



Universidad Autónoma de San Luis Potosí

Facultad de Ciencias Químicas

**PROGRAMA DE POSGRADO
EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS**

**FORMULACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LIPOSOMAS
DE CANNABIDIOL PARA USO TÓPICO.**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS**

PRESENTA:

MIRANDA VIDALES ABIGAIL

DIRECTORA DE TESIS

DRA. PATRICIA AGUIRRE BAÑUELOS

CO-DIRECTORA

DRA. ALICIA ROMÁN MARTÍNEZ

PROYECTO REALIZADO:

Laboratorio de Farmacología y Laboratorio de Biopolímeros y Nanoestructuras de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

CON FINANCIAMIENTO DE:

Beca-Tesis Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) Número de registro de la beca otorgada por CONACyT: 791469.

Número CVU: 1037695

“El programa de Maestría en Ciencias Farmacobiológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Sistema Nacional de Posgrados (SNP) del CONACyT, registro 003382, en el nivel en Desarrollo”



Universidad Autónoma de San Luis Potosí

Facultad de Ciencias Químicas

**PROGRAMA DE POSGRADO
EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS**

**FORMULACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LIPOSOMAS
DE CANNABIDIOL PARA USO TÓPICO.**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS**

PRESENTA:

I.B.P. ABIGAIL MIRANDA VIDALES

SINODALES:

PRESIDENTE: DRA. RUTH ELENA SORIA GUERRA

SECRETARIO: DR. JOSÉ PÉREZ URIZAR

VOCAL: DRA. ALICIA ROMÁN MARTÍNEZ

VOCAL: DRA. PATRICIA AGUIRRE BAÑUELOS

SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P.

OCTUBRE 2023

POSGRADO EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS

Tel: 826-23-00 ext. 6541 y 6540

San Luis Potosí, S.L.P.

Octubre 13, 2023

**Comité Académico del Posgrado
En Ciencias Farmacobiologicas
Facultad de Ciencias Químicas / UASLP
Presente.**

Por medio de la presente comunicamos que la tesis llevada a cabo por la alumna de Maestría I.B.P. Abigail Miranda Vidales, titulada “Formulación y caracterización de liposomas de cannabidiol para uso tópico”, ha sido concluida y aprobada por el comité tutorial para iniciar los trámites correspondientes para su titulación, la cual tendrá lugar el próximo día 30 de octubre a las 17:00 hrs. en el Auditorio Chico (G203), de la Facultad.

ATENTAMENTE

Dra. Patricia Aguirre Bañuelos
Director de Tesis

Dra. Alicia Román Martínez
Co-Directora

Dra. Ruth Elena Soria Guerra
Asesora

Dr. José Pérez Urizar
Asesor



“Formulación y caracterización de liposomas de cannabidiol para uso tópico” por Abigail Miranda Vidales se distribuye bajo una licencia [Creative Commons **Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional**](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

<https://creativecommons.org/share-your-work/>

FORMULACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LIPOSOMAS DE CANNABIDIOL PARA USO TÓPICO

Por Abigail Miranda Vidales

CANTIDAD DE PALABRAS 21789

HORA DE ENTREGA

17-OCT-2023 10:50A. M.

NÚMERO DE IDENTIFICACIÓN DEL TRABAJO

103544459

FORMULACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LIPOSOMAS DE CANNABIDIOL PARA USO TÓPICO

INFORME DE ORIGINALIDAD

10%

ÍNDICE DE SIMILITUD

AGRADECIMIENTOS:

Gracias a Dios por la oportunidad de estudiar un posgrado, por bendecirme y guiarme a lo largo de este camino, por regalarme la inteligencia y perseverancia para poder culminar este proyecto.

Gracias a mis papás por apoyarme en mis estudios.

Gracias de manera especial a la Dra. Patricia Aguirre Bañuelos, por darme la oportunidad de realizar la tesis de posgrado bajo su dirección, por permitirme entrar al laboratorio de Farmacología de la UASLP. Gracias por sus enseñanzas y por todo su apoyo. Le agradezco también por haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de la tesis.

Gracias a todo mi comité académico por sus enseñanzas y apoyo, a la Dra. Alicia Román Martínez, al Dr. José Pérez Urizar y a la Dra. Ruth Elena Soria.

Gracias a la Dra. Gabriela Palestino Escobedo por permitir que desarrolláramos algunos experimentos en el laboratorio de Biopolímeros y Nanoestructuras de la UASLP, por su confianza, también a la Dra. Cándida Anahí Cisneros Covarrubias, por su disponibilidad de tiempo y apoyo para el uso del DLS.

Gracias a la Dra. Gabriela Montero por su apoyo en el laboratorio, por sus consejos para realizar los experimentos.

Gracias a mis compañeros del laboratorio de Farmacología, y de posgrado, a Daniel, a Mónica a Miguel a Paulina, a Ale a Elvia, a Estefanía.

DEDICADO A:

A mis papás: Francisco Miranda y Aída Vidales, por ser mis primeros maestros y guías, por inculcarme la pasión por la química su acompañamiento y su alegría.

A mi amor Eduardo por tu apoyo y ánimo, desde la idea de comenzar el posgrado hasta culminarlo.

Para mis hermanos Goretti, Juan Pablo, José Miguel, Kateri, Javier, Verónica, Francisco y Fátima, porque de cada uno aprendo cada día, esto es para ustedes hermanos.

A mis sobrinas; Julia, Natalia, Sofía Isabel y Gloria para que sueñen y estudien ¡si se puede hermosas!

A mis amigas Esther, Sofí, Fer, Monse, por sus ánimos para mis estudios, las quiero.

RESUMEN

El cannabidiol (CBD) es un fitocanabinoide cuyas características fisicoquímicas como su constante de permeabilidad y diversos efectos terapéuticos, lo ha colocado como un fármaco potencial para el tratamiento de diversas patologías cutáneas debido a la posibilidad de aplicación tópica. Los liposomas son vesículas esféricas con una membrana compuesta por una bicapa de fosfolípidos y por la constitución química que presentan, tienen la posibilidad de encapsular compuestos lipofílicos como el CBD, actuando como un sistema de liberación efectiva de administración tópica.

El objetivo principal de este estudio fue el diseño y optimización de formulaciones liposomales que contengan CBD, mediante el uso de software MINITAB, de tipo diseño de mezclas, realizado en cinco etapas, hasta obtener las mejores formulaciones. En este diseño se establecieron las variables como las cantidades de CBD, lecitina, tween 80%, presencia o no de colesterol y los factores establecidos en las mejores características como tamaño de partícula (80 a 1000 nm), índice de polidispersidad (<0.2), potencial Zeta (± 30 mV), porcentaje de eficiencia de encapsulación ($>70\%$).

Una vez obtenido las mejores 5 formulaciones, se realizaron estudios in vitro de cinética de liberación, mediante membranas de diálisis, que permita visualizar si el CBD se libera desde los liposomas y la velocidad en que ocurre este proceso. Posteriormente, las formulaciones se vehiculizan en gel para tener una mejor forma farmacéutica de aplicación tópica y se realiza un estudio de permeación en piel de cerdo utilizando celdas de difusión de Franz, para determinar la mejor/es formulaciones de liposomas con CBD, que permanezcan más tiempo en la capa dérmica y se ejerza su efecto farmacológico en ciertas patologías dérmicas.

En este estudio se logró establecer las condiciones y concentraciones de componentes como lecitina, tween 80% y CBD que producen las formulaciones cuyas características establecidas como como tamaño de partícula (107.1 a 207.3 nm), índice de polidispersidad (0.9 a 0.43), potencial Zeta (-25.6 a -28.6 mV), porcentaje de eficiencia de encapsulación (70.5 a 80.6 %). De estas formulaciones se estableció una cinética de liberación muy similar con una $K= 0.88$ y $n= 0.27$, que indica una liberación de primer orden tipo fikiana. Los estudios de permeación indicaron que, de las 5 formulaciones, las formulaciones 2 y 5 tuvieron una constante de permeación (K_p) de 0.001, es decir una constante de permeación baja, lo que permitiría que el CBD se mantendría más tiempo en la capa dérmica para ejercer su efecto farmacológico.

Palabras clave: cannabidiol, liposomas, administración tópica, cinética de liberación, permeación in vitro, diseño de experimentos para optimización.

ABSTRACT

Cannabidiol (CBD) is a phytocannabinoid whose physicochemical characteristics, such as its permeability constant and various therapeutic effects, have positioned it as a potential drug for the treatment of various skin pathologies due to the possibility of topical application. Liposomes are spherical vesicles with a membrane composed of a bilayer of phospholipids and due to their chemical constitution, they have the possibility of encapsulating lipophilic compounds such as CBD, acting as an effective delivery system for topical administration.

The main objective of this study was the design and optimization of liposomal formulations containing CBD, using MINITAB software, a mixture design type, carried out in five stages, until the best formulations were obtained. In this design, the variables such as the amounts of CBD, lecithin, tween 80%, presence or absence of cholesterol and the factors established in the best characteristics such as particle size (80 to 1000 nm), polydispersity index (<0.2) were established. , Zeta potential (± 30 mV), encapsulation efficiency percentage ($>70\%$).

Once the best 5 formulations were obtained, in vitro release kinetics studies were carried out, using dialysis membranes, which allow us to visualize whether the CBD is released from the liposomes and the speed at which this process occurs. Subsequently, the formulations are transported in gel to have a better pharmaceutical form for topical application and a permeation study is carried out on pig skin using Franz diffusion cells, to determine the best formulation(s) of liposomes with CBD, which remain longer. time in the dermal layer and exerts its pharmacological effect on certain dermal pathologies.

In this study, it was possible to establish the conditions and concentrations of components such as lecithin, tween 80% and CBD that produce the formulations whose characteristics were established such as particle size (107.1 to 207.3 nm), polydispersity index (0.9 to 0.43) , Zeta potential (-25.6 to -28.6 mV), encapsulation efficiency percentage (70.5 to 80.6%). From these formulations, a very similar release kinetics was established with a $K= 0.88$ and $n= 0.27$, which indicates a fikiana-type first-order release. The permeation studies indicated that, of the 5 formulations, formulations 2 and 5 had a permeation constant (K_p) of 0.001, that is, a low permeation constant, which would allow the CBD to remain longer in the dermal layer. to exert its pharmacological effect.

Keywords: cannabidiol, liposomes, topical administration, release kinetics, in vitro permeation, design of experiments for optimization.

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1 Cannabidiol (CBD)	1
1.1.1 Estructura química y propiedades del CBD	1
1.1.2 Sistema endocannabinoide (SEC)	3
1.1.3 Efectos biológicos del CBD	5
1.1.4 Regulación del CBD	7
1.2 Estructura celular de la piel	8
1.2.1 SEC en la piel y efecto en patologías dérmicas	10
1.3 Vías tópicas de administración	11
1.3.1 Estrategias para mejorar la administración tópica de fármacos	13
1.3.2 Sistemas de Liberación	14
2. Antecedentes	15
2.1 Liposomas	15
2.1.1 Componentes y Estructura de los Liposomas	17
2.1.1.1 Fosfolípidos	17
2.1.1.2 Esteroles	18
2.1.1.3 Polisacáridos	19
2.1.1.4 Surfactantes	20
2.1.2 Tipos de Liposomas	21
2.1.3 Métodos de Elaboración de Liposomas	23
2.1.3.1 Método de Hidratación de Película Delgada	24
2.1.3.2 Método de Inyección de Solvente	25
2.1.3.3 Método de Evaporación de Fase Inversa	25
2.1.3.4 Método de Remoción de Detergente	26
2.1.3.5 Método de Calentamiento	26
2.1.3.6 Técnicas para Alterar el Tamaño de Partícula	27
2.1.3.6.1 Técnica de Extrusión de Membrana	27
2.1.3.6.2 Técnica de Homogenización	28
2.1.3.6.4 Técnica de Sonicación	28
2.1.4 Caracterización de Liposomas	29
2.1.4.1 Tamaño y Diámetro de Liposoma	30
2.1.4.2 Determinación de Lamelaridad	31
2.1.4.3 Índice de Polidispersidad	31
2.1.4.4 Potencial Z	32
2.1.4.5 Eficiencia de Encapsulación	34
2.1.4.6 Estudios de Liberación por Diálisis	35
2.1.4.7 Estudios de Permeación en Piel In Vitro	37
2.1.5 Diseño de Experimentos para Optimización	38
2.1.5.1 Software de Optimización	41
3. Justificación	42
4. Hipótesis	45
5. Objetivo General	46
5.1 Objetivos Específicos	46

6. Diseño Experimental	46
6.1 Primera Etapa	46
6.2 Segunda Etapa	47
6.3 Tercera Etapa	48
6.4 Cuarta Etapa	49
6.5 Quinta Etapa	50
7. Metodología	51
7.1 Elaboración de Liposomas.....	51
7.1.1 Reactivos, Material y Equipo	51
7.1.2 Procedimiento.....	52
7.2 Determinación de tamaño de Partícula, Índice de Polidispersidad y Potencial Z	54
7.2.1 Reactivos, Material y Equipo	54
7.2.2 Procedimiento	54
7.3 Determinación del Porcentaje de Encapsulamiento	55
7.3.1 Reactivos, Material y Equipo	55
7.3.2 Procedimiento	55
7.4 Caracterización de Cinética de Liberación	56
7.4.1 Reactivos, Material y Equipo	56
7.4.2 Procedimiento	57
7.5 Caracterización de Permeación en Piel In Vitro	58
7.5.1 Reactivos, Material y Equipo	58
7.5.2 Procedimiento	58
7.6 Cuantificación de CBD por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución	59
7.6.1 Reactivos, Material y Equipo	59
7.6.2 Procedimiento	60
8. Resultados	62
8.1 Primera Etapa	62
8.2 Segunda Etapa	62
8.3 Tercera Etapa	64
8.4 Cuarta Etapa	70
8.5 Quinta etapa	71
8.6 Cinética de Liberación	72
8.7 Permeación en piel porcina	75
8.8 Método de cuantificación de CBD por CLAR	78
9. Discusión	80
10. Conclusiones	83
11. Perspectivas	84
12. Bibliografía	86
13. Glosario	92

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Cannabidiol

El cannabidiol (CBD) pertenece a una variedad química de las casi 113 especies de fitocannabinoides, cuya estructura química son terpenofenoles, su nombre es debido a que la planta *Cannabis* los produce de manera significativa. Otros compuestos que también se encuentran en la planta son: tetrahidrocannabinol (THC), tetrahidrocannabivarin (THCV), cannabicromeno (CBC), cannabinol (CBN), cannabigerol (CBG) entre otros (Figura 1). Los principales compuestos como THC y CBD fueron aislados del hachís e identificados químicamente desde 1966 por el Dr. Raphael Mechoulam y su equipo de trabajo, siendo este el principal investigador que integro el sistema endocannabinoide (Crocq, 2020).

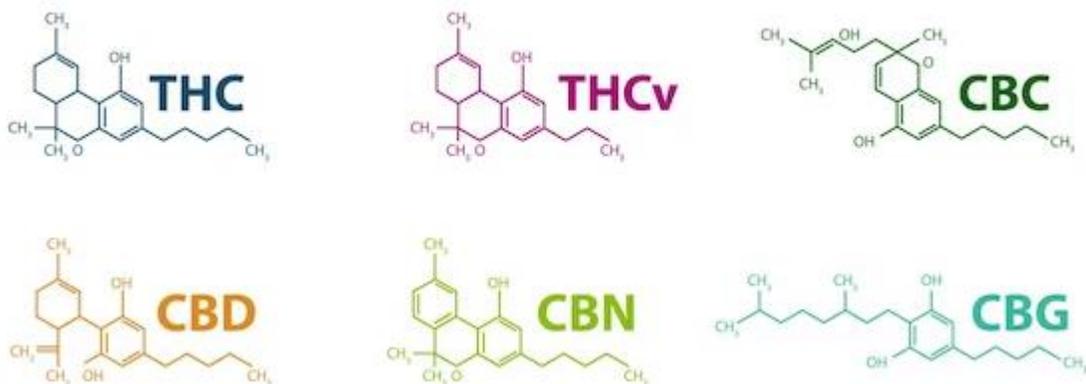


Figura 1. Canabinoides naturales: tetrahidrocannabinol (THC), tetrahidrocannabivarin (THCV), cannabicromeno (CBC), cannabidiol (CBD), cannabinol (CBN), cannabigerol (CBG). Fuente: Freepik®

1.1.1 Estructura química y propiedades del CBD

La estructura base de los cannabidiol, es el CBD, cuya fórmula química es: $C_{21}H_{30}O_2$, se identificó por primera vez en un extracto de cáñamo silvestre de Minnesota por Adams y colaboradores en la Universidad de Illinois en 1940, sin

embargo, fue hasta 1963 que su estructura química, fue elucidada por completo (Burnstein, 2015).

