glicerina	Humectante y emoliente	5%
	Metilparabeno	Antimicrobiano	0.10%
	Propilparabeno	Antimicrobiano	0.05%
	Emulsificantes (Span [®] 80 y Tween [®] 80)	Formadores de emulsión	5% (3.2% y 1.8%, respectivamente)
	Miristato de isopropilo	Emoliente	1.50%
	Alantoína	Cicatrizante	0.3%
	DMDM hidantoina	Conservador	0.6%
	Agua	Diluyente	c.b.p.

Materiales del empaque	Polipropileno	Resistente a alcoholes y disolventes orgánicos suaves, pared translúcida, estable entre los - 80° y los 121 °C. No genera interacciones con las formulaciones. Degradación a tiempos prolongados.
	Válvula de <i>spray</i>	Facilita la aplicación de la formulación.

Tabla 16. Propuesta de formulación y materiales aplicables para gel termosensible que contenga nanopartículas de melanina. [29,57]

Componente	Material	Justificación / Función en la fórmula	Porcentaje en la fórmula
Activo cosmético	Nanopartículas de melanina	Estudios han demostrado que son capaces de ofrecer una protección ante radioterapia, proponiendo esta característica para su uso como protector solar.	1%
Excipientes	Pluronic® F127 (Ploxamero 407)	Estudios demuestran que forma geles a distintas temperaturas dependiendo del porcentaje utilizado.	20%
	Glicerina	Humectante	3%
	Extracto de <i>Aloe vera</i>	Acondicionador de piel	3%
	Propilenglicol	Humectante	2%
	DMDM hidantoina	Conservador	0.60%
	Cloruro de sodio	Estabilizante del polisacárido formador de gel	5%
	Alantoína	Cicatrizante	0.30%
	EDTA	Quelante	0.10%
	Ácido cítrico	Regulador de pH	c.s.
Agua	Disolvente	c.b.p.	
Materiales del empaque	Polipropileno	Resistente a alcoholes y disolventes orgánicos	

		suaves, pared translúcida, estable entre los - 80° y los 121 °C. No genera interacciones con las formulaciones. Degradación a tiempos prolongados.
	Dispensador dosificador	Facilita la aplicación de la formulación.

Tabla 17. Propuesta de formulación y materiales aplicables para aceite fluido que contenga nanopartículas de melanina. [29,57]

Componente	Material	Justificación / Función en la fórmula	Porcentaje en la fórmula
Activo cosmético	Nanopartículas de melanina	Estudios han demostrado que son capaces de ofrecer una protección ante radioterapia, proponiendo esta característica para su uso como protector solar.	1%
Excipientes	Aceite de germen de trigo	Antioxidante	2%
	Span® 60	Estabilizante de MNP's	1%
	Ácido oleico	Potenciador de la penetración en formulaciones transdérmicas.	2%
	Miristrato de isopropilo	Emoliente	5%
	Vitamina E	Antioxidante	0.2%
	Aceite mineral	Emoliente, vehículo oleaginoso	c.b.p.
Materiales del empaque	Polipropileno color ambar	Resistente a alcoholes y disolventes orgánicos suaves, estable entre los - 80° y los 121 °C. No genera interacciones con las formulaciones. Degradación a tiempos prolongados.	
	Válvula de <i>spray</i> .	Facilita la aplicación de la formulación.	

8.4.1.4. Análisis de riesgos

Bajo el implemento del método de las 5 M's (maquinaria, mano de obra, método, medio ambiente y materia prima) y en consideración con el QTTP, se realizó un análisis de riesgos a través de un diagrama de Ishikawa para analizar los elementos que representen un mayor riesgo. En la Figura 19 se observa en color azul todos los posibles problemas que pudieran afectar a la realización de los productos durante la realización de la parte experimental, mientras que en color rojo se resaltan los problemas de mayor peso sobre la elaboración de los protectores solares, esto con base en la información que se tenía al momento de reunir los elementos a partir de los cuales se realizaría la metodología.

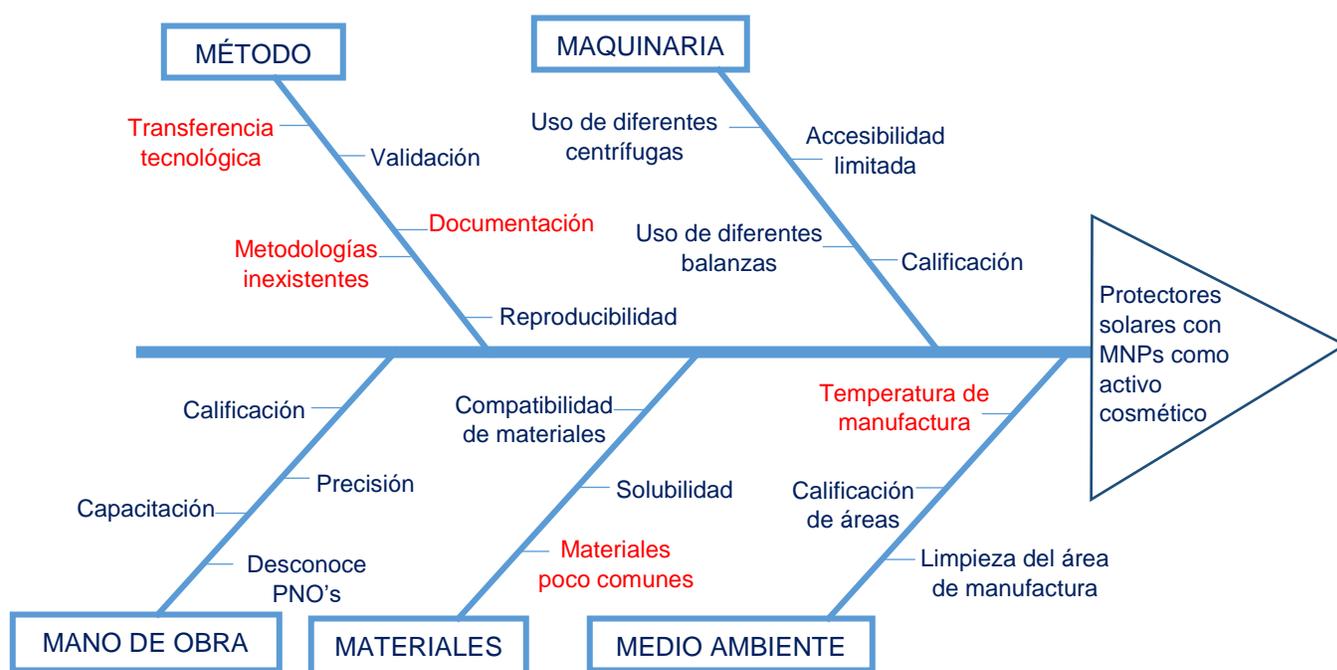


Figura 19. Diagrama de Ishikawa para protectores solares con nanopartículas de melanina como activo cosmético.

8.4.1.5. Identificación de puntos críticos

A partir del Diagrama de Ishikawa anterior, se determinó la estimación de riesgos mediante el análisis de Atributos Críticos de los Materiales (CMA's) (Tablas 19- 21) y Parámetros Críticos de Proceso (CPP's) (Tablas 22-24), identificando el nivel de riesgo que supone con la escala mostrada en la Tabla 18.