El CBD es un cannabinoide, de estructura ciclohexeno, cuyo nombre químico según la IUPAC es 2-[(1R,6R)-6-isopropenil-3-metilciclohex-2-en-1-il]-5-pentilbenceno-1,3-diol.

El número de identificación según la clasificación CAS es 13956-29-1. Su peso molecular corresponde a 314.5 g/mol, puede donar y aceptar 2 uniones con hidrógeno y contener 6 uniones rotatorias, su masa exacta es 314.224580195 g/mol y su masa monoisotrópica corresponde a 314.224580195 g/mol, su área topológica polar es 40.5Å² y número atómico de 23, tiene una carga formal de 0 y no tienen isotopos, su número de covalencia es 1.

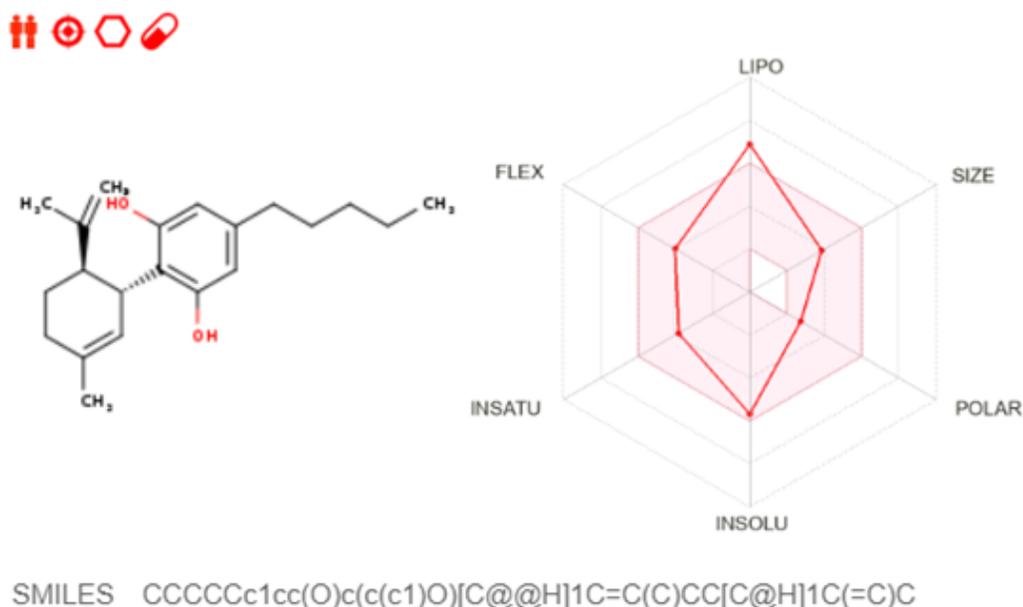


Figura 2. Estructura química y características de cannabidiol.

Fuente EXPASY/SwissADME

Desde el punto de vista farmacocinético, el CBD es una molécula con buena absorción gastrointestinal y penetra la barrera hematoencefálica, y su administración oral puede indicar que puede ser un buen fármaco, sin embargo, hay una desventaja que es un inhibidor de varias enzimas metabólicas pertenecientes al citocromo P450 (CYPs), por lo que puede interactuar con otros fármacos. Es importante resaltar que el CBD tiene un valor de repartición Log Po/w de 5.2., indicando que es un compuesto lipofílico y un valor de Log Kp de -3.59 cm/s, que indica una permeabilidad en piel moderada, puede ser un compuesto para desarrollo dermatológico o cosmético (DrugBank y EXPASY/SwissADME) (Figura 2).

1.1.2 Sistema endocannabinoide

El sistema endocannabinoide (SEC) se ha constituido en las últimas tres décadas por el descubrimiento y caracterización de los receptores canabidiones tipo 1 (CB₁) y tipo 2 (CB₂), tal sistema forma una red neuromoduladora, se expresa en el sistema nervioso central y periférico, así como en varios órganos (Figura 3), lo que indica que desempeña importantes roles cognitivos y fisiológicos (Lu y Mackeie, 2021).

Los receptores CB₁ y CB₂ son proteínas acopladas a proteínas G, el receptor CB₁ principalmente de manera inhibitoria (G_i/G_o), y el receptor CB₂, acoplado a proteína G estimuladoras (G_s), por lo que su activación inhibe o activa respectivamente la adenilato ciclasa y ciertos canales de calcio sensibles al voltaje.

Los receptores CB₁ se encuentran ampliamente distribuidos en el SNC, donde están localizadas a nivel de interneuronas glutamatérgicas, gabaérgicas, colinérgicas, glicérgicas y serotoninérgicas, pero también se expresa en tejidos fuera del sistema nervioso, incluidos el corazón, los pulmones, la próstata, el hígado, el útero, los ovarios, los testículos, los conductos deferentes y los huesos (Galiègue y cols., 1995). Como tales, los receptores CB₁ periféricos median procesos fisiológicos como; motilidad gastrointestinal, balance energético, reproducción y fertilidad, dolor y metabolismo energético del músculo esquelético (Peng y cols., 2022).

Los receptores CB₂ se expresan principalmente en células de la microglía, en estudios in vitro, se encontró que el bloqueo de los receptores de CB₂ no afectó el riesgo de

muerte neuronal espontánea pero disminuyó la supervivencia neuronal cuando se añadió un tóxico neuronal, ello muestra que las interacciones neurona y glía son esenciales para la supervivencia neuronal, por lo que los receptores tipo CB₂, juegan un rol clave en las interacciones de manera protectora en condiciones tóxicas (Rojo-Bustamante y cols., 2020). También se han identificado receptores CB₂ en leucocitos, humanos, donde induce la secreción de interleucinas 6 y 10 que son mediadores que modulan el proceso inflamatorio (Saroz y cols. 2019).

La integración del SEC se completó cuando se descubrieron sustancias endógenas denominados cannabinoides endógenos, que son principalmente la anandamida (N-araquidonoiletanolamida) y 2-araquidonoilglicerol (2-AG). Ambos endocannabinoides son derivados del ácido araquidónico y modulan las actividades CB₁ y CB₂. La concentración de endocannabinoides está regulada por las enzimas oleamida hidrolasa y monoacilglicerol lipasa, que actúan degradando a la anandamida y 2-AG, respectivamente (Schurman y cols., 2020).

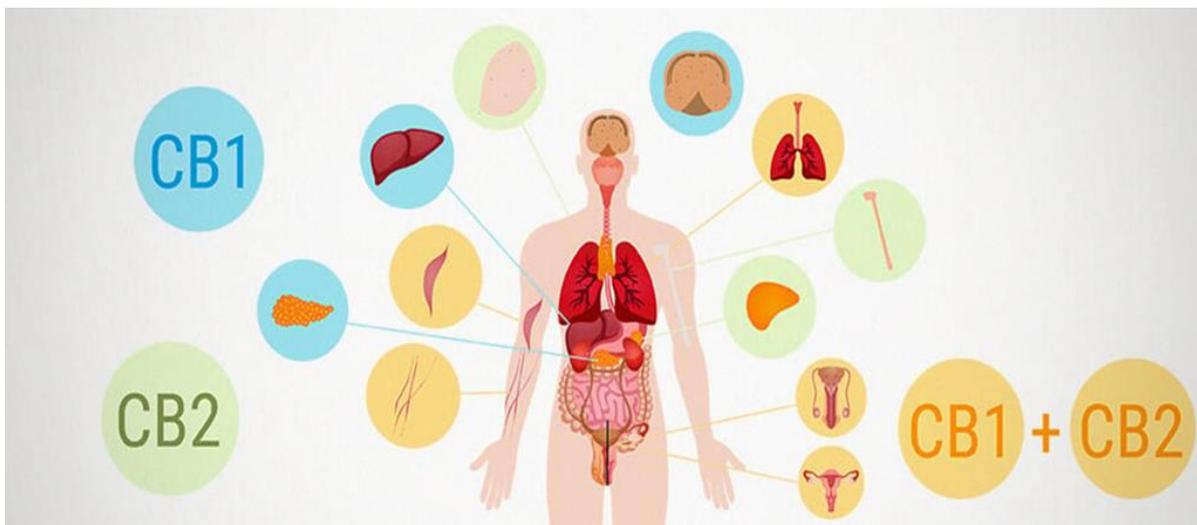


Figura 3. Localización de receptores CB₁ y CB₂ en el organismo humano.

Tomado de la pagina royalqueenseed.es

1.1.3 Efectos biológicos del CBD

El CBD ha mostrado actividad neuroprotectora, antipsicótica y ansiolítica, además de actividad antioxidante, analgésica y relajante muscular, por lo que esta variedad de efectos es debido a complejos mecanismos farmacológicos, basado a su afinidad de unión a varios receptores como los correspondientes al SEC (CB₁ y CB₂), pero también se ha encontrado que puede interactuar directa o indirectamente con receptores serotoninérgicos tipo 1A (5-HT_{1A}), receptores de potencia transitorio tipo vainiloide (TRPV_{1y2}), receptores de potencial transitorio tipo melastina (TRPM₈) y receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPAR δ). Pero también resultado de la interacción inhibitoria de la enzima hidrolasa oleamida (Peng y cols, 2022).

Los efectos psicoactivos del CBD, se explican por su agonismo parcial a los receptores CB₁ presinápticos en las áreas del hipocampo ventral, reducen la liberación de neurotransmisores, pero como un mayor impacto como inhibidor de enzima hidrolasa oleamida, que es una enzima que degrada la formación de anandamida, que es un ligando natural al receptor CB₁, facilitar la neurotransmisión serotoninérgica mediada por el receptor 5-HT_{1A} y activación del receptor TRPV₁, acciones que en suma tendrán un efecto inhibitorio en la transmisión neuronal y por ende un efecto ansiolítico. El agonismo parcial en los receptores de dopamina D₂ podría explicar los efectos del CBD en el procesamiento de la memoria emocional procesado en el hipocampo ventral y efecto ansiolítico. Esta propuesta de mecanismos de acción se ha respaldado por estudios clínicos donde se encuentra efectos ansiolíticos, antidepresivos e inclusive efectos antiepilépticos del CBD en pacientes (Ibeas y cols., 2015; Pisanti y cols., 2017). En cuanto a los efectos analgésicos del CBD, este se basa en la interacción del CBD con los receptores CB₁, expresados en el SNC, particularmente en las regiones del mesencéfalo y la médula espinal que son puntos importantes de la vía nociceptiva, esencial para la percepción del dolor. También se ha reportado un efecto de modulación alostérica positiva de los receptores serotoninérgicos 5HT_{1A}, cuya localización periférica promueven la inhibición de la transmisión de los potenciales de acción, por ende, de la transmisión nociceptiva hacia niveles cerebrales para la percepción del dolor.

Por otro parte, en estudios de afinidad, el CBD a baja concentración activa canales iónicos tipo TRPV₁ y TRPV₄ y a altas concentraciones a los receptores TRPV₂, estos receptores también se encuentran en neuronas periféricas, cuya activación está asociada a la transmisión nociceptiva, al ser canales de apertura para sodio, sin embargo, la interacción de CBD con estos iones es parecida a la estimulación con capsaicina, que activa y después desensibiliza al receptor, teniendo un efecto final tipo analgésico. Otras interacciones estudiadas, son las del CBD con el receptor TRPM₈ que es un receptor iónico parecido a los PRV, pero que regula transmisión nociceptiva por frío, y los receptores GPR₅₅, GPR₃, GPR₆ y GPR₁₂, que son receptores huérfanos acoplados a proteínas G, pero que aún no se caracterizado sus ligandos. La interacción antagonista del CBD por estos receptores se ha relacionado con los efectos sobre dolor neuropático, dado que los receptores GPR huérfanos participan de manera directa aun clara en las neuronas nociceptivas. Por último, se ha reportado que posiblemente el CBD también pueda interactuar sobre receptores opioides receptor opioide μ y δ , cuya participación en el sistema opioide en la modulación de la transmisión nociceptiva (Mlost y cols.,2020).

Los efectos antiinflamatorios y antioxidantes del CBD, se basan en la interacción antagonica sobre los receptores CB₂ localizados en leucocitos, resultando en una modulación de la liberación de medidores antinflamatorios como IL6 e IL10, además de la supresión de la desgranulación de los mastocitos y la propagación de neutrófilos en áreas de inicio de inflamación. Se ha encontrado que los efectos antagonicos del CBD sobre los receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPAR) tipo α y γ , receptores que se expresan en tejidos como músculo esquelético, corazón, hígado y tejido adiposo marrón y en macrófagos células que participan en la respuesta inflamatoria, dado que al activarse inician una secuenciación que termina en la inhibición la enzima COX (que promueve la síntesis de prostaglandinas, un autacoide mediador del proceso inflamatorio) y aparte induce la liberación de interleucinas tipo 2, 8, 9 y 12 (IL-2, IL-8, IL-9, IL-12), así como del factor de necrosis tumoral (TNF α), que son mediadores que promueven el proceso inflamatorio (Atalay y cols., 2019).

El potencial analgésico terapéutico del CBD se ha investigado en estudios preclínicos, dado que se ha realizado en pruebas de nocicepción en roedores, sin embargo, se ha encontrado una respuesta más consistente con modelos de dolor neuropático y efecto antiinflamatorio en modelos de edema inducida por adyuvante de Freud (Hammell y cols., 2015). Lo mismo ocurre con estudios clínicos donde es la combinación de THC/CBD que se ha utilizado en una proporción de 1:1 en caso de dolor crónico como fibromialgia, artritis reumatoide, y dolor neuropático (McDonagh y cols., 2022).

1.1.4 Regulación del CBD

La Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), por sus siglas en inglés; Food and Drug Administration), es la organización encargada de regular la gran variedad de productos como suplementos dietéticos, alimentos y bebidas, incluidos los derivados del cáñamo, en Estados Unidos. Dado que el CBD es un compuesto derivado del cáñamo que se reconoce por tener beneficios potenciales para la salud y que se consume para tratar afecciones como el insomnio y la ansiedad (Teitelbaum, 2019), la mayoría de los productos que contienen CBD no están regulados actualmente por la FDA. El aceite que contiene CBD tampoco está formalmente aprobado por la FDA sin embargo, es legal de acuerdo con la ley federal, puesto que existe una Ley de Mejoramiento Agrícola del 2018 que aprobó y legalizó el cultivo, posesión y venta de productos de cáñamo a nivel federal en los Estados Unidos (2018 Farm Bill Primer: Hemp Cultivation and Processing). Otra condición es que para que sea legal, el CBD debe derivarse de la planta de cáñamo y contener menos del 0.3% de tetrahidrocannabinol (THC).

Por otra parte, la Agencia Europea de Medicamentos (EMA), por sus siglas en inglés: European Medicines Agency), aprobó el uso del primer medicamento a base de CBD, Epidiolex®, una solución oral (100 mg/mL), indicada para su uso como terapia adyuvante de las convulsiones asociadas con epilepsia (von Wrede y cols., 2021), a partir de esta formulación, se han desarrollado varias formulaciones orales con fines terapéuticos (EMA/H/C/004675).

En nuestro país, la COFEPRIS (Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios), aprobó el 21 noviembre 2018 las solicitudes para la comercialización de productos con aceite de cáñamo que contengan CBD, con uso como suplemento alimenticio y en productos cosméticos (COFREPRIS, 2018). Uno de los usos más explotados en la actualidad es su uso tópico con efecto cosmético, dado que ha mostrado efectos como protector contra rayos UV, antioxidante y antienvjecimiento (Geçotek y cols., 2021).

1.2 Estructura Celular de la Piel

La piel es el tejido mas extenso del cuerpo, en área superficial y constituye alrededor del 15 % de la masa total corporal. La piel tiene varias funciones como la regulación de la temperatura corporal, es un reservorio de sangre (del 8 al 10%), brinda protección contra el entorno, en este tejido se establecen las sensaciones cutáneas, es un medio de excreción y absorción, además de constituir un tejido donde se realiza la síntesis de vitamina D (Gravitz, 2018).

Desde el punto de vista estructural, la piel consta de: epidermis, dermis e hipodermis (Figura 4). De estas capas la epidermis, que es la más superficial y delgada desde 0.02 a 0.8 mm, dependiendo de la zona anatómica, esta capa está formada a su vez por subcapas o estratos de células epiteliales: córneo, granuloso, espinoso y basal o germinal. La epidermis es una capa tisular que está en constante renovación por el proceso de maduración o división celular desde las células germinales en la capa basal, donde se producen los queratocitos, es así que el estrato más externo o córneo este conformado de queratocitos que son células muertas y como su nombre lo indica con alta cantidad de queratina, que al estar rodeadas por una matriz lipídica que contiene cantidades iguales de ceramida, ácidos grasos y colesterol, forman la barrera cutánea (Abdayem y Haftek, 2018). Esta capa es la que realmente debería de penetrar cualquier compuesto cuya administración sea a través de esta vía.

La dermis es la capa de la piel y está constituido principalmente por tejido conectivo, con un grosor desde 3 a 5 mm, es un tejido altamente irrigado, debido a que contienen mayor cantidad de vasos sanguíneos. La forman otros tipos de células como los

fibroblastos, que contribuye a la producción de tejido conectivo y células inmunológicas denominados mastocitos que un tipo de glóbulos blancos que están involucrados en las respuestas inmune de protección antes presencia de agentes infecciosos y de respuesta inflamatoria al liberar gran cantidad de histamina, además de la presencia de melanocitos que producen melanina, compuesto que da la intensidad de color a la piel. La dermis es entonces la vía de entrada de compuestos hacia la circulación sistémica, después de atravesar la epidermis, puesto que es la capa que está muy irrigada por la gran cantidad de vasos sanguíneos que contiene (Rutter, 2000).

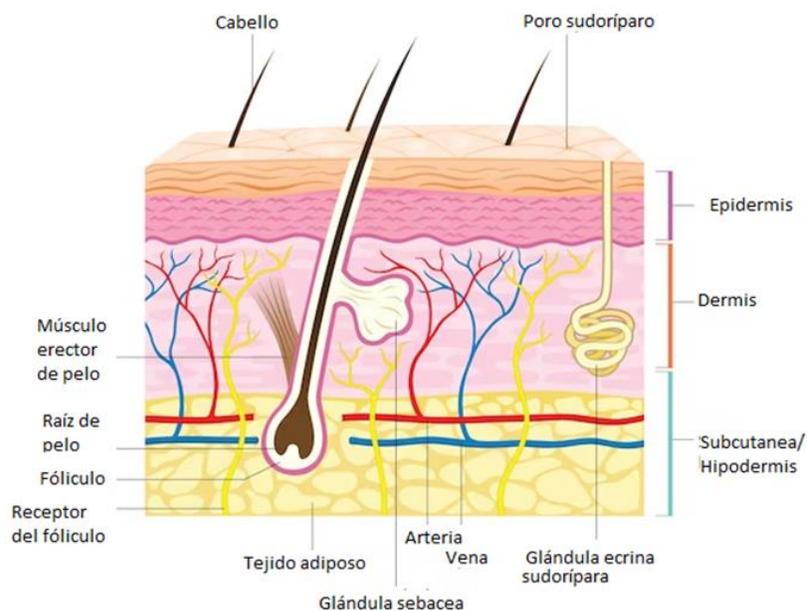


Figura 4. Capas de la piel.

Tomado de la página oushia.com

La hipodermis, se encuentra debajo de la dermis y está constituida por tejido areolar y adiposo, esta capa fija la dermis a los tejidos y órganos subyacentes, se ha denominado tejido subcutáneo, tejido graso subcutáneo o tejido celular subcutáneo, puesto que contienen gran cantidad de adipocitos. Esta capa da protección contra impactos mecánicos, y por ello participa en el metabolismo y almacenamiento de energía, pues puede llegar a contener hasta el 50% de la grasa corporal. Es importante

señalar que esta capa también contiene otros componentes como colágeno y elastina, además de macrófagos que son células con actividad inmunológica de engullir agentes infecciosos y fibroblastos que son células con la función de producir constantemente tejido conectivo en caso de daño (Prigent, 2002).

Debido a las características de las capas de piel, es posible establecer que la dermis e hipodermis, serán barreras más eficientes para mecanismos de ingreso por medios mecánicos, mientras que la capa epidérmica, constituye la principal barrera para que los compuestos o fármacos penetren (Jensen y Proksch, 2009).

1.2.1 Sistema endocannabidiol en piel y efecto en patologías dérmicas

Una de sus funciones de la piel es la respuestas inmunitarias, neurológicas y endocrinas, al estar compuesta por una intrincada red de comunicación multicelular, en la que la piel y sus unidades pilosebáceas funcionan como órganos neuroinmunoendocrinos, respondiendo a estímulos externos, neuropéptidos y mediadores liberados por las células vecinas. Es un proceso complejo y delicado que es esencial para mantener la homeostasis de la piel. Recientemente, se sugirió que la piel tiene su propio SEC ya que se demostró que los receptores CB₁ y CB₂ tienen ligandos endógenos en la piel (Sheriff y cols., 2022). Este SEC desempeña un rol fundamental en el mantenimiento de la homeostasis de la piel y los endocannabinoides participan en la regulación de las funciones neuroinmunoendocrinas y media las acciones de los endocannabinoides y cuando se interrumpe, puede causar trastornos como dermatitis, acné y prurito (Jeong y cols., 2019). Los dos principales receptores CB₁ y CB₂, se han encontrado en queratinocitos epidérmicos, melanocitos, células dérmicas, mastocitos, glándulas sudoríparas, folículos pilosos y fibras nerviosas cutáneas (Ständer y cols., 2005). También se han identificado otros receptores en varias células de la piel (Figura 5). Además, las enzimas amida hidrolasa y monoacilglicerol lipasa que degradan a los principales endocannabinoides como anandamida y 2-araquinoil glicerol, se han identificado en sebocitos, melanocitos, fibroblastos e inmunocitos, lo que sugiere que la piel también está involucrada en el metabolismo de los cannabinoides (Scheau y cols., 2020). Las enfermedades de la

piel o afecciones dermatológicas, afectan al menos a un tercio de la población de EU y han sido citadas como una de las 15 principales afecciones médicas cuya prevalencia y gasto en atención médica aumentaron en la última década (Akomeah, 2010).

Las principales enfermedades de la piel son de origen inflamatorio, dentro de estas sobresalen las siguientes: acné y la seborrea, dermatitis alérgica de contacto, eccema asteatótico, dermatitis atópica, psoriasis y prurito, entre otros (Martins y cols., 2022).

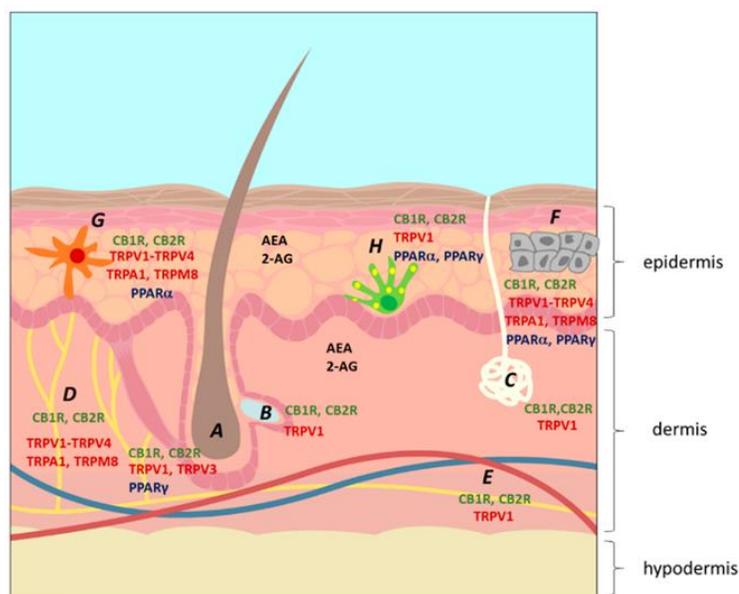


Figura 5. Sistema canabidiol en la piel. Martins y cols., 2022

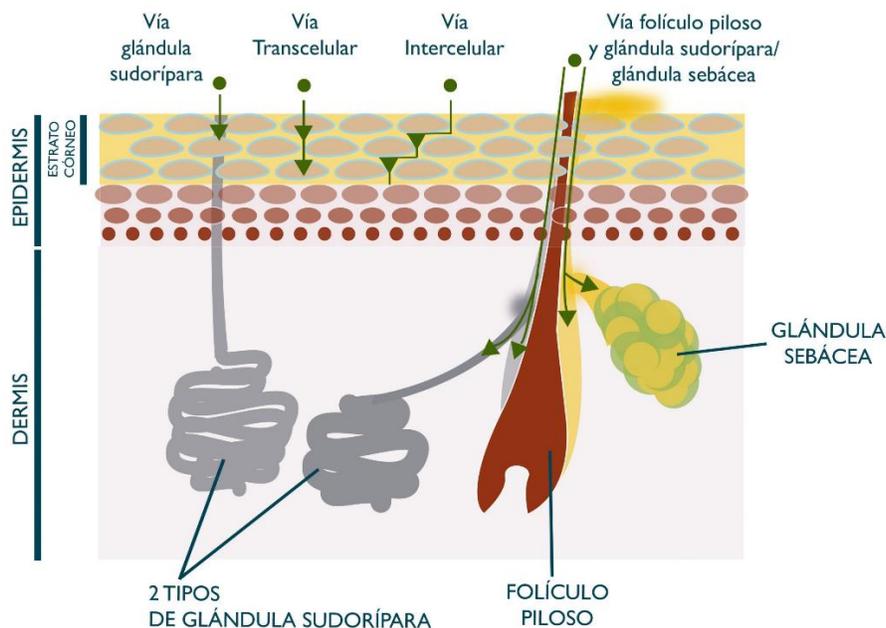
1.3 Vías tópicas de Administración

La administración tópica puede ofrecer algunas ventajas, dado que la piel es extensa en área accesible, además de evitar el primer paso o degradación enzimática de múltiples compuestos por la administración oral y paso por el sistema gastrointestinal, Además la aplicación tópica es un tratamiento localizado, cuando se trata de enfermedades cutáneas (Ita, 2016). Existe en las últimas décadas, controversia en cuanto a las posibles rutas de permeación de fármacos a través de la vía dérmica, pero

es bien conocidos que cualquier compuesto que sea aplicado, se moverá a través de dos vías principales, la transdérmica y la apendicular (Figura 6).

De estas vías, la transdérmica parece ser la principal ruta en la permeación de compuestos o fármacos y se define como la vía en la que estos compuestos atraviesan el estrato corneo que está sano o intacto. A su vez esta vía puede seguir dos caminos, la vía transcelular y la intercelular, de estas la vía intercelular es el camino por el cual la mayoría de los compuestos podrán cruzar la matriz lipídica de los cornecitos. Es por lo que los compuestos o fármacos de tipo lipófilos, se puedan difundir a través de los espacios extracelulares y los compuestos o fármacos polares o hidrofílicos, lo puedan hacer a través de la matriz lipídica. Si bien existe una pequeña superficie disponible para esta ruta, es consideradas como la vía principal que toman la mayoría de los compuestos. La vía intracelular, que es el paso de compuestos a través de los cornecitos y matriz lipídica de estos, es una vía menos relevante pues los compuestos deberán atravesar los entramados también de la queratina.

La vía apendicular es la vía de permeación que puede ser más rápida para los compuestos accedan a la dermis, dado que esta se lleva a cabo aprovechando la estructura de las glándulas sudoríparas y sebáceas y por los folículos pilosos, sin embargo, es una vía minoritaria dado que solo un 0.1% de la piel está cubierta de pelo. Generalmente, la mayoría de los compuestos podrán permear la piel, mediante varias vías, pero según su naturaleza será mayoritaria aquella que concuerde con sus características fisicoquímicas y es por lo que estas características son tomadas en cuenta cuando se desarrollan formulaciones farmacéuticas de productos cosméticos o fármacos para el tratamiento de enfermedades dérmicas (Vitorino y cols., 2015).



*Figura 6. Rutas de permeación de la piel
Tomada de la página isablemayoral.es*

1.3.1 Estrategias para Mejorar la Administración Tópica de Fármacos

Existen diferentes estrategias que se han desarrollado para que el proceso de permeación de compuestos o fármacos a través de la piel pueda ser optimizado, entre estas metodologías se encuentran los métodos de manipulación del estrato corneo, métodos físicos y sistemas de liberación u optimización del vehículo que contienen el compuesto para que sea facilitado la permeación, en algunos casos se pueden tener la combinación de estos (Marwah y cols., 2014).

Una de las principales funciones de la piel es de mantener una barrera de protección, que va a ejercer la característica dura del estrato corneo, y es por lo que las estrategias desarrolladas para eficiente la permeación se basa en métodos de manipulación de esta capa, de tal manera que los compuestos puedan evadir el paso a través de esta capa, lo que implica la eliminación o abrasión, sin embargo, esta técnica representa más una aplicación cosmética que terapéutica (Franz y cols., 2021).

Se puede establecer, que los métodos físicos, estarán enfocados a seguir una vía de ingreso de moléculas o fármacos que eviten el contacto del estrato corneo, esto se logra con el uso de microagujas, en donde el compuesto puede ser inyectado específicamente a la dermis. Otras técnicas como la electroporación y la iontoforesis utilizan cambios de voltaje para generar una desorganización leve del estrato corneo y permitan el ingreso rápido de compuestos. Por su parte la magnetoforesis, fonoforesis y algunas aplicaciones de ondas fotomecánicas, que aplican energía electromagnética, ultrasónica o mecánica a la piel, para provocar una disrupción estructural transitorio, que de igual manera pueda permitir el paso de compuestos directamente a la dermis. Es importante señalar que estas técnicas, han tenido una aplicación limitada, y como técnicas complementarias a otros existentes

Por otra parte, otros métodos son los que utilizan portadores, como sistemas de liberación, como parches, microagujas, geles, liposomas, micelas, nanopartículas de biomateriales, entre otros, los cuales aparecen teniendo como objetivo llegar a un sitio localizado en la propia epidermis, con el objetivo de los compuestos se mantengan en esta zona, donde existen alteraciones estructurales o condiciones patológicas y cuyo tratamiento es importante que el compuesto o fármaco se mantenga en esta zona (Geo y Jian, 2017).

1.3.2 Sistemas de Liberación

Los sistemas de liberación, actualmente más utilizados son los denominados sistemas nanoscópicos, nanovesiculares o nanoparticulares, desde su aplicación estos sistemas fueron planteados para la vía oral y parenteral y dérmico, de hecho, estos sistemas siguen siendo objetivo de optimización, la búsqueda de marcadores específicos puede dirigir su acumulación selectiva, entre otros factores que hace este sistema muy atractivo para la administración de vacunas. Sin embargo, la aplicación de estos sistemas para la aplicación dérmica está basada en varios puntos, por una parte, esta estrategia tiene la ventaja de proteger al compuesto o fármaco que está proyectado a aplicación, esto deriva en que puede aumentar la estabilidad entonces se consideran potenciadores de la permeación, además de ser considerados como depósitos, para

una liberación sostenida. En este sentido, un sistema portador y liberados de compuestos son denominados liposomas, niosomas, nanopartículas y nanoemulsiones. Particularmente el mecanismo de acción de liberación de los liposomas para la administración dérmica de compuestos o fármacos, dado que el fármaco libre puede penetrará o atravesará de forma independiente, una vez liberado de los liposomas, es por lo que se consideran como vehículos o sistemas de liberación controlada de fármacos. Mediante el mecanismo de mejora en la permeación, donde se describe que un componente esencial como la lecitina que son una mezcla de fosfolípidos, forman las vesículas puede traspasar la berrera corneal. Esto ocurre por el mecanismo de absorción y/o fusión de las vesículas con el estrato corneo, lo que se explica por qué primeramente existe una adhesión y después la fusión con la matriz lipídica de la piel, lo que consecutivamente llevara a la permeación apendicular, la cual es la vía de permeación de compuestos de las formulaciones de aplicación tópica. Una condición establecida es la de la hidratación de los cornecitos, para que estos puedan sufrir una hidratación y de esta manera cerrar los espacios extracelulares, que son la vía apendicular (Ciu y cols., 2020).