Tabla 18. Escala del nivel de riesgo que suponen las variables propuestas para los Atributos Críticos de los Materiales (CMA's) y Parámetros Críticos de Proceso (CPP's)

Nivel de Riesgo		¿Requiere investigación?
Bajo	B	No se requiere
Medio	M	Puede requerirse
Alto	A	Se requiere

Con base en los resultados obtenidos acerca del factor de riesgo que supone cada material y si afecta o no a los atributos de calidad descritos en Perfil de Calidad de Producto Objetivo, se muestran en las tablas en color rojo los atributos críticos de los materiales que pueden presentar un gran compromiso al momento de llevar a cabo las formulaciones, siendo a estos a los que se les diera un mayor enfoque e importancia, de los cual requeriría una investigación extra con el fin de obtener un producto con menores probabilidades de falla. En color amarillo aparecen los materiales que podrían llegar a afectar al producto, pero en menor medida que los anteriores; a éstos, se les hizo una búsqueda de información, pero pudo o no haber cambios dentro de la formulación final. Por último, de color verde, se encuentran los materiales en los que no se requirió mayor búsqueda de información.

Tabla 19. Atributos Críticos de los Materiales (CMA's) para formulación de la emulsión propuesta. [57]

Material	Factor de Riesgo	¿Afecta un CQA?	¿Cuál?	Nivel de Riesgo
Nanopartículas de melanina	Baja solubilidad	Sí	Apariencia, Estabilidad Física y Carga Eléctrica	A
Monoestearato de glicerilo	A temperaturas altas, aumenta su índice de acidez. Requiere cálculo de HLB. Aumenta la viscosidad final	Sí	Apariencia y Estabilidad Física	M
Alcohol estearílico	Requiere cálculo de HLB	Sí	Apariencia y Estabilidad Física	M
Cera de abejas	Requiere cálculo de HLB	Sí	Apariencia y Estabilidad Física	M
Goma xantana	Concentración menor a 1% p/v	Sí	Viscosidad	B

	pueden verse afectadas negativamente por temperaturas superiores a las ambientales			
Aceite mineral	Requiere cálculo de HLB	Sí	Apariencia y Estabilidad Física	M
Propilenglicol	Mínimamente irritante	No	N/A	B
Glicerina	Cristaliza a bajas temperaturas	No	N/A	B
Metilparabeno	La actividad antimicrobiana reduce en presencia de tensioactivos no iónicos, como el polisorbato 80.	Sí	Estabilidad Física y Química	A
Propilparabeno	Repercusiones toxicológicas	Sí	Toxicología	A
Emulsificantes (Span 80 y Tween 80)	Cantidades específicas para la formación de la emulsión	Sí	Apariencia y Estabilidad Física	A
Miristato de isopropilo	Requiere cálculo de HLB	Sí	Apariencia y Estabilidad Física	M
Alantoína	N/A	N/A	N/A	B
DMDM hidantoina	N/A	N/A	N/A	B
Agua	N/A	N/A	N/A	B
Polipropileno	Degradación prolongada	No	N/A	B
Válvula de spray	Producto demasiado viscoso	No	N/A	B

Tabla 20. Atributos Críticos de los Materiales (CMA's) para formulación del gel termosensible propuesta [57]

Material	Factor de Riesgo	¿Afecta un CQA?	¿Cuál?	Nivel de Riesgo
Nanopartículas de melanina	Baja solubilidad	Sí	Apariencia, Estabilidad Física y Carga Eléctrica	A
Pluronic® F127 (Ploxamero 407)	Solubilidad a temperaturas bajas. Baja resistencia mecánica y la rápida erosión	Sí	Apariencia, Viscosidad y Estabilidad Física	A
Glicerina	Cristaliza a bajas temperaturas	Sí	Apariencia	M
Extracto de <i>Aloe vera</i>	N/A	No	N/A	B
Propilenglicol	Mínimamente irritante	No	N/A	B
DMDM hidantoina	N/A	N/A	N/A	B
Cloruro de sodio	Reduce la temperatura de transición	Sí	Apariencia	B
Alantoína	N/A	N/A	N/A	B
EDTA	Uso de concentraciones bajas (0.005 and 0.1%)	Sí	Toxicidad	M
Ácido cítrico	N/A	N/A	N/A	B
Agua	N/A	N/A	N/A	B
Polipropileno	Degradación prolongada	No	N/A	B
Dispensador dosificador	Cambio de viscosidad	No	N/A	B

Tabla 21. Atributos Críticos de los Materiales (CMA's) para formulación del aceite fluido propuesta [57]

Material	Factor de Riesgo	¿Afecta un CQA?	¿Cuál?	Nivel de Riesgo
Nanopartículas de melanina	Baja solubilidad	Sí	Apariencia, Estabilidad Física y Carga Eléctrica	A
Aceite de germen de trigo	N/A	N/A	N/A	B
Span® 60	Solubilidad media en aceite mineral	Sí	Apariencia	M
Ácido oleico	Potenciador de penetración en formulaciones transdérmicas	Sí	Toxicidad	M
Miristato de isopropilo	Potenciador de penetración en formulaciones transdérmicas.	Sí	Toxicidad	A
Vitamina E	Tocoferoles pueden absorberse en plástico.	Sí	Estabilidad física y Estabilidad Química	A
Palmitato de cetilo	N/A	N/A	N/A	B
Aceite mineral	Oxidación en exposición al calor y la luz.	Sí	Estabilidad Química	B
Polipropileno color ambar	Absorción de vitamina E.	Sí	Estabilidad Física y Estabilidad Química	A
Válvula de spray.	Obstrucción de la formulación	No	N/A	B

8.4.2. Selección de excipientes

A partir de las tablas obtenidas en los Atributos Críticos de los Materiales (CMA's), se realizó la elección de excipientes, disminuyendo los porcentajes de los excipientes que afectaban los atributos críticos o cambiándolos por otros que cumplieran una función similar. La elección de excipientes cambió de la original mostrada en la propuesta de ingredientes y materiales, a lo mostrado en la Tabla 22, donde se observan los ingredientes presentados con anterioridad, pero ahora ajustados a lo que la bibliografía nos sugiere para no afectar a los Atributos Críticos

de Calidad de los productos. La columna que muestra el porcentaje final muestra la concentración seleccionada como la mejor dentro de estándares bibliográficos descritos en términos de formulación. [66]

Tabla 22. Selección de excipientes para las formulaciones de protectores solares que contienen MNP's como activo cosmético [12, 29, 57- 59]			
Formulación	Ingrediente/ Material	Anotaciones, observaciones y/o justificación	Porcentaje final
Emulsión (loción)	Nanopartículas de melanina	Por su baja toxicidad se propuso usar porcentajes mayores y menores para conocer el efecto fotoprotector.	0.1-10
	Monoestearato de glicerilo	Su uso se mantuvo al porcentaje indicado.	1
	Alcohol estearílico	Su uso se mantuvo al porcentaje indicado.	1
	Cera de abejas	Su uso se mantuvo al porcentaje indicado, dado que en porcentajes mayores podría conferirle a la formulación final una viscosidad mayor, dando como resultado una crema pesada y no una emulsión.	0.5
	Goma xantana	Su uso se mantuvo al porcentaje indicado, dado que en porcentajes mayores podría conferirle a la formulación final una viscosidad mayor, dando como resultado una crema pesada y no una emulsión.	0.1
	Aceite mineral	Su uso se mantuvo en el porcentaje indicado.	5
	Propilenglicol	Su uso se mantuvo en el porcentaje indicado.	5
	Glicerina	Su uso se mantuvo en el porcentaje indicado.	5
	Metilparabeno	Dados los informes de eventos adversos a cosméticos, el uso de este ingrediente se restringió a lo estipulado en la normatividad vigente en México.	0
	Propilparabeno	Dados los informes de eventos adversos a cosméticos, el uso de este ingrediente se restringió a lo estipulado en la normatividad vigente en México.	0