2. ANTECEDENTES

2.1 Liposomas

Los liposomas, son análogos sintéticos de las membranas celulares o vesículas esféricas en el rango de tamaño de 0.03 μm a 10 μm y tienen una membrana compuesta por una bicapa de fosfolípidos (Figura 7). Los liposomas fueron obtenidos por primera vez por Bangham y Horne en 1964, quienes observaron que algunos lípidos forman estructuras membranosas cuando están en contacto con el agua.

A inicio de los ochenta se comienza a redescubrir que estructuras como liposomas poseen un valor potencial como sistemas de liberación. Las moléculas del fármaco pueden encapsularse en el espacio acuoso o intercalarse en la bicapa y cuya localización exacta del fármaco en el liposoma dependerá de las características fisicoquímicas del fármaco, y de la composición de los constituyentes lipídicos (Large y cols., 2021). Las aplicaciones de los liposomas se han dado en diferentes campos

de la ciencias y tecnología que van desde servir como modelos experimentales de membranas artificiales en la biofísica, además de sistema de transporte para la liberación controlada de medicamentos (Poznansky y cols., 1984), se han aplicado principalmente en la cosmética, donde algunos compuestos como vitaminas, antioxidantes o incluso péptidos son encapsulados para un mejor absorción local, en la industria alimenticia donde también las vitaminas o compuestos susceptibles de metabolismo son protegidos en las vesículas liposomales, área que se ha desarrollado como la nutraceutica (Cevc y Blume, 1992), la aplicación en la terapéutica, ha sido relevante en la administración de material genético en las vacunas y una proyección muy interesante que esta medicina genética, que implicara la introducción de genes sanos a las células, para reemplazar a los genes dañados o mutados, principalmente para en tratamiento contra el cáncer (Mastrobattista y cols., 1999).

Un gran avance significativo que los constructos liposomales, se convirtieron en el primer nano vehículo para uso clínico que fue aprobado por la FDA, como lo fue el medicamento denominado Doxil®, que es utilizado en la terapia del cáncer y cuyo principio activo es la doxorubicina. De manera general, se han iniciado interesantes perspectivas acerca de las posibilidades de los sistemas liposomales, ya que por su funcionalidad y versatilidad podrían presentar ventajas como que sus componentes poseen baja toxicidad, aumentan la vida útil de la circulación del fármaco, se acumulan en sitios específicos, tienen una alta relación superficie volumen, permiten la liberación controlada de fármaco además de mencionar que los liposomas son únicos como transportadores de fármacos que pueden encapsular fármacos con polaridades muy variables de naturaleza hidrófoba en medio de la membrana y de naturaleza hidrofílica dentro de su interior acuoso (Lui, 2000). Es importante también señalar que algunas desventajas de los liposomas son la baja estabilidad de almacenamiento relacionada principalmente con los procesos de oxidación, fuga de fármacos encapsulados, altos costos para los fosfolípidos sintéticos, escasa eficiencia de encapsulamiento de los fármacos hidrófilos, membrana inestable que produce un comportamiento con fugas, vida media corta.

2.1.1 Componentes y estructura de los Liposomas

Los liposomas son constructos de estructura esférica (dada su forma más estable fisicoquímica) con un centro acuoso, que está delimitado por la membrana, que es una doble capa lipídica (Navarro-Tovar, 2018). Sin embargo, a la estructura básica de los liposomas que son fosfolípidos, se le puede incorporar otras estructuras como polisacáridos, esteroides y tensioactivos naturales o sintéticos (Figura 8), (Bozzuto y Molinari, 2015).

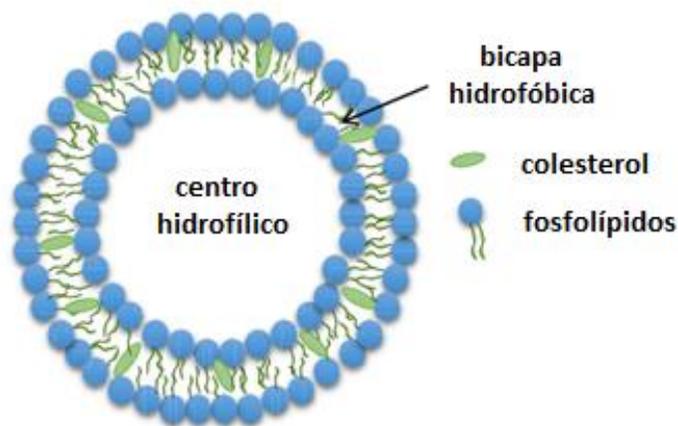


Figura7. Estructuras de los liposomas. Bozzuto y Molinari, 2015

2.1.1.1 Fosfolípidos

Los fosfolípidos son moléculas anfipáticas, cuya zona que es hidrófoba, que están formadas por varias cadenas hidrocarbonadas, estos compuestos son miembros de ácidos grasos. La función biológica que tienen está relacionada con la estructura de las biomembranas y además de constituir metabólicamente una fuente importante de almacén de energía. Se forman también por grupos fosfatos, de ahí su nombre y además de alcoholes, y dos o más ácidos grasos. Dada las características de su estructura contendrán zonas polares solubles en agua y zonas hidrofóbicas, dando su característica anfipática. De hecho, la razón de la presencia de lípidos de la membrana celular podría ser simplemente que estas estructuras anfipáticas tienen en común la

capacidad de organizarse como bicapas en un ambiente acuoso, regulan el grupo de cabeza y la repulsión electrostática de un fosfato no protonado a un pH de 7 (Large y cols., 2021). Los tipos de fosfolípidos que se han utilizado para la elaboración de liposomas son: fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico y fosfatidilinositol. De estas estructuras, las fosfatidilcolinas son el mayor de los fosfoglicéridos los cuales pueden ser obtenidos de fuentes naturales o sintéticas, son también conocidas como lecitinas y son extraídas de plantas y animales (como fuentes primarias: yema de huevo y soya), están compuestos por una mezcla de fosfatidilcolinas variando la longitud de la cadena y el grado de saturación. Los lípidos sintéticos, que no se producen de forma natural ni se derivan de fuentes vivas, se sintetizan comercialmente y se utilizan con frecuencia como componentes de liposomas terapéuticos. Aunque estos materiales no son endógenos, son biológica y estructuralmente similares a los lípidos naturales, muestran una alta biocompatibilidad y se sintetizan con alta pureza. Los lípidos sintéticos comúnmente utilizados incluyen fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas y fosfatidilglicerol, como 1,2-dioleoil-glicerol-3-fosfocolina (DOPC), 1,2-dioleoil-glicerol-3-fosfoetanolamina (DOPE) y dioleoil-fosfatidilglicerol (DOPC), respectivamente. Los lípidos sintéticos a menudo se eligen en lugar de los lípidos naturales debido a su pureza, disponibilidad comercial, funcionalidad química y rentabilidad (Large y cols., 2021). Entonces la elección del tipo de fosfolípido cuando se prepara el sistema liposomal, deberá estar en concordancia con el tipo de compuesto a encapsular, la aplicación y recordar siempre que la inclusión de fosfolípidos dotara a la preparación de carga que deberá estar en ciertos rangos, para que la emulsión sea estable, ver después el concepto de potencial zeta, en la sección 2.1.6.4).

2..1.1.2 Esteroles

Los esteroles son una clase de moléculas de lípidos, presentes en casi todos los organismos vivos. Existen tres subtipos de esteroles: fitoesteroles, zooesteroles y micoesteroles, que se encuentran en plantas, animales y microorganismos, respectivamente. El colesterol es un zoosterol anfifílico endógeno y es parte de la

estructura de las biomembranas celulares. Dentro de la membrana celular, el colesterol se limita principalmente a las balsas lipídicas y tiene una función en la regulación de la integridad de la membrana y por ende su funcionalidad. La incorporación de colesterol en las formulaciones liposomales ha demostrado una mayor estabilidad en vivo y disminución de la fuga a través de la bicapa lipídica, lo que resulta en la liberación prolongada y controlada de la carga de compuestos. La incorporación de 20–50% mol de colesterol en formulaciones liposomales demostró una eficiencia de encapsulación reducida y mayor estabilidad en vivo, en relación con los controles que carecen de colesterol. Los liposomas ricos en colesterol se mantuvieron estables en el torrente sanguíneo durante más de 6 horas, mientras que los liposomas libres de colesterol solo se mantuvieron estables durante unos minutos, además el colesterol condensa el empaquetamiento de fosfolípidos en bicapas. La concentración de colesterol en formulaciones liposomales afecta la liberación de compuestos solubles en agua y a medida que aumenta la concentración de colesterol, aumenta la velocidad de liberación del fármaco (Nakhaei y cols., 2021).

2.1.1.3 Polisacáridos

Los polisacáridos son carbohidratos poliméricos de cadena larga que consisten en monosacáridos unidos por enlaces glucosídicos. Los polisacáridos tienen una función importante en la comunicación células y están presentes en las membranas celulares para ayudar en los procesos de reconocimiento de células y tejidos, así como ciertos mecanismos de transporte. Recubrir la membrana lipídica con oligosacáridos o polisacáridos puede dirigir los liposomas a los receptores celulares o extender la circulación. Los polisacáridos tienen propiedades adicionales que los hacen un componente muy adecuado para su utilización en sistemas o formulaciones farmacéuticas para la administración de fármacos, dado que son biocompatibles y pueden tener propiedades antivirales, antibacterianas y antitumorales. Las superficies mucosas del cuerpo son objetivos particularmente buenos para el reconocimiento de polisacáridos, por lo que las rutas del epitelio nasal, pulmonar, oral y gastrointestinal se investigan intensamente para identificarlas con liposomas recubiertos de

polisacáridos. Los polisacáridos populares utilizados en las formulaciones liposomales son el quitosano y hialuronano (Large y cols., 2021).

2.1.1.4 Surfactantes

Los surfactantes son tensioactivos se clasifican como moléculas con propiedades de detergente, ya que reducen la tensión superficial del líquido en el que son incorporados. Los tensioactivos, comúnmente denominados activadores de bordes son aditivos útiles en las formulaciones de liposomas. Los activadores de bordes suelen ser tensioactivos de una sola cadena de acilo que sirven para desestabilizar la bicapa lipídica de las nanopartículas liposomales, lo que aumenta la deformabilidad de los vasos. Se demostró que los activadores de borde aumentan la capacidad de penetración dérmica de los liposomas en la lucha contra el cáncer y antifúngico y aplicaciones transdérmicas. Los activadores de bordes utilizados con frecuencia incluyen: colato de sodio, span 60, span 80, tween 60 y tween 80. La carga de los activadores de bordes también se puede utilizar para aumentar la eficacia terapéutica. Por ejemplo, el uso de colato de sodio, con un potencial zeta positivo, se une electrostáticamente con componentes cargados negativamente como el ADN. El tipo y la concentración del surfactante pueden mejorar la eficacia terapéutica de la administración de genes y fármacos encapsulados en liposomas (Large y cols., 2021).

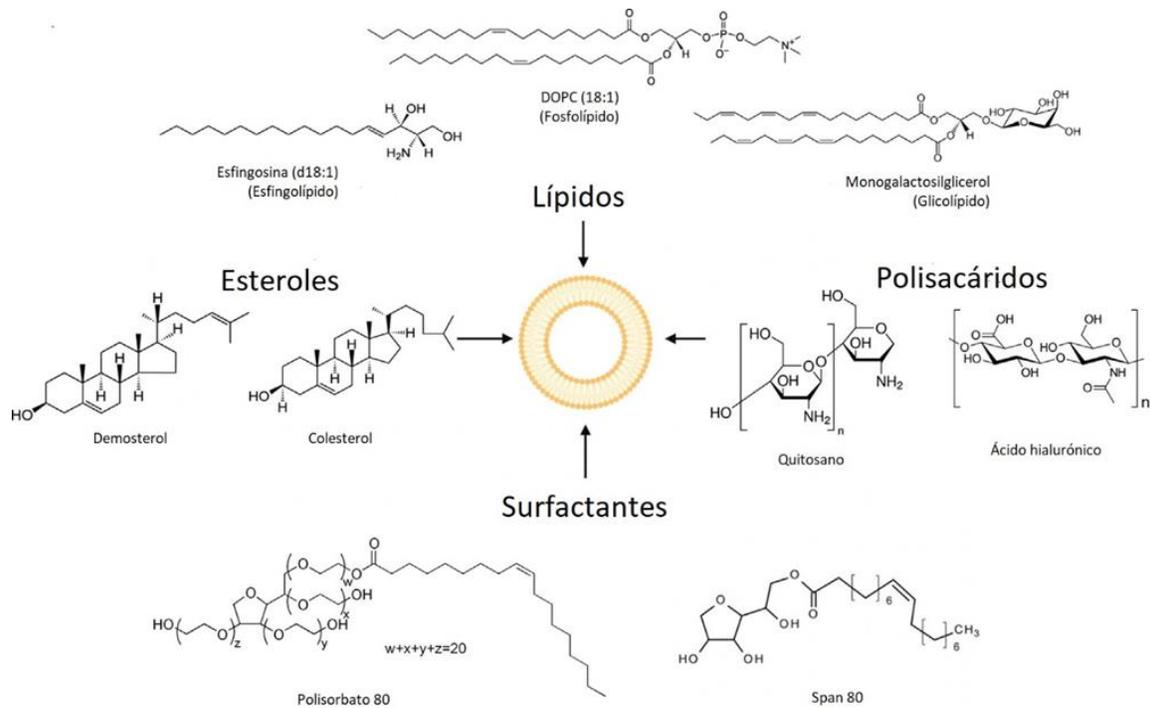


Figura 8. Composición de los liposomas. Large y cols., 2021

2.1.2 Tipos de liposomas

De manera general, los liposomas se han clasificado según su tamaño y lamelidad, así como en función del método de preparación (Figura 9).

Existen dos clasificaciones de los liposomas según su número de capas: unilamelares, si solamente tienen una lamela, es decir, si sólo cuentan con una bicapa, y multilamelares, es decir que cuentan con varias bicapas. Dentro de la clasificación unilaminar, encontramos tres subgrupos: las SUV (*Small unilamellar vesicle*) por sus siglas: vesículas pequeñas unilamelares, las cuales tienen un rango de tamaño de 20 nm a 80 nm. El siguiente subgrupo: las LUV (*Large unilamellar vesicle*), vesículas unilamelares grandes, que tienen un rango de tamaño de 80 nm a 1000 nm, y el tercer subgrupo: las GUV (*Giant unilamellar vesicle*), vesículas unilamelares gigantes, las cuales tienen un tamaño aproximado de 1 micra. La clasificación de vesículas

multilaminares, se refieren a las vesículas multilaminares con un tamaño aproximado de 500 nm. Existen factores que afectan la disposición y en general la forma de los liposomas, como: su composición, el método de preparación, e incluso el estado de las bicapas de las vesículas (Has y Sunthar, 2020).

Los sistemas liposomales, también pueden ser caracterizados por el volumen interno y la lamelaridad. El volumen interno, definido como el volumen encerrado por una cantidad de lípidos, puede variar entre 0.2 a 1.5 litros por mol de lípido para las vesículas unilamelares pequeñas y de 1 a 4 litros por mol de lípidos para vesículas multilaminares, por lo que depende del número y tamaño de lamelas por vesículas. La ventaja de las vesículas unilamelares grandes es que el volumen capturado es mayor, y por ende mayor encapsulación de compuestos o fármacos (Large y cols. 2021).

Otra clasificación surge de la consideración de que los liposomas clásicos, pueden ser inestables y por ello limitar la permeabilidad de la piel. Para superar estas limitaciones, se han clasificado nuevas vesículas lipídicas conocidas como deformables o liposomas elásticos o flexibles que se desarrollaron desde la década de 1990 (Manosro y cols., 2009).

Típicamente estos liposomas han demostrado una gran habilidad para atravesar la piel intacta y entregar los compuestos encapsulados hacia la epidermis y las capas de la dermis o incluso hacia la circulación sistémica. Para ello, se ha incorporado en su estructura etanol, sales biliares y otros tensioactivos para su preparación. Estos componentes se consideran no tóxicos y en cambio son estructuras termodinámicamente más estables. Estos se clasifican en transfersomas, etosomas y, más recientemente, transetosomas (Ascenso y cols. 2015).

Los transfersomas son nanovesículas elásticas formadas esencialmente de fosfolípidos y activadores de borde como el sodio colato (NaCo), desoxicolato de sodio, span 60, span 65, span 80, tween 20, tween 60, tween 80 y glicirinato dipotásico. La única desventaja de estas vesículas corresponde a la dificultad de cargar fármacos hidrofóbicos en las vesículas sin comprometiendo su deformabilidad y propiedades elásticas (Romero y Morilla, 2013; Opatha y cols., 2020)

Los etosomas son un tipo especial de tamaño de aproximadamente 150 a 200 nm y alta deformabilidad, los sistemas etosomales son vesículas que consisten esencialmente de fosfolípidos, agua y una elevada cantidad de etanol. Los fosfolípidos se pueden usar en un rango de concentración de 0.5% a 10% y se obtienen a partir de fosfolípidos sintéticos, semisintéticos o naturales como la soja y el huevo (fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilcolina). El etanol se puede usar al 20% a 45%, funcionando como un eficaz potenciador de la piel, esta molécula interactúa con el grupo de cabeza polar de las moléculas lipídicas de la capa cornea, aumentando así la fluidez de las bicapas lipídicas y la permeabilidad membranal de la célula (Touitou y cols., 1997).

Los transetosomas son vesículas lipídicas basadas en transfersomas y etosomas. Estos nuevos liposomas flexibles, son relativamente nuevos, pues se introdujeron por primera vez por Song y cols., en 2012 y se caracterizan por tener también un alto contenido de etanol de hasta un 30% y también con la incorporación de un activador de borde.

Se ha clasificado también como niosomas a los liposomas clásicos que en su estructura ingresan colesterol para dar estabilidad a las membranas que se forman en las vesículas, y dependerá del compuesto a encapsular, la decisión de integrar este esterol en la estructura (Moghataderi y cols., 2022).

2.1.3 Métodos de Elaboración de Liposomas

Existen diferentes métodos involucrados en la preparación de liposomas. En general, desde Bangham y Horne en 1964, prepararon los primeros liposomas, actualmente, existen una gran variedad de métodos que existen para la preparación de liposomas. Los liposomas se pueden formular utilizando diferentes enfoques. El proceso de fabricación de los liposomas y el tipo de fosfolípidos afectan de manera crítica las características finales de los liposomas.

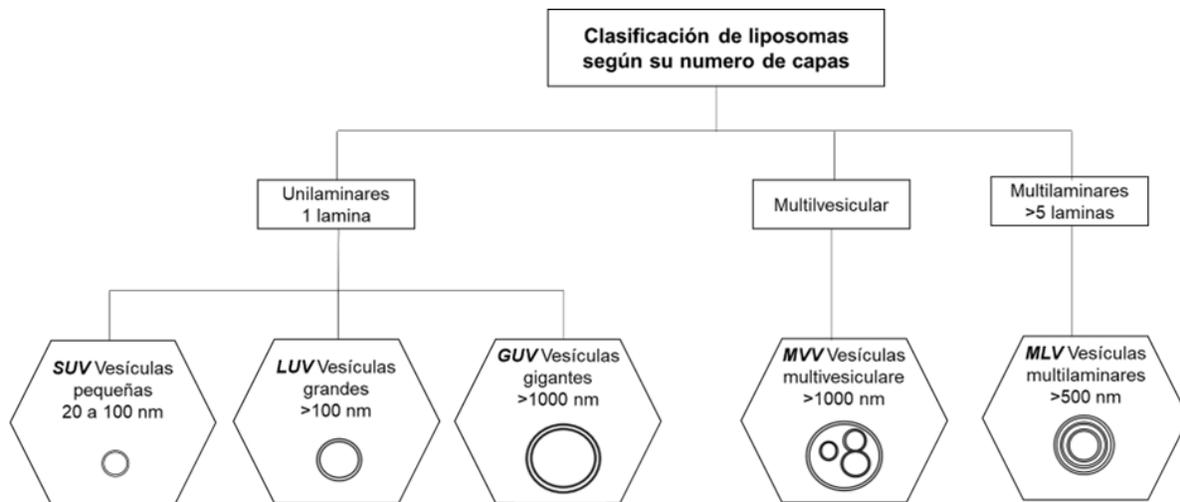


Figura 9. Clasificación de los liposomas según número de capas. SUV: Vesículas pequeñas unilamelares, LUV: Vesículas grandes unilamelares, GUV: Vesículas gigantes unilamelares, MVV; Vesículas multivesiculares, MLV; Vesículas multilamelares. Dibujo propio.

2.1.3.1 Método de Hidratación de Película Delgada

El método de hidratación de película delgada es prácticamente el método denominado Bangham, donde se utiliza un solvente orgánico (diclorometano, cloroformo, etanol o mezclas de cloroformo con metanol) que se utilizan para disolver a los lípidos, además, este puede ser eliminado por evaporación, al vacío o a una temperatura de 45 a 60°C para formar una película lipídica fina. Posteriormente, la fina película lipídica se hidrata en medios acuosos mediante agitación continua hasta 2 horas a una temperatura de 60-70°C, donde se hincha para producir liposomas cerrados redondos. Este método tiene las ventajas de ser un proceso sencillo, enfoque directo, se utiliza para todo tipo de mezclas de lípidos. Tiene las desventajas de que los fármacos solubles en agua exhiben una baja eficiencia de atrapamiento, dificultad para escalar, la eliminación del disolvente orgánico es problemática, las vesículas grandes sin control de tamaño de partícula, el método que requiere mucho tiempo y se necesita esterilización (Zang, 2017).

2.1.3.2 Método de inyección de Solvente

El método de inyección de solvente: etanol/éter, es un método descrito desde los años 70s (Batzri y Korn, 1973), método donde los lípidos deben disolverse en un solvente orgánico (éter dietílico o mezcla de éter-metanol o etanol), seguido de la inyección de la solución mixta en la fase acuosa, donde el material debe encapsularse a 55–65°C o menos, como el éter no es miscible con medios acuosos, es necesario calentarlo para evaporar el disolvente orgánico de los liposomas preparados. Las ventajas son: el método es simple, rápido, reproducible y está listo para usar, puede formar un producto de liposomas concentrado con mayor eficiencia de atrapamiento. Las desventajas son: una mezcla inadecuada puede producir liposomas heterogéneos, la eliminación del etanol es difícil porque forma un azeótropo con el agua, varias macromoléculas biológicamente activas son inactivas incluso en presencia de pequeñas cantidades de etanol.

2.1.3.3 Métodos de Evaporación de Fase Inversa

Los métodos de evaporación de fase inversa fueron inicialmente descrito por Szoka y Papahadjopoulos (1978), constituye una técnica en donde los Constituyentes lipídicos de los liposomas inicialmente se disuelven en un disolvente orgánico y los fármacos si fueran hidrosolubles deseados se disuelven en un medio acuoso; además, la mezcla se somete a ultrasonidos para producir emulsión tipo w/o u micelas invertidas, seguido de una eliminación lenta del disolvente orgánico utilizando un evaporador rotatorio, lo que conduce a la conversión de estas micelas en un estado viscoso o producto de gel. En este proceso, en un punto crítico, el estado de gel colapsa y se distribuyen algunas micelas invertidas. El exceso de fosfolípidos forma la bicapa alrededor de las micelas residuales que da como resultado la conformación de liposomas. La principal ventaja de este método es que el liposoma obtenido tiene una alta eficacia de encapsulación (alrededor del 80%), además de ser un proceso sencillo, eficacia de encapsulación adecuada, se utiliza para encapsular pequeñas, grandes y macromoléculas y desventajas de uso de gran cantidad de disolvente orgánico, no apto para transportar

y entregar moléculas frágiles como los péptidos, requiere mucho tiempo y esterilización (Handa y Hermmann, 1985).

2.1.3.4 Métodos de Remoción de Detergente

El método de agotamiento del detergente se utiliza para fabricar liposomas homogéneos para diversas aplicaciones de administración de fármacos. Este método determina la solubilidad de los lípidos mediante la adición del detergente adecuado en un disolvente orgánico en su concentración crítica de micelas para producir micelas de lípidos detergentes. Una vez que se elimina el detergente, las micelas se vuelven cada vez más ricas en fosfolípidos y finalmente se combinan para formar liposomas. Los detergentes deben eliminarse mediante diálisis y se utiliza un dispositivo comercial llamado LipoPrep. La diálisis se realizó en bolsas de diálisis colocadas en tampones grandes sin detergente. El tamaño y la uniformidad de los liposomas por el método del detergente depende de la velocidad y el grado de eliminación del detergente y de la proporción de fosfolípidos a detergente. Las ventajas son: buen control del tamaño de partícula es un proceso sencillo, el producto es homogéneo y las desventajas son: baja concentración de liposomas en la solución final, bajo atrapamiento de fármaco lipofílico, proceso que consume mucho tiempo, se eliminan diminutos compuestos solubles en agua durante la eliminación del detergente (Lasch, 2003).

2.1.3.5 Métodos de Calentamiento

El Método de calentamiento, en este método, los fosfolípidos se hidratan con la ayuda de glicerol, PEG/etilenglicol con agitación continua durante 1 h a 60°C o 120°C. Después de enfriar, la mezcla debe centrifugarse a 4000 rpm durante 15 min para obtener los liposomas. Los liposomas producidos por este método no sufren degradación ni deterioro de los fosfolípidos y la esterilización no es obligatoria ya que este proceso implica alta temperatura, a 120°C. Existe un método mejorado por calefacción, en el que los componentes lipídicos se hidratan en medio acuoso seguido por calentamiento de los componentes sin utilizar disolventes orgánicos, lo que permite su estabilidad. Las ventajas son que es un proceso simple y rápido, que no contamina

al no utilizar disolventes orgánicos, no se necesita esterilización. Las desventajas son baja eficacia de encapsulación requiere alta temperatura y posible degradación de fosfolípidos y fármacos (Mortazavi y cols., 2007).

2.1.3.6 Técnicas para Alterar el Tamaño de Partícula

Alternativamente de los métodos generales para la elaboración de los liposomas, existen técnicas alternativas para la reducción del tamaño de partícula, que pueden combinarse con alguno de los métodos para optimizar el tipo de liposomas y tamaño (Figura 10).

2.1.3.6.1 Técnica de Extrusión de Membrana

El Método de extrusión de membrana, es un método es ampliamente utilizado para la conversión de MLV en SUV y LUV. El tamaño de los liposomas se reduce haciéndolos pasar por el filtro de membrana de policarbonato, que tiene un tamaño de poro específico a baja presión (<100 psi). Antes extrusión, los LMV se ven interrumpidos por los ciclos de congelación y descongelación y prefiltrado a través de un tamaño de poro grande de 0.2 a 1 μm . En este proceso, el contenido de las vesículas se extruye varias veces con el medio de dispersión durante la ruptura y resellado de capas de fosfolípidos a medida que pasan a través la membrana de policarbonato. El tamaño medio de las vesículas obtenido por extrusión disminuye con el aumento de la presión transmembranal , así como el numero ciclos Los liposomas formados se denominan vesículas unilaminares grandes por extrusión y poseen un tamaño de partícula que va desde 120 a 140 nm. Las ventajas son que es un proceso simple y rápido, hay buen control del tamaño de las partículas y no hay contaminación (muy común por disolvente orgánico), existen varios tamaños de poro de membrana/filtros disponibles para producir liposomas. Las desventajas son que no es apto para procesamiento a gran escala, hay posibilidad de obstruir los poros, limitación en la producción a gran escala, fragilidad de membrana/filtro, flujo lento a través de la membrana/filtro (Zhang, 2017).

2.1.3.6.2 Técnica de Homogenización

La homogeneización de alto cizallamiento es un método ampliamente utilizado para la reducción del tamaño de los liposomas y lamellaridad. Durante la homogeneización, la suspensión liposomal se bombea continuamente a través de un orificio, y a muy alta presión, choca con una pared de acero inoxidable en el sistema homogeneizador para producir liposomas de menor tamaño. Las ventajas son: adecuado para la producción a gran escala, buen control del tamaño de las partículas y las desventajas son: distribución del tamaño de los liposomas es bastante amplia y variable, posible contaminación por metales y aceites y uso de muy alta presión (Wang y cols., 2017).

2.1.3.6.4 Técnica de Sonicación

El método de sonicación es ampliamente utilizado para la preparación de liposomas, existen 2 técnicas de sonicación; la sonicación por sonda y la sonicación en baño. De estos, la primera opción una punta se sumerge directamente en la dispersión de liposomas, el aporte de energía a los lípidos la dispersión es muy alta, y la energía de acoplamiento en la punta conduce a la calefacción, en ocasiones el recipiente donde se sónica debe colocarse en un baño de agua/hielo durante todo el proceso hasta 1 hora. Se puede des esterificar más del 5% de los lípidos y el titanio puede contaminar la solución. La otra opción es en baño de sonicación: aquí la dispersión de liposomas se toma en un cilindro y se coloca en un sonicador de baño, donde la temperatura debe controlarse en contraste con la sonda sonicación. El material que se somete a ultrasonidos se puede proteger en un recipiente estéril bajo una atmósfera inerte. Las ventajas son: que es un proceso sencillo, se controla el tamaño de las partículas. Las desventajas son que puede formar liposomas de muy baja eficacia de encapsulación/volumen interno y posible degradación de fosfolípidos y compuestos, eliminación de moléculas grandes, contaminación por metales del sonicador de la sonda y presencia de MLV junto con SUV (Mendez, 2023).

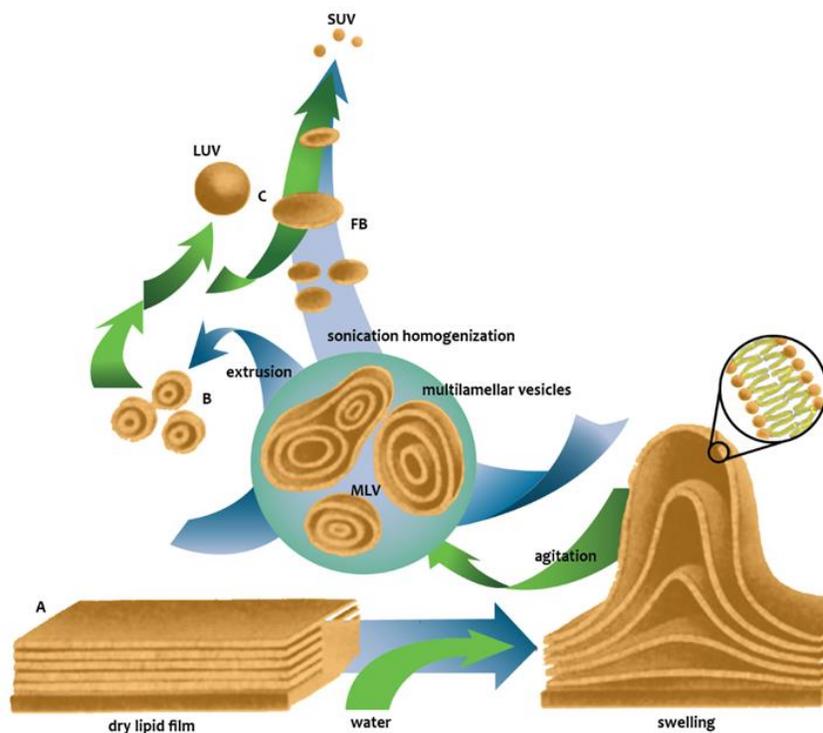


Figura 10. Técnicas para disminuir tamaño de partícula de liposomas.
Tomado de herberlab.com

2.1.4 Caracterización de Liposomas

La caracterización de las vesículas liposomales nos indica información de su tamaño y diámetro, detalles de su estructura y su forma, en concreto del tipo de laminar y de la distribución de los tamaños, así como el grado de atrapamiento de los fármacos en su estructura y su cinética de liberación. En su forma comercial, una prueba final es la absorción percutánea o estudios de permeación en modelos de piel de animal o humana. En ocasiones estas características han constituido algunos requerimientos de calidad establecidas en las algunas guías de la OCDE (Organización para la Cooperación y el desarrollo económico), guías 428 (2004) y la guía de absorción dérmica por la OMS (2006). También la FDA cuenta con un guía para la industria en cuanto a la fabricación y control de productos liposomados, encaminados a su

biodisponibilidad y bioequivalencia, cuando estos productos son administrados por vía oral (FDA, 2018).