Gel termosensible	Span® 80	Su uso se mantuvo en el porcentaje indicado según el Software <i>HLB Computagraph®</i>	3.2
	Tween® 80	Su uso se mantuvo en el porcentaje indicado según el Software <i>HLB Computagraph®</i>	1.8
	Miristato de isopropilo	Su uso se mantuvo en el porcentaje indicado.	1.5
	Alantoína	Su uso se mantuvo en el porcentaje indicado.	0.3
	DMDM hidantoina	Su uso se mantuvo en el porcentaje indicado.	0.6
	Agua	El porcentaje varía dependiendo de la concentración de MNP's	c.b.p.
	Polipropileno	Se acepta el uso de este material como envase primario. Debido a la posible oxidación en exposición al calor y la luz del aceite mineral, se propone el uso de polipropileno opaco.	N/A
	Válvula de spray	Se acepta el uso de este material debido a la fluidez del producto final.	N/A
	Nanopartículas de melanina	Por su baja toxicidad se propuso usar porcentajes mayores y menores para conocer el efecto fotoprotector.	0.1-10
	Pluronic® F127 (Poloxámero 407)	Experimentalmente, los resultados obtenidos con la concentración propuesta en la literatura no producían cambios significativos a cambios de temperatura, por lo que se realizaron diferentes pruebas para obtener el resultado deseado.	13
	Glicerina	Su uso se mantuvo en el porcentaje indicado.	3
	Extracto de <i>Aloe vera</i>	Su uso se mantuvo en el porcentaje indicado.	3
	Propilenglicol	Su uso se mantuvo en el porcentaje indicado.	2
	DMDM hidantoina	Su uso se mantuvo en el porcentaje indicado.	0.60
	Cloruro de sodio	Se restringió el uso como estabilizante del polisacárido formador de gel dado que, según la literatura, para este tipo de polisacárido no era funcional.	0
Alantoína	Su uso se mantuvo en el porcentaje indicado.	0.30	
EDTA	Su uso se mantuvo en el porcentaje indicado.	0.10	

	Ácido cítrico	El pH final del producto fue el requerido para su uso sobre la piel, por lo que no fue necesario su uso.	c.s.
	Agua	El porcentaje varía dependiendo de la concentración de MNP's	c.b.p.
	Polipropileno	Se acepta el uso de este material como envase primario.	N/A
	Dispensador dosificador	Se acepta el uso de este material debido a la fluidez del producto final.	N/A
Aceite fluido	Nanopartículas de melanina	Por su baja toxicidad se propuso usar porcentajes mayores y menores para conocer el efecto fotoprotector.	0.1-10
	Aceite de germen de trigo	Su uso se mantuvo en el porcentaje indicado.	2
	Span® 60	Por su sedimentación en el medio de dilución, se propuso cambiar este tensoactivo de la misma naturaleza lipofílica (Span® 80), conservado el porcentaje propuesto.	1
	Ácido oleico	Debido a que es un potenciador de penetración en formulaciones transdérmicas, se declinó su uso.	0
	Miristato de isopropilo	Su uso se mantuvo por sus propiedades tecnológicas, sin embargo, por ser un potenciador de penetración en formulaciones transdérmicas, su porcentaje se redujo	2
	Vitamina E	Su uso se mantuvo en el porcentaje indicado.	0.2
	Aceite mineral	El porcentaje varía dependiendo de la concentración de MNP's	c.b.p.
	Polipropileno color ambar	Se acepta el uso de este material como envase primario. Debido a la posible oxidación en exposición al calor y la luz del aceite mineral, se propone el uso de polipropileno opaco.	N/A

	Válvula de spray.	Se acepta el uso de este material debido a la fluidez del producto final.	N/A
--	-------------------	---	-----

8.4.4. Caracterización de las formulaciones-medición de CQA's

Se realizó un estudio de estabilidad de las formulaciones durante 4 semanas a cada una de las formulaciones, las cuales permanecieron en un envase de polipropileno de 50 ml a 40°C durante su tiempo de estudio. Cada semana fueron analizadas, en condiciones de 22°C, obteniendo los resultados de la Tabla 23, en la cual se aprecian los cambios que las formulaciones sufrieron a través de las semanas, iniciando con las características de las mismas en la fecha del 16 de julio, partiendo como punto base para notar cambios en la apariencia, la viscosidad, el pH, la densidad, olor y color, como atributos críticos de calidad de los productos. Para los atributos cuantificables como la viscosidad, pH y densidad, se midieron los valores iniciales; el pH permaneció tal cual era al momento de la producción del cosmético, pero la densidad y la viscosidad comenzaron a cambiar debido separación de fases, en el caso de las emulsiones, y cambios de temperatura en el caso del gel.

Tabla 23. Estudio de estabilidad de las formulaciones candidatas para su uso como vehículo de MNP's.							
Fecha de análisis	Tipo de formulación	Atributos críticos de calidad (CQA's)					
		Apariencia	Viscosidad	pH	Densidad	Olor	Color
16/Julio/2020	Emulsión	-	14,720 cP	5.72	0.8979 g/ml	-	-
	Gel termosensible	-	(Figura 20)	5.68	0.7745 g/ml	-	-
	Aceite fluido	-	14,000	N/A	0.8847 g/ml	-	-
24/Julio/2020	Emulsión	-	-	-	-	-	-
	Gel termosensible	+	+	-	-	-	-
	Aceite fluido	-	-	N/A	-	-	-
30/Julio/2020	Emulsión	+	-	-	+	-	-
	Gel termosensible	+	+	-	-	-	-
	Aceite fluido	+	-	N/A	-	+	-
07/Agosto/2020	Emulsión	+	-	-	+	-	+

	Gel termosensible	+	+	-	-	-	-
	Aceite fluido	+	-	N/A	-	+	-
19/Agosto/2020	Emulsión	+	+	-	+	-	+
	Gel termosensible	+	+	-	-	-	-
	Aceite fluido	+	-	N/A	+	+	+

("-"significa ausencia de alteraciones; "+" significa presencia de alteraciones)

8.4.4.1. Temperatura sol-gel

En el caso del gel termosensible, se llevó a cabo la prueba sol-gel, en la cual el gel se sometió a temperaturas de 12, 15, 20, 25, 30, 35, 37, 40 y 50°C con el mecanismo montado como lo muestra la Figura 13 para la medición de la relación temperatura-viscosidad del gel. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 20, donde se aprecia que a medida que la temperatura del mecanismo aumentaba, la densidad de igual manera lo hacía. A temperatura ambiente (25° C) puede permanecer a una viscosidad de 135.6 cP, siendo líquido y fluido, pero al estar en contacto con la piel (37° C) se vuelve un gel con menos fluidez y mayor cobertura al aplicarse de forma cutánea.