2.1.4.1 Tamaño y Diámetro de Liposomas

El tamaño de los liposomas es un factor importante para establecer y predecir la velocidad de liberación in vivo del fármaco cargado en los liposomas (Guimarães y cols., 2021). El tamaño promedio de los liposomas depende principalmente del método de preparación y la composición de fosfolípidos, entre otros factores. El tamaño suele ser de importancia, si se considera que los liposomas de menor tamaño, podrían ser receptores más eficientes para entrega o liberación a los fármacos que contengan y que la distribución de este tamaño, indicaría un proceso de elaboración eficiente. Para el análisis de estos factores, se han utilizado varios métodos para evaluar el tamaño y como no todos los liposomas producidos serán del mismo tamaño, lo que se determina en realidad es la distribución de tamaño, dichas técnicas utilizadas son la microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía electrónica de transmisión (TEM). Las técnicas SEM y TEM, se utilizan para obtener imágenes de los liposomas y también proporciona información sobre el grosor y la distancia entre bicapas de liposoma. Otro método recientemente utilizado es la microscopía de fuerza atómica (MFA), que consta de una microscopía de sonda de barridos, pero que produce micrografías tercera dimensión de muy alta resolución en escala de los nanómetros y Angstrom (Å), para evaluar la morfología, la estabilidad, el tamaño y el proceso dinámico de los de lípidos de liposomas (Baxa, 2018).

Las técnicas hidrodinámicas como la ultracentrifugación, fraccionamiento de flujo de campo y cromatografía de exclusión en gel y procedimientos de centrifugación analítica se utilizan para estimar la masa molecular del compuesto y también se utiliza para comparación y distribución de tamaño, características de elución y uniformidad de los liposomas. También existen otras técnicas como las de dispersión de láser y dispersión de luz cuasi-elástica y espectroscopía de fotones que da también información sobre el tamaño de las vesículas lipídicas (Ashizawa, 2019). Liposomas de $< 1 \mu\text{m}$ de diámetro se puede estimar utilizando estas técnicas. El tamaño de los

liposomas debe ser monitoreado y establecido para objetivos diferentes como uso parenteral, uso tópico o para inhalación.

2.1.4.2 Determinación de Lamelaridad

La lamelaridad se define como el número de bicapas lipídicas presentes alrededor de las vesículas lipídicas. La lamelaridad liposomal puede ser medido mediante criomicroscopia electrónica, resonancia magnética y técnica de dispersión de rayos X de ángulo pequeño que proporcionan información sobre el tamaño, homogeneidad y lamelaridad de los liposomas (Frederik y Hubert, 2005).

2.1.4.3 Índice de Polidispersidad

El índice de polidispersidad, también es conocido como índice de heterogeneidad, y es un valor numérico que se utiliza para describir el grado de no uniformidad de una distribución de tamaño de partículas. Tanto el tamaño de partícula como el índice de polidispersidad, se determinan por medio del método de dispersión de luz dinámica, lo cual se utiliza para el análisis del diámetro hidrodinámico de nanopartículas que tienen un rango de tamaño de 20 a 600 nm, aunque muchos instrumentos poseen un rango de trabajo de 0.3 nm a 10 μm . El instrumento DLS detecta el haz disperso de luz láser con un detector de fotones y la intensidad de la luz dispersada es proporcional al tamaño de las nanopartículas que están en movimiento browniano y se correlaciona con el tamaño de la partícula en el medio.

La dispersión de la luz es una técnica experimental basada en la interacción de radiación con la materia. El campo electromagnético de la luz incidente provoca un momento dipolar oscilante en las moléculas del medio. La luz irradiada por el dipolo, que se denomina luz dispersada, tiene la misma frecuencia que la radiación incidente y una intensidad menor como de 10^4 a 10^6 veces menor. Los fundamentos técnicos de la dispersión de la luz, se basa en la teoría de la dispersión, que al aplicar a pequeñas partículas esféricas no varía la frecuencia. El método de dispersión de luz dinámica o dispersión cuasi elástica de luz permite obtener información dinámica de la difusión y velocidad sobre partículas que se mueven al azar o movimiento browniano.

La luz dispersada por una solución polimérica o coloidal puede dar información sobre su estructura, interacciones y dinámicas de las macromoléculas. Los campos eléctrico y magnético que componen la radiación oscilan con la misma frecuencia, como el efecto del campo magnético sobre la materia es mucho menor que el eléctrico se puede despreciar el primero. El campo eléctrico desplaza incidente desplaza las cargas de la molécula creando en ella un dipolo inducido. Para el análisis de tamaño de partícula, el rango buscado para los liposomas con CBD unilamelares grandes será de 300 nm a 500 nm, ya que las partículas más pequeñas proporcionan un área de superficie más grande. El valor máximo para el índice de polidispersidad (PDI) es 1 y cuanto más se aproxime a cero, esto indicara que la disolución contine vesículas mono dispersas y la distribución es unimodal, de manera que los valores esperados o ideales son para vesículas, menores a 0.5 y para liposomas menores a 0.2 (Kumar y cols., 2021).

2.1.4.4 Potencial Z

Los liposomas forman soluciones emulsionadas y su composición lipídica les confiere cierta carga positiva y negativa que definen la carga superficial general (Smith y cols., 2017). Una medida definida es el potencial Zeta, que determina la estabilidad coloidal y proporciona información sobre la magnitud de la carga en la superficie de las partículas en dispersión acuosa y por lo tanto permite predecir la estabilidad física a largo plazo de las formulaciones. Por ello, el potencial Zeta está definido por la naturaleza de la superficie de las partículas y es una función del entorno en el que residen los liposomas, la concentración de la muestra utilizada para llevar a cabo la medición, además de la naturaleza del disolvente, el pH, la fuerza iónica y concentración de los electrolitos en solución (Figura 11). El valor del potencial Zeta se obtiene a partir de la movilidad electroforética y se utiliza la técnica de Electroforesis Laser Doppler (ELD), que indica la variación de frecuencia de cualquier tipo de onda emitida o recibida por una partícula en movimiento. Para ellos se utiliza un equipo denominado Zetasizer Nano, esta técnica utiliza un par de haces laser coherentes procedentes de una única fuente y enfocado mediante unos espejos hacía un punto

concreto de la celda de medida en la cual se cruzan, iluminando a las partículas que pasan. Este punto está localizado sobre la capa estacionaria, en el cual el efecto de la electroósmosis es nulo, por lo que la velocidad de las partículas es únicamente su velocidad electroforética. La luz dispersada se detecta en un detector enfocado hacia el punto de cruce de haces, el cual alimenta un corredor digital que determina la función de autocorrección, a partir del cual se obtiene la movilidad electroforética de las partículas.

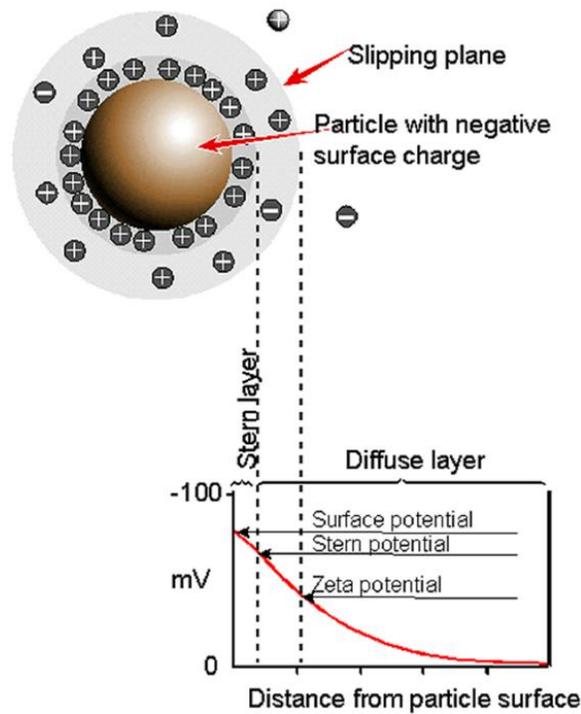


Figura 11. Potencial Zeta.

Tomado de malvernanalytica.com

En términos generales el potencial eléctrico en el límite de la doble capa se conoce como potencial Zeta de las partículas y tiene valores que normalmente oscilan entre +100 mV y -100 mV. La magnitud del potencial zeta predice la estabilidad coloidal. Las nanopartículas con valores de Potencial Zeta inferiores a +25 mV o superiores a

-25 mV suelen tener bajos grados de estabilidad. Las dispersiones con un valor potencial zeta bajo eventualmente se agregarán debido a las atracciones entre partículas de Van Der Waal (Clogston y Patri, 2011). De manera importante el potencial Zeta es un factor clave que afecta la administración dirigida de liposomas con fármacos, repercutiendo en su captación celular y biodistribución. Esta metodología, también nos puede dar un valor de tamaño de partícula promedio y el índice de polidispersidad o rango de tamaño de partícula.

2.1.4.5 Eficiencia de Encapsulación

La eficiencia de encapsulación se define como el porcentaje de compuesto o fármaco que es integrado a una estructura liposomal y se puede determinar al finalizar su preparación, mediante la cuantificación del fármaco en la fase acuosa. Esta medida es expresada como porcentaje de atrapamiento de fármaco. La eficiencia de encapsulamiento se calcula mediante la fórmula:

$$\%EE = (Cantidad\ inicial - Cantidad\ libre) / (Cantidad\ inicial) \times 100.$$

En general, la eficiencia de atrapamiento de los ingredientes activos en los liposomas suele ser superior al 70%. Sin embargo, según la metodología de inyección de etanol, debería alcanzarse un porcentaje arriba del 80%. Es importante especificar que una mejora en el porcentaje del atrapamiento aumentará la biodisponibilidad del fármaco (Fan y cols., 2021).

Existen diversos métodos, que además de separar los liposomas de la solución acuosa en donde quedan emulsionados, permiten la purificación de estos, tales métodos son pueden ser por extracción en fase sólida, cromatografía de exclusión por tamaño, utilizando microcolumnas o métodos de ultrafiltración en centrífuga de fibra hueca, que, mediante poros, permiten la separación selectiva de liposomas. El método indirecto utilizado para medir la eficacia de la encapsulación es la cantidad del valor de fármaco no encapsulado que debe deducirse de la cantidad total del compuesto para ser utilizado.

2.1.4.6 Estudios de Liberación por Diálisis

Los métodos de difusión de membranas (como los métodos de diálisis) son los métodos más investigados para las pruebas *in vitro* de liberación y de disolución de los sistemas de nanopartículas, como son los liposomas. En estos métodos, los sistemas de liposomas se separan del medio de liberación a través de membranas de diálisis que son permeables al CBD libre pero impermeables a los liposomas. Los métodos de diálisis se han utilizado ampliamente para investigar perfiles de disolución/liberación de fármacos de liposomas, emulsiones, nanopartículas poliméricas, así como nanoportadores lipídicos. Originalmente, las pruebas de liberación basadas en procedimientos de diálisis se aplicaron a prueba de muchas formas de dosificación diferentes, como soluciones de depósito oleosas parenterales, supositorios, suspensiones orales, así como implantes y por supuesto liposomas. En los métodos de diálisis, la separación física de las formas de dosificación se logra mediante el uso de una membrana de diálisis que facilita la toma de muestras a intervalos periódicos (Yu y cols., 2019).

La velocidad de liberación del compuesto o fármaco desde los liposomas es un buen indicador de efectividad, dado que no solo es importante que el principio activo sea integrado en la estructura liposomal, sino que este principio pueda ser liberado, la velocidad de liberación será importante si se desea un sistema de efecto de corto o largo alcance. Los estudios de liberación de fármacos *in vitro* se evalúan bajo condiciones fisiológicas similares al organismo, esto es a 37°C en una bolsa de diálisis. La bolsa debe sumergirse en un medio receptor que es una solución amortiguadora de pH 7.4 con agitación constante en un baño maría controlado, lo que imita las condiciones *in vivo*. A ciertos lapsos de tiempo, se recolecta un volumen requerido del medio, en un tubo para su posterior análisis, al mismo tiempo se añade un volumen igual de medio amortiguador a los medios receptores, para que el volumen total no sea alterado. La concentración del compuesto se puede determinar mediante diversos métodos analíticos como Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) o espectrofotometría UV-Visible.

Los perfiles de liberación se analizan mediante el curso temporal de la concentración del compuesto o fármaco. Para la determinación de la cinética que puede ajustarse mejor podría explicar el proceso de liberación, para ello se ajustan los datos experimentales a modelos matemáticos que describen el curso temporal del proceso de difusión (Figura 12). Las más adecuadas son las funciones de orden cero, primer orden, Higuchi con base fisicoquímica y Weibull sin base fisicoquímica y Korsmeyer-Peppas (Wu y cols., 2019). Sin embargo, una ecuación general puede ser la de Korsmeyer-Peppas, cuya ecuación es: $Mt/M^\infty = Kt^n$

Donde Mt/M^∞ es la fracción de masa al tiempo t y masa total, K es la constante de liberación y n es el comportamiento tipo Fick cuando es menor a 0.45 y tipo no Fickiano cuando su valor es entre 0.5 y 0.8.

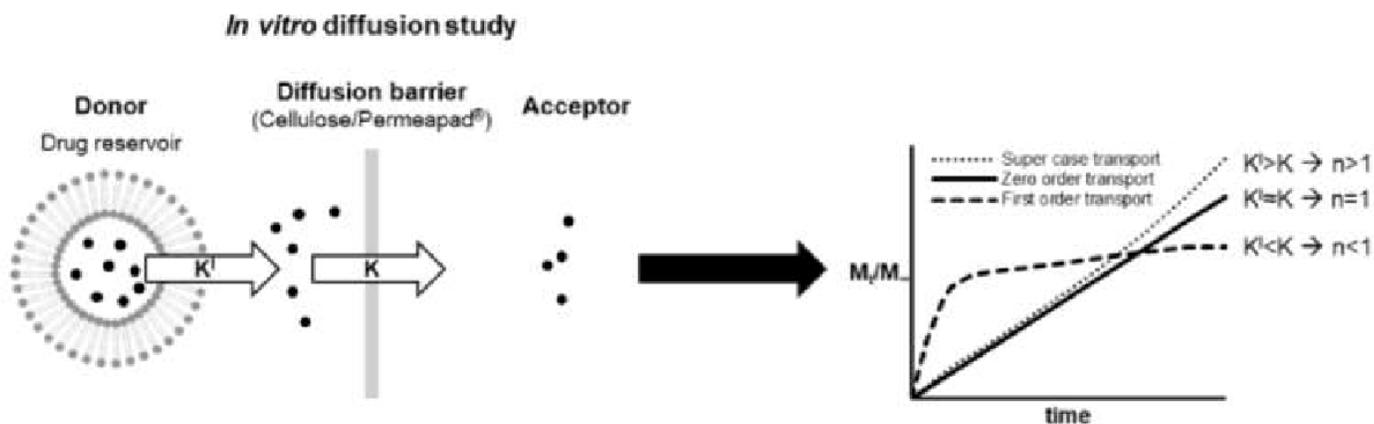


Figura 12. Representación gráfica de la cinética de liberación y su modelo matemático. Yu y cols., 2019.

2.1.4.7 Estudios de Permeación en Piel *In vitro*

La permeabilidad o grado de penetración de compuestos a través de membranas tipo piel, se ha establecido como un parámetro muy importante que deben ser evaluados en estudio *in vitro*, ya que son determinantes en estudios de calidad de formulación y preformulación de productos farmacéuticos de uso tópico. La permeabilidad es definida como la capacidad que posee un compuesto para atravesar una membrana usando un gradiente de concentración de una zona de mayor concentración hacia una de menor concentración. En este proceso participan algunas variables como temperatura, pH, concentración y velocidad de agitación y tipo de membrana, además de factores propios de los compuestos como tamaño, polaridad.

Estos estudios se realizan típicamente en celdas de Frank, que permite simular condiciones fisiológicas de transporte de difusión a través de barreras fisiológicas como piel. Es importante mencionar, que las membranas pueden consistir en: materiales sintéticos, en algún material celular, piel humana y animal. En diferentes estudios, se han utilizado membranas "Strat-M" entre otras (Baert y cols., 2010).

De manera detallada una celda de difusión de Franz (Figura 13), consta de dos cámaras separadas por una capa de membrana de diálisis. La formulación con el fármaco se coloca en la cámara superior, y libera el fármaco a través de esta barrera de difusión en el medio aceptor. La temperatura se debe mantener en un rango de 32°C a 37 °C, para imitar las condiciones fisiológicas de la piel y las capas de agua sin remover y la formulación que pasa al compartimento aceptor Franz, se agita mediante una barra de agitación magnética. El análisis de muestras se realiza a través de varios métodos analíticos adecuados para ese propósito y posteriormente calcular parámetros como el flujo de la piel, el tiempo de fase de retraso y la cantidad total acumulada. En ocasiones se toman algunas formulaciones comerciales como referencia, al igual que un método analítico confiable y validado (Santos y cols., 2020). El proceso que determina la absorción percutánea es la difusión a través de la subcapa córnea de la epidermis, por lo que para la determinación del flujo del compuesto o principio activo y del coeficiente de permeabilidad, se utiliza la fórmula de la primera Ley de Fick: $J_s = K_m \cdot D \cdot C_s / d$ (ecuación 1).

Donde: J_s es el flujo del soluto en el estado de equilibrio, K_m es el coeficiente de partición del soluto, C_s es la diferencia de concentración del soluto a través de la membrana, D es el coeficiente de difusión y d es el grosor de la membrana.

Si se define que la constante de permeación es K_p y su ecuación es: $K_p = K_m \cdot D/d$ (ecuación 2), integrando la ecuación 1 y a la ecuación 2 se obtiene que: $J_s = K_p \cdot C_s$ que es la ecuación general.

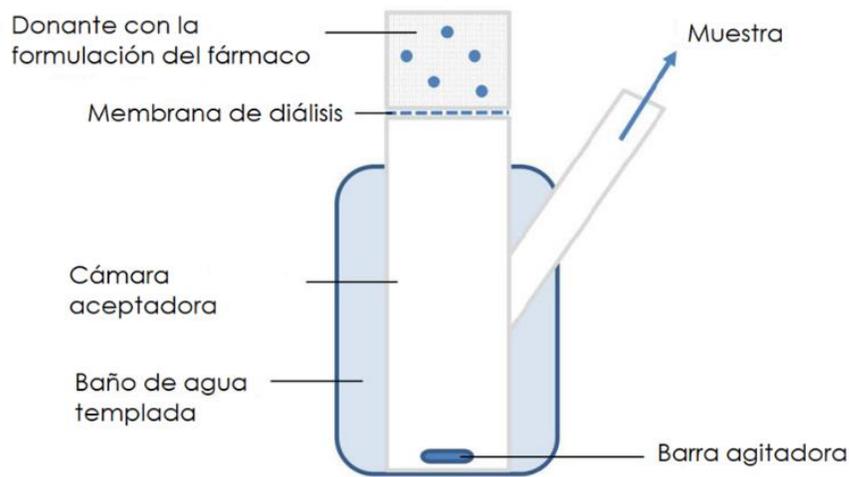


Figura 13. Celda de Difusión de Franz. Dibujo propio.

2.1.5 Diseño de Experimentos para Optimización

El diseño de experimentos para optimización (DEO), es una determinación estadística, cuyo objetivo es la de realizar varias pruebas en las que se implican cambios para averiguar los factores que influyen en la variable de interés y determinar cuantitativamente esta influencia (Montgomery, 2012). Es por lo que un DEO nos permite determinar los efectos de las variables de entrada (denominados factores) sobre una variable de salida (respuesta). Estos experimentos se realizan en una serie de corridas, en las que se establecen cambios planteados en las variables de entrada. Posteriormente se colectan los datos. Además este análisis nos permitirá identificar

las condiciones del proceso y los componentes del producto que afectan la calidad, para luego identificar que factores permiten optimizar los resultados.

El DEO es entonces un análisis efectivo en procesos cuyo rendimiento se puede ver afectado por varios factores.

Es por ellos, que es necesario, tener presentes, algunos conceptos importantes como:

- Factor: es una variable experimental que puede ser cambiada por el investigador (temperatura, tiempo de incubación, pH, etc.)
- Efecto: Magnitud del cambio en la respuesta al variar los factores.
- Niveles: Valores específicos de los factores para un experimento dado
- Modelo: Es una ecuación matemática que define la respuesta en función de los factores estudiados.
- Corrida: Es un experimento llevado a cabo en valores específicos para cada factor
- Respuesta: Es una variable que es medida, la cual depende principalmente de los factores en estudio (Fernández Gustavo Eutimio, 2008).

En lenguaje matemático, el DEO cuantificará la influencia que pueden tener los diferentes componentes sobre la respuesta, tanto en forma individual como en su acción conjunta con otros componentes, particularmente los objetivos son:

- Determinar cuáles variables tienen mayor influencia sobre la respuesta "Y"
- Determinar cual es el ajuste de la "X" que tienen más influencia para estar a un valor cercano al nominal deseado.
- Determinar el ajuste de las "X" con mayor influencia para que la variable "Y" sea reducida.
- Determinar cual es el ajuste de las "X" que tiene mayor influencia para los efectos de las variables "Z1...Zn", se el mínimo.

De tal manera, que, en este diseño, se tratar de modelar la respuesta para predecir en cualquier formulación posible y utilizar los modelos con el propósito de encontrar la composición de la mezcla que arroje los mejores resultados. A este último punto le llamamos "optimización".

Las etapas para elegir en los diseños de experimentos son:

- Identificación del problema y definir objetivos
- Elección de factores y niveles
- Selección de la variable de respuesta
- Elección del DEO
- Realización del experimento
- Análisis estadístico
- Mejoras, control y conclusiones

Existen diferentes tipos de experimentos: los basados en el análisis de varianza entre los que se encuentran los aleatorizados, al azar y cuadrados latinos.

Otra categoría son los diseños de determinación cuantitativa de la influencia de los factores sobre las variables y respuestas, que son diseños factoriales, diseños compuesto-centrales, diseños con mezclas, diseños mixtos, diseños uniformes.

La última categoría, abarca la determinación de la influencia cuantitativa y cualitativa de los factores sobre las variables respuestas: aquí encontramos los diseños multivariados (Figura 14).

Los diseños con mezclas se caracterizan porque en ellos, los factores son los componentes o ingredientes de una mezcla y los niveles no son independientes. En general, las características de calidad de las mezclas dependen de las proporciones con las que pueden participar los ingredientes y no la cantidad absoluta de ellos. En la actualidad existen protocolos de investigación que tienen productos que se forman al mezclar diferentes componentes como bebidas, medicamentos, detergentes, pinturas, resinas, gasolinas, etc. (Mongomery, 2012).

Algunos objetivos de los experimentos con mezclas son.

- Determinar los ingredientes de la mezclas o interacciones que entre ellos tienen mayor influencia sobre una o varias respuestas de interés
- Modelar la respuesta de interés en función de las proporciones de los componentes de una mezcla

- Usar los modelos para determinar en que porcentaje debe participar cada uno de los componentes.
- Usar los modelos para determinar en que porcentaje debe participar cada uno de los ingredientes para lograr que la formula tenga las propiedades deseadas
- Cuantificar la influencia que tienen los diferentes componentes sobre la respuesta, tanto en forma individual como en acción conjunta con otros componentes (Montgomery, 2012).



Figura 14. Categorías de los diseños de experimentos. Montgomery, 2012.

2.1.5.1 Software de Optimización

El software Minitab, es un programa estadístico y de diseño de experimentos, ofrece cinco tipos de diseños: cribados, factoriales, de superficie de respuesta, mezclas y Taguchi. El procedimiento en Minitab para crear, analizar y visualizar un experimento diseñado es similar para todos los tipos. Una vez realizado el experimento e ingresado

los resultados, el programa nos proporciona varias herramientas analíticas y graficas para ayudar a entender los resultados (Minitab®, 2022).

El software también crea varios tipos de gráficos:

- a) Grafico de probabilidades norma, el cual como su nombre lo indica, comprueba la normalidad estadística de los datos, compara la distribución empírica con la distribución normal. Si la distribución de la variable es normal, los puntos quedarán cerca de una línea recta.
- b) Grafico de ajustes, que es un gráfico que se utiliza para comparar el supuesto de los residuos que tiene una varianza constante
- c) Grafico de rastreo, o de trazas de respuesta, utiliza para examinar la importancia y el efecto de cada componente sobre la respuesta. Estas muestran el efecto que tienen el cambio del componente correspondiente a lo largo de una línea imaginaria (dirección) que conecta la mezcla de referencia a un vértice.
- d) Grafica de trazas de respuesta, que son útiles cuando existen mas de tres componentes en la mezcla y la superficie completa no se puede mostrarse en una gráfica de contorno.
- e) Grafico de superficie de mezcla, muestra la relación tridimensional en dos dimensiones, con las variables en los ejes X, Y y la variable de respuesta en Z, representada por una superficie uniforme.
- f) Grafica de contorno, examina la relación entre una variable de respuesta y dos variables predictoras, se representa en los ejes X y Y y los valores para la variable de respuesta se representa mediante regiones sombreadas (Minitab®, 2022).

3. JUSTIFICACIÓN

La actividad biológica del CBD en la piel es un área de investigación relativamente reciente, incluso si las preparaciones de cannabis para uso tópico ya se habían descrito en la literatura médica antigua, principalmente debido a sus actividades antibacterianas. Hasta la fecha, la mayor parte de la evidencia clínica ha estado centrada en los efectos del CBD y otros cannabinoides, inhalados, inyectados o

ingeridos por vía oral, y últimamente en el potencial terapéutico de las aplicaciones tópicas, el CBD en específico puede ser una vía de administración viable para ciertas afecciones tópicas (Martin y cols. 2022). En este sentido, se sabe que una aplicación tópica puede proporcionar un alivio más enfocado y localizado, dado que la aplicación tópica de CBD posee la ventaja de evitar el metabolismo de primer paso.

El resultado del tratamiento farmacológico dermatológico tópico está significativamente influenciado por la elección del vehículo o sistema de administración. Dado los avances en dermatología, además de un mercado creciente para los productos dermatológicos han facilitado la aparición de formulaciones tópicas y sistemas de administración de fármacos mejorados. Los enfoques actuales y emergentes para optimizar la administración tópica de agentes dermatológicos (moléculas pequeñas y grandes) incluyen el uso de potenciadores químicos, biopolímeros (p. ej., hialuronato de sodio), liposomas, transportadores de partículas (microesferas y nanopartículas lipídicas), aerosoles tópicos y espumas. oclusión (a través de apósitos y parches) exfoliaciones tópicas, temperatura (calor), iontoforesis y ultrasonido. Estos enfoques de administración (cuando se usan solos o de manera sinérgica) son una mejora significativa con respecto a los sistemas convencionales (cremas, lociones, ungüentos y pastas) y tienen el potencial de mejorar la eficacia y la tolerabilidad, mejorar el cumplimiento del paciente (incluida la calidad de vida dermatológica) y también satisfacer otras necesidades no satisfechas del mercado dermatológico tópico (Akomeah y cols., 2010). En especial se ha propuesto el uso de liposomas para diversas enfermedades dermatológicas (Kamra y Diwan, 2017).

En particular el CBD, se ha patentado en varias formulaciones líquidas por ejemplo en aceite, espray, así como formulaciones semisólidas como cremas, geles y cosméticos, cuya comercialización está enfocada principalmente para el cuidado de la piel, basándose en propiedades que ya se describieron anteriormente como antiseborreica, eccema y psoriasis, pero de manera cosmética se ha utilizado como tratamiento antienvjecimiento, antioxidantes y protectoras de la piel (Casirahi y cols., 2020).

El uso de formulaciones semisólidas, en consecuencia, deja aun la necesidad de proporcionar una mejor biodisponibilidad y eficacia cuando se administre por vía local,

es decir en función del tipo de enfermedad tópica, se requeriría una formulación que en la mayor parte el fármaco o principio activo sea capaz de penetrar el estrato corneo, y distribuirse a través de las capas subyacentes de la epidermis, permaneciendo más tiempo para que su efecto sea más duradero, por lo que los liposomas como un tipo de formulación farmacéutica del CBD para aplicación local es una buena propuesta.

Pero es importante no dejar al lado otros enfoques de las formulaciones liposomadas de CBD, estas podrían variar de tal forma sus características que, si se deseara, podrían al contrario otorgar gran penetrabilidad para que su efecto fuera más profundo, es decir en capas más musculares y ejercer un efecto analgésico, en caso de lesión, cirugía, artritis, fibromialgia y lupus.

Sin embargo, aunque ya sustentado el uso de CBD en formulaciones tópicas, la elaboración de estas formulaciones son un desafío ya que al ser un compuesto altamente lipofílico y poco soluble en agua, pueden presentar una difusión limitada a través de la piel, son inestables, siendo susceptibles a la degradación por temperatura, luz y autooxidación. Es por lo que estas dificultades hacen que el CBD sea un buen candidato para su incorporación en sistemas de administración de fármacos como liposomas, nanopartículas y micelas, para su aplicación tópica o por otras vías.

La molécula de CBD, cumple con las características para que un fármaco pueda penetrar de forma efectiva el estrato corneo como: contar con un bajo peso molecular de 314.5 Da, tener una adecuada solubilidad en medio lipófilo y un coeficiente de reparto expresado como LogP (reparto entre lipido/agua), es de 6.4, el cual es considerado como alto (DrugBank). Cuando consideramos los fármacos hidrofóbicos los cuales están localizados en la región de la bicapa, el parámetro más importante es el coeficiente de partición del fármaco entre la bicapa y la fase acuosa, un objetivo del desarrollo de formulaciones sería maximizar este número.

El comportamiento de los liposomas no solo varía dependiendo de la composición química sino de propiedades estructurales como número de lamelalidad, tamaño y volumen interno. En este sentido. Los métodos de preparación podrán producir liposomas específicos con respecto a estos parámetros (Woodle y Papahadjopoulos,

1989). Dependiendo de la función objetivo de la formulación de liposomas, serán las características de estos, sin embargo, existen algunas características como los son el tamaño y la morfología, que son controladas dependiendo del método de preparación de éstos.

Por otro lado, los diseños estrictos de estudios utilizando modelos matemáticos para la optimización de formulaciones, en la industria cosmética o farmacéutica es una técnica cada vez más utilizada, sin embargo, aún existen pocos estudios donde se hace uso de sus ventajas. En este sentido la calidad por diseño denominado CD o QbD por sus siglas en inglés, que se refiere a un proceso estratégico para el desarrollo y la fabricación (Simões y cols., 2018). Esta estrategia está concebida para asegurar que el rendimiento de un producto ya sea un cosmético o medicamento cumpla con los parámetros previstos de eficacia, en este caso de un gel liposomado de CBD que pueda penetrar con cierto grado la piel y se quede más tiempo en la capa cornea. Es importante que en esos procesos se determinen unos objetivos bien descritos y una gestión de riesgos adecuada. Entonces es obvio que una CD deberá incluir un conocimiento exhaustivo de los procesos técnicos, las variables que afectan al proceso y la manera en que estos pueden afectar el rendimiento, por ello podemos deducir que las ventajas de CD podrían en un momento dado beneficiar al consumidor, puesto que se tendría un producto más seguro y eficaz y al fabricante dado que la calidad y los costos estarán en mente y se podrán controlar y predecir correctamente.

4. HIPÓTESIS

La formulación farmacológica de cannabidiol en forma liposomas y vehiculizada en gel, permitirá el paso del cannabidiol a través de la piel porcina, con lo que se lograra tener buenos parámetros de permeación, además de constituir una formulación liposoma de liberación efectiva, comprobado mediante el número de tamaño de partícula, índice de polidispersidad y porcentaje de encapsulamiento.

5. OBJETIVO GENERAL

Optimizar, elaborar y caracterizar formulaciones de liposomas que contengan cannabidiol mediante la evaluación in vitro con estudios de liberación y permeación.