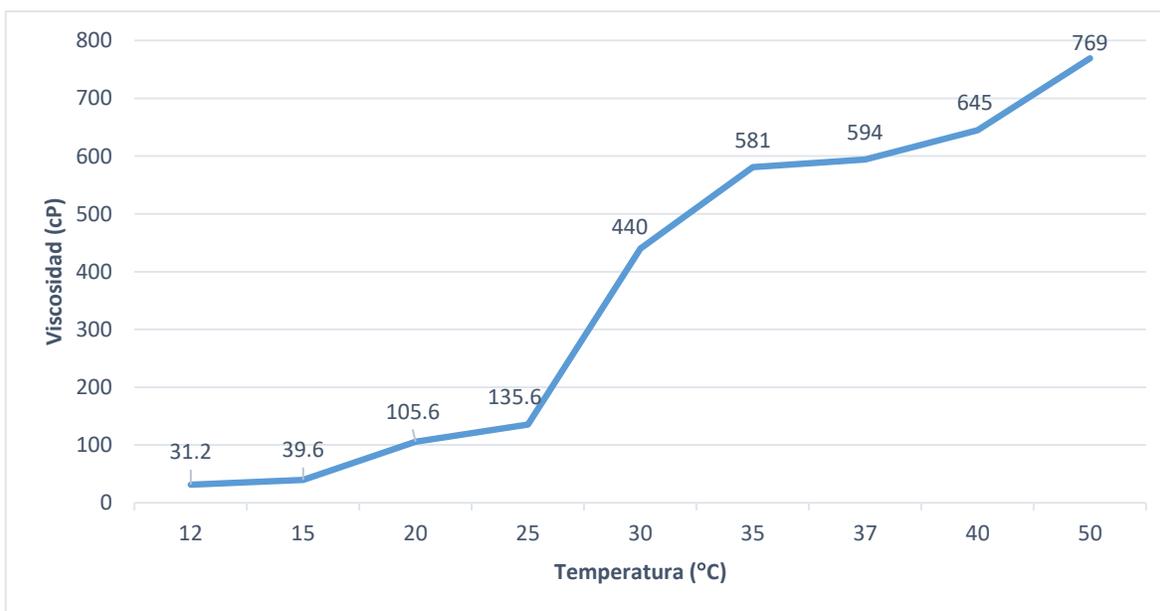


Figura 20. Relación temperatura sol-gel de gel termosensible

8.5. Determinación *in vitro* del FPS mediante el método de Mansur

Para la determinación del Factor de Protección Solar conferido por las diferentes formulaciones propuestas y las nanopartículas en suspensión, se utilizó el simulador *in silico* de FPS de Basf® para tomar como referencia el FPS teórico del control

positivo, siendo esta la benzofenona-4. El *software* indicó que este filtro a una dosis de 3 mg/cm² a una concentración del 10% en la formulación, se obtiene un FPS de 16.2, similar al especificado en la ISO 24443 [36] que es de 16.0. A partir de este resultado, se optó por analizar una muestra de benzofenona-4 al 10% en agua con el método propuesto por Mansur [39], obteniendo como resultado un FPS de 4.1654, siendo este resultado una vertiente para proponer un ajuste, puesto que ambos resultados, tanto teórico como experimental divergían; para esta cuestión, se toma en cuenta la normatividad referente a protectores solares, ya que el resultado teórico entra en la definición tal cual de “protector solar” con un FPS >6, mientras que el experimental no. Se optó por tomar el resultado del FPS de 16.2 como referencia al momento de calcular los FPS problema, obteniendo como resultados los mostrados en la Tabla 24.

En el caso de las emulsiones y el gel, las formulaciones que contenían un porcentaje de MNP's mayor al 1% comenzaron a tener un FPS mayor a 6, pudiéndose considerar protectores solares como lo indica la normativa vigente [30]. Para el caso de la formulación en aceite, se observa que el producto por sí solo tiene un efecto fotoprotector, esto porque tiene un valor mayor a 6 incluso cuando existe un nulo porcentaje de MNP's dentro de la formulación, lo que indica que los excipientes utilizados para esta formulación tienen un efecto protector contra radiación tal como la bibliografía indica [25] y que además, va en aumento junto con las MNP's que le otorgan el mismo efecto deseado.

Tabla 24. Factor de protección solar de protectores solares con MNP's como activo cosmético.

Concentración de MNP's	FPS de las formulaciones		
	Loción	Gel	Aceite
0.0%	4.3983	3.6733	7.6592
0.1%	5.1314	4.4064	8.3923
1.0%	8.3019	7.5770	11.5628
10.0%	23.1350	22.4100	26.3959

9. DISCUSIÓN.

En el trabajo de investigación aquí descrito, se utilizó melanina preformada de origen recombinante con la finalidad de aprovechar las características propias de esta para generar nanopartículas que, una vez obtenidas, puedan ser utilizadas no solo en el área cosmética, sino también en el área farmacéutica y médica.

Debido a la poca información de la melanina de origen recombinante, fue necesaria una caracterización por espectrofotometría UV-Vis y espectroscopia IR, con la finalidad de confirmar su identidad. Los resultados obtenidos fueron comparados con los de referencia, reafirmando la identificación de este polímero. En el caso de la espectrofotometría UV-Vis, se obtuvo un espectro que coincidía con la referencia, además de presentar una longitud de máxima absorción ($\lambda_{\text{máx}}$) a 227 nm; para el caso de la espectroscopia IR, se observaron bandas propias de los grupos funcionales de la melanina, tales como CH, NH, C=C, COO⁻, y OH. [12]

El método de espectrofotometría UV-Vis anterior junto con la realización de una curva de calibración, la determinación de la exactitud y la precisión del método también fueron utilizados con la finalidad de cuantificar melanina materia prima, así como también el de las MNP's. Resulta útil conocer los parámetros obtenidos bajo esta metodología, ya que al obtener las nanopartículas en suspensión es necesario conocer la concentración de ellas en cierto volumen y así tomar la cantidad requerida de éstas para el uso que se le vaya a dar.

Debido a la baja solubilidad de la melanina, sobre todo en disolventes orgánicos y/o ácidos, se optó por obtener las nanopartículas bajo el enfoque de doble emulsión- evaporación de disolventes propuesto por Casarrubias [12], ajustando el método en el lavado, recuperación y concentración de las MNP's, puesto que bajo la metodología que se proponía se obtenía un rendimiento casi nulo de la suspensión final de nanopartículas. Por lo anterior se recurrió a membranas de nylon de 0.22 μ m de VWR®, a un filtrado inverso y a la centrifugación seguido de un calentamiento, siendo este último el más eficaz para la obtención de las MNP's según los resultados obtenidos del método espectrofotométrico UV.

Para analizar el tamaño de partícula de los lotes realizados se utilizó una dilución 1:10 de la suspensión de MNP's en agua destilada. La distribución obtenida muestra que dentro de la mayoría de los lotes de nanopartículas existen dos picos, representando el primero al 97.75 \pm 2.45% de la población con un tamaño de partícula de 275.33 \pm 83.62 nm, y un segundo pico representante del porcentaje restante de 2.25 \pm 2.44% con un tamaño de partícula de 3938.5 \pm 2443.74nm, es decir que este último pico corresponde a partículas que oscilan entre los 1494.76 y 6382.24 nm, que son partículas muy grandes en comparación con las nanopartículas que se esperaba obtener. Al estar en un porcentaje menor, pueden retirarse fácilmente con una filtración o con la sedimentación. Empleando la misma

dilución, se observó un potencial Z negativo que oscilaba entre los -16 y -24 mV, aproximadamente. Es importante considerar el tamaño y la superficie de las partículas ya que son las propiedades de las NP's que pueden afectar la capacidad y el mecanismo de absorción de la piel. Desempeñan un papel crucial en la toxicidad de las NP's que puede estar relacionada con su superficie que interactúa con el medio biológico. Muchos informes sobre el efecto de la carga de NP's sobre la penetración cutánea son contradictorios, por ejemplo, se ha descrito mayor potencial de absorción cutánea de las emulsiones submicrónicas cargadas positivamente, y otros experimentos informan más penetración cutánea por nanocompuestos cargados negativamente, además de que existen distintos factores que de igual manera pueden afectar la penetración de las NP's como la polaridad y los vehículos que las transporten, entre otras. [60] Para el caso de los protectores solares, estos no deben tener la capacidad de penetrar la piel o que alguno de los ingredientes propuestos para las formulaciones tengan una entrada sistémica [28,30], por lo que sería de gran relevancia aunar en estudios de penetración de MNP's en la piel.

Se realizó un informe completo de Calidad por Diseño (QbD) con el cual fue posible conocer las mejores opciones para la manufactura de los vehículos que contendrían las MNP's. A partir de ello, se seleccionaron 3 formulaciones con bases y características tecnológicas distintas, siendo estas una emulsión en forma de loción como la forma cosmética mayormente aceptada por la población, un gel que al contacto con la piel cambiara su viscosidad y permitiera una mejor aplicación del producto, y un aceite fluido que por sus características lipofílicas permitiera repeler el agua en casos de uso en condiciones de playa. Para cada caso, se obtuvo información relevante que contribuiría a la mejora del producto; para el caso de la emulsión, se hizo especial énfasis en las cantidades de tensoactivos para que la emulsión pudiera formarse, para esto se recurrió a un método *in silico*, utilizando el programa *HLB Computagraph*[®] para conocer el HLB requerido de la formulación con respecto a los componentes propuestos. Los parabenos propuestos en esta formulación fueron retirados, ya que existe una discrepancia frente al uso de estos excipientes, además de que en las nuevas tendencias en la cosmética se proponen y se aceptan con mayor facilidad productos que no contienen este tipo de materiales. La DMDM hidantoina como conservador fue una opción utilizada para cumplir con la misma función que los parabenos cumplían en esta formulación [58]; para el gel termosensible se enfatizó en el uso del Pluronic[®] F127 (Poloxámero 407), el cuál era el polímero base principal para la formación del gel. Según la literatura, se podría obtener un cambio de viscosidad a concentraciones de 20% en las formulaciones [59], sin embargo, de forma experimental el gel no presentaba cambios a diferentes variaciones de temperatura, siendo esto influido por la temperatura ambiental de manufactura como lo mostrado en la Figura 19, en el Diagrama de Ishikawa para protectores solares con nanopartículas de melanina como activo cosmético, en el apartado de medio ambiente. Para resolver este problema, se optó por dejar en reposo el polímero a 12°C por 30 minutos, y una vez

transcurrido este tiempo, continuar con la manufactura. Se realizaron varias pruebas a distintas concentraciones de polímero, optando por usar un 13% de este, ya que a concentraciones mayores o menores no existía un cambio de viscosidad respecto a los cambios de temperatura aplicados; el aceite fluido contenía ingredientes que podrían influir en la penetración de la piel, por lo que fueron disminuidos en porcentaje o retirados de la formulación. Se usó aceite mineral como diluyente para el resto de los componentes lipofílicos, ya que es un ingrediente que según la literatura, puede ser utilizado en porcentajes altos para los casos de las formas cosméticas [57]; el diagrama de Ishikawa de la Figura 19 también muestra que el reto más grande al momento de la formulación fue la transferencia tecnológica y las metodologías inexistentes para la obtención de la MNP's, ya que existían vacíos argumentales en su manufactura, repercutiendo en la obtención y rendimiento de las mismas.

Para la caracterización de las formulaciones, se llevó a cabo un estudio de estabilidad como lo propuesto en la Norma de Buenas Prácticas de Fabricación de Medicamentos [27] en la que se estipulan las condiciones de almacenamiento, el sistema contenedor, y los parámetros a evaluar. Con base en esto, las formulaciones permanecieron un mes en una estufa a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, como lo indica lo propuesto para la estabilidad acelerada [61] para aumentar la velocidad de degradación química o cambios en las propiedades físicas en condiciones de almacenamiento extremas. [62] Todas las formulaciones sufrieron cambios notables (Tabla 24): la emulsión resultó en la separación de sus fases a partir de la semana 2 presentando, por ende, cambios en su densidad, imposibilitando su medición, además del cambio de color; el gel termosensible presentó cambios en su apariencia desde los primeros minutos de la prueba dadas sus características tecnológicas, para lo cual se le fue aplicada la prueba de temperatura sol-gel, evaluando con esto los cambios de viscosidad en la formulación con relación a los cambios de temperatura a los que se sometió, concluyendo que esta forma cosmética aumenta su viscosidad cuando la temperatura aumenta, y viceversa, como lo muestra la Figura 20; el aceite fluido comenzó a presentar enranciamiento debido quizá a la oxidación por la exposición al calor y la luz del aceite mineral, o especialmente debido a que los tocoferoles pueden absorberse en plástico, siendo la vitamina E usada como antioxidante absorbida por el polipropileno del envase primario [57]. Al ocurrir estos cambios significativos en los primeros meses del estudio de estabilidad acelerada, se propone un periodo de reanálisis basado en los datos de estabilidad a largo plazo. [61]

El último aspecto para cumplir con los objetivos del proyecto, fue la evaluación del Factor de Protección Solar de las diferentes formulaciones con MNP's como activo cosmético. Se utilizó un método *in silico* para conocer el FPS teórico del control positivo de benzofenona-4 mediante el simulador de BASF®, obteniendo valores relativamente distintos a los resultados experimentales; se realizó un ajuste utilizando el valor arrojado por el software para obtener los valores de las

formulaciones con 0, 0.1, 1 y 10 % de MNP's debido a su baja toxicidad [12], obteniendo los resultados mostrados en la Tabla 25. Para que un protector solar sea considerado como tal, es necesario que este tenga un FPS >6 [30], y bajo esta condición, las formulaciones del aceite fluido cuentan con esta característica aún sin contener las MNP's debido a su naturaleza [63]. Para las emulsiones y geles, se presentó esta característica con la adición de MNP's por arriba de porcentajes del 1%, concluyendo que las MNP's tienen la capacidad de ofrecer protección solar, sin embargo, el ajuste realizado en esta metodología debería ser evaluado ya que existe una discrepancia al usar este método. Se propone utilizar otras metodologías con mejor estandarización como la propuesta en la ISO 24443. *Determination of sunscreen UVA photoprotection in vitro* [36], no obstante, para realizar esta metodología requiere de materiales poco comunes (Figura 19) o costosos que imposibilitan su reproducibilidad en cualquier laboratorio, a menos que se pueda acceder a estos.

10. CONCLUSIÓN GENERAL.

Se reprodujo el método de doble emulsión- evaporación de disolvente para la obtención de nanopartículas de melanina de origen recombinante de 275.33 ± 83.62 nm, con las cuales se realizaron 3 distintas formas cosméticas: una emulsión, un gel termosensible y un aceite fluido capaces de contener a las nanopartículas. A estas formulaciones se les calculó el Factor de Protección Solar con el Método *in vitro* de Mansur, el cuál arrojó como resultado valores por arriba de 6 para los casos en los que las nanopartículas se encontraban a concentraciones mayores al 1%, obteniendo como resultado distintos protectores solares según lo estipulado por la legislación nacional e internacional.

11. CONCLUSIONES PARTICULARES.

- La melanina de origen recombinante preformada demostró su identidad mediante su análisis en espectrofotometría UV y espectroscopía IR.
- El método espectrofotométrico UV permitió la cuantificación de la concentración tanto de la melanina preformada así como de las nanopartículas de melanina.
- Se obtuvieron nanopartículas de melanina con tallas de 275.33 ± 83.62 nm y potencial Z con valores de -16 y -24 mV.
- Se realizó el establecimiento de las formulaciones cosméticas, la selección y propuesta de excipientes, así como el análisis de riesgos e identificación de puntos críticos bajo el enfoque de Calidad por Diseño.
- Se obtuvo una emulsión, un gel termosensible y un aceite fluido con la capacidad de contener a las nanopartículas de melanina, las cuales fueron caracterizadas, con base en su apariencia, viscosidad, pH, densidad, olor y color.
- Se realizó la determinación del Factor de Protección Solar *in vitro* de las formulaciones propuestas mediante el método de Mansur ajustado, obteniendo valores de FPS mayores a 6 para los casos donde la concentración de MNP's era mayor al 1%, a excepción de la formulación de aceite fluido, puesto que los ingredientes que lo conforman poseen características que confieren protección solar por sí solos.

12. PERSPECTIVAS.

En el presente trabajo de investigación se ha demostrado la reproducción satisfactoria de nanopartículas de melanina a partir de melanina preformada de origen recombinante, sus propiedades físicas, químicas, y su integración en formas cosméticas con distintos tipos de polaridad, así como el Factor de Protección Solar proporcionado por las nanopartículas en sus diferentes medios; con todo ello, a continuación se describen otros factibles alcanzables, previendo ser considerados como investigaciones complementarias o extensiones del presente trabajo:

- ❖ Escalar el proceso de obtención de las nanopartículas de melanina descrito, con el fin de evaluar el comportamiento y límites permisibles de obtención utilizando las cantidades definidas a partir del procedimiento optimizado original.
- ❖ Escalar la producción de las formulaciones para obtener una vista más precisa sobre la apariencia de los protectores solares, realizando un perfil sensorial con panelistas capacitados, evaluando aspectos como la suavidad, película residual y sobre todo la aceptabilidad del producto por el color café que pueden presentar las formulaciones debido a la concentración de MNP's.
- ❖ Realizar estudios de permeabilidad de las nanopartículas que prueben su aplicación real, con pruebas *in vitro* e incluso *in vivo*, que demuestren que las formulaciones propuestas pueden desempeñar su papel como cosmético según la regulación nacional e internacional vigente.
- ❖ Relativo a su uso como protector solar, desarrollar un método con el cuál sea posible conocer el tiempo en que las nanopartículas de melanina se encuentran depositadas sobre la piel, dado que es un producto que exige ser usado constantemente. Con esto, se puede conocer el tiempo requerido para realizar una re aplicación del producto, así como la toxicología implicada con su uso constante.
- ❖ Considerando las propiedades de las nanopartículas de melanina, realizar estudios relacionados con sus posibles usos para las afecciones relacionadas con la piel como el caso del vitiligo, o casos extremos como el albinismo, intentando proporcionar una pigmentación en zonas donde la piel no tiene una producción normal de la melanina.
- ❖ Optimizar el método de Mansur sobre la obtención del Factor de Protección Solar, con el fin de economizar reactivos y mejorar los resultados obtenidos

a través del proceso, obteniendo así mejores y más certeros resultados. Una vez mejorado, se podría obtener un resultado real del FPS de las nanopartículas y reformular los productos, obteniendo un protector solar óptimo.

- ❖ Realizar estudios de estabilidad que impliquen el uso de técnicas analíticas de proceso, permitiendo así conocer el comportamiento de las nanopartículas y su interacción con los ingredientes propuestos en distintas formulaciones, permitiendo la mejora de los productos terminados y con ello garantizar una mayor calidad, ofreciendo medicamentos o cosméticos que no tengan interacciones químicas que podrían ser contraproducentes.
- ❖ Efectuar pruebas de compatibilidad de las nanopartículas de melanina de origen recombinante en líneas celulares propios del cuerpo humano, tales como células sanguíneas, con el fin de poner a prueba otros usos de éstas como principio activo en medicamentos con diferentes formas farmacéuticas.

13. REFERENCIAS

1. Wilkinson, J. (1990). *La piel*, en *Cosmetología de Harry*. (Pp. 7- 10; 249-288). Madrid, España. Ed. Edigrafos.
2. Camacho, C. (2019). *Deterioro de la capa de ozono estratosférico: Una revisión*. En *Boletín científico del Instituto de Ciencias Básicas e Ingenierías*. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.
3. Larrañaga, A. (2012). *50 dudas sobre el Sol*. *Academia Española de Dermatología y venereología*. (p. 7). Recuperado en Marzo 11, 2020 de https://aedv.es/wp-content/uploads/2015/04/dossier_campana_cancer_piel_ok.pdf
4. Henry, G. (S.F). *L'histoire de la Maison: Une start-up au passé centenaire. L'histoire de Jean Patou*. En *Pataou*. Recuperado en Marzo 20, 2020 de <https://patou.com/pages/history-jean-patou>. Paris, Francia.
5. Global Industry Analyst, Inc. (2015). *Cosmetics skin care: Market analysis, trends and forecast*. Recuperado en Marzo 23, 2020 en <https://www.strategyr.com/market-report-cosmetic-skin-care-forecasts-global-industry-analysts-inc.asp>
6. Food & Drug Administration. (2019). *Scenesse® (afamelanotide) implant, for subcutaneous use*. Estados Unidos. Recuperado en Abril 22, 2020 en https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2019/210797s000lbl.pdf
7. Wolff, K. (2003). *Generalidades de la biología, el desarrollo y estructura de la piel*, en *Dermatología en Medicina General*. Cap. 3. (Pp. 57-65). Editorial Panamericana. España.
8. Wilkinson, J. (1990). *La piel*, en *Cosmetología de Harry*. (pp. 7- 10, 259-230). Madrid, España. Ed. Edigrafos.
9. Haake, A.R., & Hollbrook, K. (1999). *The structure and development of skin*, en *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine* (5th ed., pp. 70–111). E.U.A.
10. Biga, L. (2020). *Layers of the Skin*, en *Anatomy & Physiology*. Chapter 5. *The Integumentary System*, 1er. Edición, Oregon State University, E.U.A.
11. Urán, M. (2008). *Melanina: implicaciones en la patogénesis de algunas enfermedades y su capacidad de evadir la respuesta inmune del hospedero*. *Infectio*, (Pp. 128-148).
12. Casarrubias, J. (2017). *Obtención, caracterización y bioevaluación en cultivo celular de nanopartículas de melanina de origen recombinante*. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México.
13. Rangel, E. (2016). *Respuesta a inhibidores de melanina y condiciones de estrés en el hongo *Lasiodiplodia theobromae**, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, México.

14. Gosset, G. (2019). Production of Melanins with recombinant microorganisms, en *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, Vol. 7. Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, México.
15. Marín, D. (2005). *Pigmentación de la piel (I). Melaninas: conceptos generales e implicaciones cosméticas*. *Offarm*, Vol. 24, 3. 2019, agosto 20, Elsevier.
16. Duro, E. (2003). *El Sol y los filtros solares*. *Medifarm*, Vol. 25, 7. 2019, agosto 21, Madrid.
17. Montaudié, H. (2014). *Melanogénesis*, en *Fisiología del sistema pigmentario*. Vol. 48, no. 1. (Pp. 1-11) Elsevier.
18. Gonzalez, L. (2003). *Los efectos nocivos de la radiación solar y la forma de combatirlos*, En Elsevier, Vol. 22. Núm. 5. (Pp. 68-76).
19. Sánchez, V. (2016). *Efectos de la radiación solar en la salud*, en Dirección General de Comunicación Social, Universidad Autónoma de México. Recuperado en Abril 29, 2020 en <http://www.dint.unam.mx/blog/index.php/item/3194-efectos-de-la-radiacion-solar-en-la-salud>, México.
20. Llorente, A. (2018). *Cuál es el estado del agujero de la capa de ozono y a qué países de América Latina afecta más*, en BBC News Mundo, Recuperado en Abril 29, 2020 en <https://www.bbc.com/mundo/noticias-45529409>
21. Organización Mundial de la Salud. (2003). *Índice UV Solar Mundial*, Guía práctica. Recuperado en agosto 28, 2019 en <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42633/9243590073.pdf?sequence=1>
22. Harvard Medical School. (2020). *Sun-Damaged Skin*, recuperado en Agosto 23, 2020 en <https://www.health.harvard.edu/staying-healthy/sun-damaged-skin-a-to-z>, Harvard University, E.U.A.
23. Marín, D. (2005). *Filtros solares. Características, tipos y requerimientos*. *Offarm*, Vol. 24, 3. Recuperado en Agosto 25, 2019. De Elsevier.
24. Martínez, J. (2012). *Los Cosméticos: Características Generales*, en *Cosmetología*.
25. Kaur, C. D., & Saraf, S. (2010). *In vitro sun protection factor determination of herbal oils used in cosmetics*. *Pharmacognosy research*, 2(1), 22–25. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.60586>
26. Abilés, J. (2009). *Effects of thermo-oxidised oils on lipid peroxidation in experimental animals*, *Nutr. Hosp.* vol.24 no.4. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla. España.
27. Secretaría de Salud. (2016). *NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2015, Buenas prácticas de fabricación de medicamentos*, en *Diario Oficial de la Federación*, México.
28. Secretaría de Salud. (2011). *DECRETO por el que se reforman y adicionan diversos artículos de la Ley General de Salud, en materia de cosméticos*, Capítulo IX: Productos Cosméticos en Ley General de Salud, México.

29. Secretaría de Salud. (2014). *ACUERDO por el que se modifica el diverso por el que se determinan las sustancias prohibidas y restringidas en la elaboración de productos de perfumería y belleza*, en Diario Oficial de la Federación, México.
30. Secretaría de Salud. (2012). *NORMA Oficial Mexicana NOM-141-SSA1/SCFI-2012, Etiquetado para productos cosméticos preenvasados. Etiquetado sanitario y comercial*, en Diario Oficial de la Federación, México.
31. Food & Drug Administration. (2012). *Labeling and Effectiveness Testing: Sunscreen Drug Products for Over-The-Counter Human Use — Small Entity Compliance Guide*, Centro de Evaluación e Investigación de Medicamentos (CDER) del Departamento de Salud y Servicios Humanos de E.U.A.
32. Food & Drug Administration. (2020). *Key Legal Concepts for the Cosmetics Industry: Interstate Commerce, Adulterated, and Mislabeled*, E.U.A.
33. H., Lim H, (2016). *Current challenges in photoprotection*. En *Dermatology* [Internet]. (pp. 1–9). <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2016.09.040>.
34. Organización Internacional para la Estandarización. (2011). 24442. *Cosmetics — Sun protection test methods — In vivo determination of sunscreen UVA protection*, Suiza.
35. Japan Cosmetic Industry Association Technical Bulletin. (1996). *Measurement standards for UVA protection efficacy*. Japón.
36. Organización Internacional para la Estandarización. (2012). *ISO 24443. Determination of sunscreen UVA photoprotection in vitro*, Suiza.
37. Garcia, S. (2014). *Methods used in evaluation of the sun protection factor of sunscreens*, en *Revista Electrónica de Farmacia*, Vol.XI (2), (pp.37–54).
38. Food & Drug Administration. (2019). *Cfr - Code of federal regulations title 21--Food and Drugs, chapter i--food and drug administration, department of health and human services, subchapter c - drugs: general*. Recuperado de <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?fr=201.327> en noviembre 2, 2020.
39. Mansur, J. (1986). *Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria*. En *An. Bras. Dermatol.*, v. 61, (pp. 121-124). Rio de Janeiro, Brasil.
40. N. Shanmugam. (2019). *Nanotechnology- Basics and basis*, en *Nanotechnology*, (p.5). Ed. MJP Publishers.
41. Nasrollahzadeh, m. (2019). *An Introduction to Nanotechnology*. An Introduction to Green Nanotechnology, Interface Science and Technology, Vol. 28. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813586-0.00001-8>
42. Khan, I. (2019). *Nanoparticles: Properties, applications and toxicities*, en *Revista Árabe de Química*, Volumen 12, Número 7, (pp. 908-931). Arabia.
43. Amaya, J. (2019). *Nanomateriales: una clasificación desde sus dimensiones*. En *Revista Química e Industria*, (pp. 10-12). Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Colombia.

44. Jitendra, N. (2012). *Zero-dimensional, one-dimensional, two-dimensional and three-dimensional nanostructured materials for advanced electrochemical energy devices.*, 57 (4), (pp. 724–803). doi: 10.1016 / j.pmatsci.2011.08.003
45. Jeevanandam, J. (2018). *Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations.* Beilstein journal of nanotechnology, (pp.1050–1074). <https://doi.org/10.3762/bjnano.9.98>
46. Singh, A. (2015). *Engineered Nanoparticles: Structure properties and mechanisms of toxicity*
47. Liu, J. (2010). *A modified double-emulsion method for the preparation of daunorubicin-loaded polymeric nanoparticle with enhanced in vitro anti-tumor activity.* *Biomedical materials (Bristol, England)*. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/5/6/065002>
48. Batalla, J. (2014). *Potencial zeta en la determinación de carga superficial de liposomas*, En Lat. Am. J. Phys. Educ. Vol. 8, No. 4. Centro de Investigación Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del Instituto Politécnico Nacional, México.
49. Malvern Instrument, Inc. (2004). *Potencial Zeta. Un curso completo en cinco minutos.* Ed. Malver Inst. Catálogo Zeta-Meter. E.U.A.
50. Williams, D. (2008). *On the mechanisms of biocompatibility*, En *Biomaterials*, vol. 29, (pp. 2941–2953)
51. Xiaoming, L. (2012). *Biocompatibility and Toxicity of Nanoparticles and Nanotubes*, En *Journal of Nanomaterials* Volume 2012, Article ID 548389, .doi:10.1155/2012/548389. Key Laboratory for Biomechanics and Mechanobiology of Ministry of Education, School of Biological Science and Medical Engineering, China.
52. Zavaglia, C. (2016). *Feature Article: Biomaterials*. 10.1016/B978-0-12-803581-8.04109-6.
53. Salud Pública de México. (2012). *Nanopartículas modificadas en productos de consumo*, en *Salud Pública*, Vol. 54. 2019, agosto 28. De Scielo. México.
54. Rageh, M. (2015). *Melanin nanoparticles (MNPs) provide protection against whole-body γ -irradiation in mice via restoration of hematopoietic tissues.* En *Molecular and cellular biochemistry*, <https://doi.org/10.1007/s11010-014-2232-y>
55. Schweitzer, A. (2010). *Melanin-covered nanoparticles for protection of bone marrow during radiation therapy of cancer.* En *International journal of radiation oncology, biology, physics*. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2010.02.020>
56. McSweeney P. (2016). *The safety of nanoparticles in sunscreens: An update for general practice.* *Australian family physician*, (pp.397–399.)
57. Rowe, R. (2009). *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. Sixth edition.

58. Hernandez, D. (2020). *Quimiofobia cosmética: los parabenos*, En Revista de Divulgación Científica y Tecnológica de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Año 23, No. 103. Recuperado de <http://cienciauanl.uanl.mx/?p=10385> en Octubre 17, 2020.
59. Bermudez, J. (2012). *Pharmaceutical Technology Recientes avances sobre hidrogeles termosensibles utilizados como sistemas de liberación de farmacos*. Departamento de Farmacia. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
60. Nafisi, S. (2018). *Skin penetration of nanoparticles*. En Emerging Nanotechnologies in Immunology, 47–88. doi:10.1016/b978-0-323-40016-9.00003-8
61. Secretaría de Salud. (2005). *NORMA Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2005, Estabilidad de fármacos y medicamentos*, En Diario Oficial de la Federación. México.
62. Ministerio de Salud de la Nación. (2003). *1040. Estudios de estabilidad*, En Farmacopea Argentina, 7º Edición. Vol. 1. (pp. 412). Argentina.
63. Chanchal, D. (2010). *In vitro sun protection factor determination of herbal oils used in cosmetics*. University Institute of Pharmacy, Ravishankar Shukla University, Raipur, India.
64. Sedaca, M. (2017). *Synthetic “Melanin” Could Act as a Natural Sunscreen*, University of California. Recuperado de <https://www.scientificamerican.com/article/synthetic-lldquo-melanin-rdquo-could-act-as-a-natural-sunscreen/> en Mayo 17, 2021.
65. Yang, M., Li, L., Yu, S., Liu, J., & Shi, J. (2020). *High performance of alginate/ polyvinyl alcohol composite film based on natural original melanin nanoparticles used as food thermal insulating and UV-visible block*. *Carbohydrate Polymers*, 115884. doi:10.1016/j.carbpol.2020.11588
66. Rowe, R. (2009). *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, (6ta edición), Reino Unido, AphA.
67. Castanedo-Cazares, J. (2017). *Análisis de la pigmentación cutánea en una muestra*, Gaceta Médica de México, Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México.
68. Mbonyiryivuze, A. (2015). *Natural Dye Sensitizer for Grätzel Cells: Sepia Melanin*, *Physics and Materials Chemistry*, 2015, Vol. 3, No. 1, 1-6, Universidad de Sudáfrica, Sudáfrica.
69. Shatilova, I. (2019). Estructura de la molécula química de eumelanina sobre fondo blanco, ID de la imagen:2CFAPGG, recuperada de <https://www.alamy.es/estructura-de-la-molecula-quimica-de-eumelanina-sobre-fondo-blanco-image370874800.html> en Junio 13, 2021.

14. ANEXOS.

Anexo 1. Parámetros de desempeño en la validación de métodos analíticos.

Curva de calibración de melanina en NaOH 1N.

Tabla 25. Absorbancias a diferentes concentraciones para curva de calibración de melanina preformada				
Concentración (mg/ml)	Absorbancia	Promedio	Desv. Std.	%C.V.
2.5	0.1156	0.1151	0.0007234	0.6283
2.5	0.1155			
2.5	0.1143			
5	0.2176	0.2156	0.0017954	0.8329
5	0.2142			
5	0.2149			
10	0.3804	0.3807	0.0004359	0.1145
10	0.3812			
10	0.3805			
15	0.5716	0.5786	0.0061370	1.0606
15	0.5814			
15	0.5829			
20	0.7629	0.7537	0.0080842	1.0727
20	0.7504			
20	0.7477			
25	0.946	0.9409	0.0059071	0.6278
25	0.9423			
25	0.9344			
R ²	0.9996		Promedio	0.7227

Figura 21. Curva de calibración de la melanina de origen recombinante como materia prima.

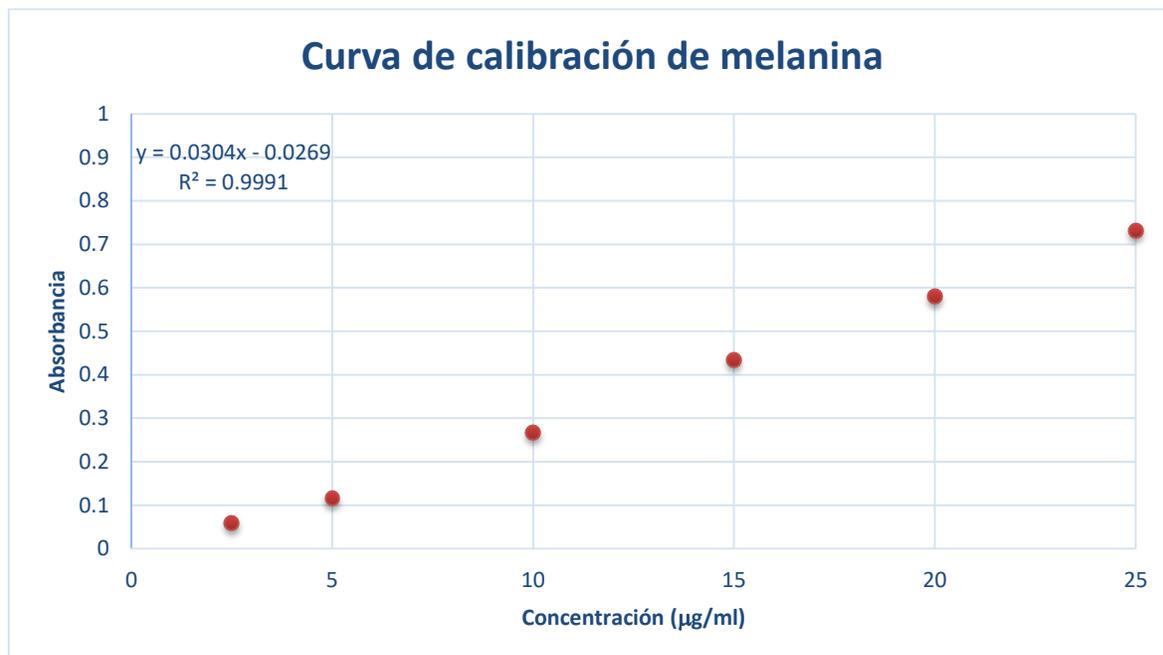


Tabla 26. Exactitud del método.

Concentración (µg/ml)	Absorbancia	Concentración experimental	%Recobro
5	0.1241	4.9671	99.3421
5	0.1359	5.3553	107.1053
5	0.1295	5.1447	102.8947
5	0.1264	5.0428	100.8553
5	0.1169	4.7303	94.6053
5	0.1322	5.2336	104.6711
25	0.7165	24.4539	97.8158
25	0.7268	24.7928	99.1711
25	0.7285	24.8487	99.3947
25	0.7392	25.2007	100.8026
25	0.713	24.3388	97.3553
25	0.7173	24.4803	97.9211
	Media		100.1612
	Desv.Std.		3.4169
	C.V. %		3.4114
	I.C.		0.94086271
	Lím. Sup.		101.1020
	Lím. Inf.		99.2203

Tabla 27. Precisión del método.

Precisión día 1 (15µg/ml)		Precisión día 2 (15 µg/ml)	
Repetición	Absorbancia	Repetición	Absorbancia
1	0.4628	1	0.4706
2	0.4762	2	0.4602
3	0.4695	3	0.4856
4	0.466	4	0.4498
5	0.4347	5	0.4871
6	0.459	6	0.4692
Media	0.4614	Media	0.4704
Desv. Std.	0.0143	Desv. Std.	0.0144
%C.V.	3.1055	%C.V.	3.0656

Tabla 28. Determinación del límite de cuantificación y detección.

LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	LÍMITE DE DETECCIÓN
$L. C. = \frac{10\delta}{S}$	$L. D. = \frac{0.33\delta}{S}$
<p>δ= Desviación estándar del intercepto</p>	<p>δ= Desviación estándar del intercepto</p>
<p>S=Pendiente de la curva de calibración</p>	<p>S=Pendiente de la curva de calibración</p>
<p>LC=18.2895 µg/ml</p>	<p>LD= 0.6036 µg/ml</p>

Anexo 2.

ASOCIACIÓN FARMACÉUTICA MEXICANA

OTORGA LA PRESENTE

CONSTANCIA



A: Laura Vanely Bastida Franco, Gosset L. Guillermo, Alcalá A. Sergio

Por la presentación del Trabajo Libre:
**Estudio in vitro de efecto fotoprotector UV de NPs de melanina
formuladas en diferentes vehículos**

**En el PRIMER CONGRESO VIRTUAL, LIII NACIONAL Y VIII INTERNACIONAL
DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS**
“Profesionales farmacéuticos unidos a distancia”
Celebrado del 9 al 11 de noviembre de 2020.



Dra Elizabeth Sánchez González
Presidenta



**PRIMER CONGRESO VIRTUAL
LIII NACIONAL Y VIII INTERNACIONAL DE
CIENCIAS FARMACÉUTICAS
2020**
*Profesionales farmacéuticos
unidos a distancia*



MASS Cynthia Espinosa Contreras
Directora de Ciencia y Tecnología