5.1 Objetivos Específicos

1. Elaboración de liposomas de cannabidiol mediante la técnica de inyección de solvente y extrusión de membrana.
2. Optimización mediante el diseño de mezclas con el software MINITAB, para obtener la mejor formulación de liposomas, incluyendo factores como concentraciones de constituyentes: colesterol, tween 80%, lecitina y concentración de CBD, tamaño de partícula, índice de polidispersidad, potencial Z y porcentaje de encapsulamiento.
3. Determinación de la cinética de liberación, utilizando un método de membrana de diálisis y ajustar al modelo de liberación de Korsmeyer-Peppas.
4. Vehiculizar en gel las mejores 5 formulaciones de liposomas con CBD para realizar la prueba de permeación mediante celdas de difusión de Franz y determinar la constante de permeación.
5. Optimizar un método de cromatografía de líquidos de alta resolución para la determinación de CBD.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para el DEO aplicado a nuestros liposomas, se busca encontrar las mejores formulaciones de liposomas con CBD, utilizando los modelos de composición de la mezcla, para ello la optimización se dividió, de manera general en 5 etapas, que se describen específicamente a continuación.

6.1 Primera etapa

En un primer acercamiento a la optimización, que se realiza en la primera etapa, se planearon pruebas estableciendo cantidades de los componentes lecitina, tween 80%

y variando cantidades CBD. Para esta primera etapa, se analizó la caracterización, determinando el tamaño de partícula, índice de polidispersidad y el potencial Z, mediante la técnica de dispersión dinámica de luz, utilizando el equipo de Zetasizer nano (ver. 7.2).

Tabla 1: Componentes de las formulaciones de la primera etapa

# FORMULACIÓN	COMPONENTES (mg)		
	LECITINA	TWEEN 80%	CBD
1	95	5	2
2	95	5	3
3	95	5	4

6.2 Segunda etapa

A partir del análisis de optimización basada en las características de tamaño de partícula, índice de polidispersidad y potencia I Z, se eligieron cinco formulaciones con los componentes de lecitina y tween 80%, pero ahora variando el porcentaje del CBD a nivel bajo (2%), como se muestra en I Tabla 2.

Tabla 2: componentes de las formulaciones de la segunda etapa, nivel bajo de CBD

# FORMULACIÓN	COMPONENTES (mg)		
	LECITINA	TWEEN 80%	CBD
1	95	5	2
2	90	10	2
3	85	15	2
4	80	20	2
5	75	25	2

En las siguientes cinco formulaciones, las cantidades de lecitina y tween 80% se mantienen, pero el porcentaje de CBD, de estas formulaciones fue nivel medio: 3%, que corresponde a 3 mg de CBD, según la Tabla 3.

Tabla 3: Componentes de las formulaciones de la segunda etapa, nivel medio de CBD

# FORMULACIÓN	COMPONENTES (mg)		
	LECITINA	TWEEN 80%	CBD
1	95	5	3
2	90	10	3
3	85	15	3
4	80	20	3
5	75	25	3

Para las últimas cinco formulaciones de esta segunda etapa, igualmente se mantuvieron las cantidades de lecitina y surfactante y el porcentaje de CBD fue alto 4%, que corresponde a 4 mg de CBD, según la Tabla 4.

Tabla 4: Componentes de las formulaciones de la segunda etapa, nivel alto de CBD

# FORMULACIÓN	COMPONENTES (mg)		
	LECITINA	TWEEN 80%	CBD
1	95	5	4
2	90	10	4
3	85	15	4
4	80	20	4
5	75	25	4

6.3 Tercera etapa

Analizando los resultados anteriores, y como parte de la tercera etapa se establecieron 3 niveles, para realizar la optimización de la formulación: nivel bajo, nivel medio, nivel alto, para los 3 componentes: lecitina, tween 80% y CBD como vemos en la Tabla 5.

Tabla 5. Componentes de las formulaciones de la tercera etapa

COMPONENTES (mg)	NIVELES		
	BAJO	MEDIO	ALTO
Lecitina	85	90	95
CBD	2	3	4
Tween 80%	5	10	15

Una vez habiendo alimentado el software con estos niveles, Minitab nos arrojó un total de 9 corridas de formulaciones con réplica. En las cuales se variarán las cantidades de lecitina, tween 80% y CBD, como se establece en la Tabla 6.

Tabla 6. Componentes de las formulaciones obtenidas por optimización de la tercera etapa

# FORMULACIÓN	COMPONENTES (mg)		
	LECITINA	TWEEN 80%	CBD
1	93.00	5.00	2.0
2	85.00	11.00	4.0
3	90.75	7.75	2.5
4	86.75	9.75	3.5
5	86.75	10.75	2.5
6	88.50	8.50	3.0
7	91.00	5.00	4.0
8	89.75	6.75	3.5
9	85.00	13.00	2.0

6.4 Cuarta etapa

Por ultimo y como parte de los experimentos de la cuarta etapa se realizó una nueva optimización con el software de Minitab, añadiendo colesterol a las nuevas formulaciones, como se establecido uno de los componentes de los liposomas que puede estabilizar la estructura. La concentración de colesterol en formulaciones lisosomales afecta la liberación de fármacos solubles en agua y a medida que aumenta la concentración de colesterol, aumenta la tasa de liberación del fármaco.

En este caso, se establecieron dos niveles: bajo y alto, para cada componente como vemos en la Tabla 7.

Tabla 7. Componentes de las formulaciones de la cuarta etapa, que incluye colesterol

COMPONENTES (mg)	NIVELES	
	BAJO	ALTO
LECITINA	85	93
CBD	2	4
TWEEN 80%	5	15
COLESTEROL	35	50

Una vez que los datos se han incorporado al sistema, Minitab nos arrojó un total de 4 corridas de formulaciones con réplica. En las cuales se irían variando las cantidades de lecitina, CBD, tween 80%, y colesterol como vemos en la Tabla 8.

Tabla 8. Componentes de las formulaciones obtenidas por optimización de la cuarta etapa

# CORRIDA	COMPONENTES (mg)			
	LECITINA	TWEEN 80%	CBD	COLESTEROL
1	54	5	2.0	38
2	59	6	3.5	39
3	55	6	3.0	39
4	56	5	4.0	40

6.5 Quinta etapa

Por ultimo y como parte de los experimentos de la quinta etapa se realizó la selección de las 5 formulaciones que derivan de los valores más altos de porcentaje de encapsulación (ver sección 7.3), una vez elegidos, se establecen las condiciones que se visualizan en la Tabla 9.

Tabla 9. Componentes de las mejores 5 formulaciones obtenidas por optimización de la quinta etapa

# FORMULACIÓN	E.E %	COMPONENTES (mg)		
		LECITINA	TWEEN 80%	CBD
1	Valores más altos	95.40	5.8	4.1
2	Valores más altos	92.63	5.5	3.7
3	Valores más altos	93.00	8.5	2.9
4	Valores más altos	95.40	5.8	2.1
5	Valores más altos	95.10	5.5	3.0

De esa manera, con estos componentes, se realizarán las cinéticas de liberación y permeación que se describe en las secciones (6.4 y 6.5) respectivamente.

7. METODOLOGIA

7.1 Elaboración de Liposomas

El método elegido para la elaboración de liposomas con CBD, es el método de inyección de solvente y para la disminución de tamaño el método de con extrusión por membrana.

7.1.1 Reactivos, Material y Equipo

Reactivos: cannabidiol 99%, lecitina, tween 80%, colesterol, agua destilada, solución amortiguadora de fosfatos (componentes: NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄), cloroformo y metanol grado CLAR.

Material: micropipetas (10, 20 y 1000 µl), matraz redondo de 100 mL, tubos eppendorf (2 mL), Probetas (4, 10 y 1000 mL), vasos de precipitado (250, 500 ml y 1000 mL), gradillas de plástico, filtros de jeringa 0.2 µm, jeringas de 3 mL y papel filtro, frascos de vidrio 1 Lt.

Equipo: Campana de extracción, baño de ultrasonidos, placa de calentamiento, vórtex.

7.1.2 Procedimiento

Paso 1: Se peso en el matraz de fondo redondo de 100 ml, los componentes liposolubles: CBD, lecitina, tween 80% y colesterol según las cantidades señalas por el diseño de experimentos (ver sección 6).

Paso 2: Se completo la preparación anterior, con solvente orgánico: metanol y cloroformo en una relación 3:1, se agito el matraz de fondo redondo para disolver los componentes.

Paso 3: Se coloco en el baño de ultrasonidos durante 20 a 30 minutos a 25 °C.

Paso 4: Se preparo la solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.4, pesando las siguientes cantidades de las sales: 8 gr NaCl, 0.2 gr de KCl, 1.44 gr de Na₂HPO₄, 0.24 gr de KH₂PO₄, disolver en 800 mL de agua y ajustar a pH 7.4 con HCl 1M o NaOH 1M y aforar a 1 Lt con agua desionizada.

Paso 5: Una vez completado el tiempo de sonicación, se habrán de haber disuelto los componentes, se formará una solución amarillenta clara, la cual se almacenará en frasco de vidrio de 1 Lt.

Paso 6: Se eliminó el solvente orgánico por evaporación con agitación manual en baño de agua con temperatura de 40°C - 60°C, hasta formar una película de lípidos dentro del matraz, se utilizará en todo momento lentes de seguridad, guantes y se trabajó en la campana de extracción.

Paso 7: Para completar la evaporación de la fase orgánica, se dejó toda la noche en la campana de extracción.

Paso 8: Una vez evaporado por completo el disolvente, se hidrato con 100 mL de la solución amortiguadora de fosfatos, mediante rotación, por encima de su temperatura de transición de fase, agitando suavemente el matraz hasta formar una suspensión homogénea, libre de partículas, hasta lograr la disolver por completo los excipientes. En este paso, esperamos formar liposomas multilaminares grandes.

Paso 9: Una vez realizada la hidratación, la mezcla se sometió al baño de ultrasonido, durante aproximadamente 20 minutos, hasta obtener un color blanco lechoso. Para este paso se espera formar liposomas unilamelares pequeños.

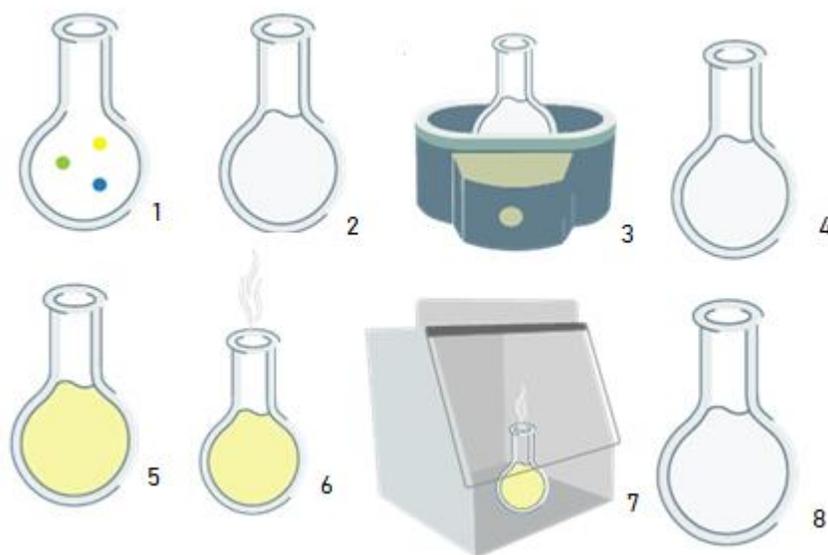
Paso 10: Se dejó reposar la mezcla varias horas para que se completó el proceso de hinchamiento de nuestros liposomas, se filtraron 2 mL de los lipomas, empleando un filtro de jeringa de 0.2 μm , y se almaceno en un tubo eppendorf de 2 mL.

Paso 11: En este punto, la solución liposomal se llevó a caracterizar con los siguientes parámetros: tamaño de partícula, índice de polidispersidad y potencial Z, mediante el equipo DLS (ver sección 2.1.4.4).

Paso 12: Las soluciones liposomales elaboradas y filtradas, una vez llevadas a un tubo eppendorf, se centrifugo a 500 rpm durante minutos.

Paso 13: Una vez centrifugadas las muestras, se obtuvo dos fracciones: una fracción filtrada y otra fracción retenida.

Paso 14: Se apartaron 100 μl de la fracción filtrada y lo llevaremos a un tubo eppendorf y se guardarán a 4°C hasta su análisis para calcular el porcentaje de eficiencia de encapsulamiento mediante la determinación de CBD por cromatografía de líquidos de alta resolución (ver sección 7.6), (Figura 15).



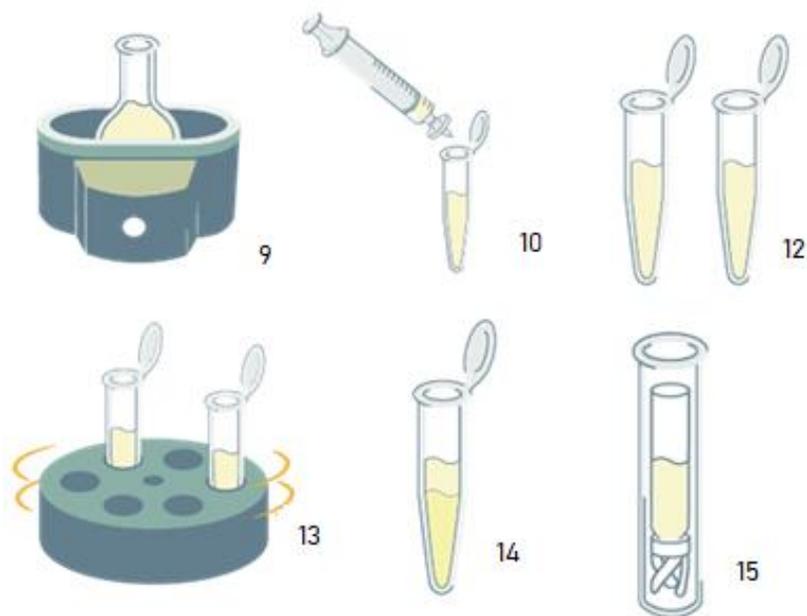


Figura 15. Metodología de inyección de solventes para la elaboración de liposomas con CBD.
Dibujo propio.

7.2 Determinación de Tamaño de partícula, índice de polidispersidad y potencial Z.

7.2.1 Reactivos, Material y Equipo

Reactivos: Agua desionizada.

Material: Filtros, jeringas, tubos eppendorf, celdas ZEN1060

Equipo: Zetasizer Nano Z, Malvern® Instruments (USA).

7.2.2 Procedimiento

El equipo Nano Zetasizer, contiene una celda de medida, la cual es desechable tipo ZEN1060, que posee dos electrodos a través de los cuales se aplica un campo eléctrico externo. Esta celda se calibra con un patrón suministrado por el fabricante, el cual tiene un potencial zeta conocido ($\xi=50\pm5$ mV). El equipo está conectado a un ordenador, tanto el manejo del equipo como almacenamiento de datos se llevaron a

acabo de forma automática mediante el programa suministrado por el fabricante Malevern®. Para iniciar la prueba, una vez preparados las soluciones liposomales a analizar, de los cuales se tomaron 10 µL de solución en un tubo de eppendorf, previamente filtrado. Esta solución se introdujo con ayuda de una micropipeta muy lentamente en la celda, evitando la formación de burbujas. Se establecieron los parámetros iniciales de índice de refracción y la absorción que se produce en la disolución a analizar, la viscosidad y la constante dieléctrica de agua desionizada, la temperatura, el potencial aplicado, el número de medidas a realizar y la función de Henry del CBD, y con ello se procedió a tomar la medida.

El tamaño de partícula, índice de polidispersidad y Potencial Z se obtuvo como un promedio estadístico de 3 medidas independientes. El potencial Z se determinó a una longitud de onda de 632 nm y una potencia máxima de 10 mV.

7.3 Porcentaje de Encapsulamiento

7.3.1 Reactivos, Material y Equipo

Reactivos: Solución de liposomas.

Material: filtros, jeringas, tubos eppendorf.

Equipo: Centrifuga.

7.3.2 Procedimiento

La eficiencia de encapsulación o también llamada eficiencia de atrapamiento es aquella medida que relaciona la cantidad de ingrediente activo (CBD) incorporado en los liposomas, con respecto al total de ingredientes activos presente en la dispersión (Figura 16).

Una vez tomadas las muestras, podremos calcular el porcentaje de eficiencia de encapsulamiento, el cual se calculará mediante la fórmula del punto (1.4.5.5).

Para calcular la eficiencia de encapsulamiento se realizaron los siguientes puntos:

1. Se colocaron 1 mL de liposomas en tubos eppendorf y se centrifugó durante 20 min a 1000 rpm.
2. Una vez terminado este proceso se separó el sobrenadante del precipitado.

3. El sobrenadante, fue inyectado al sistema de CLAR (ver 7.6).

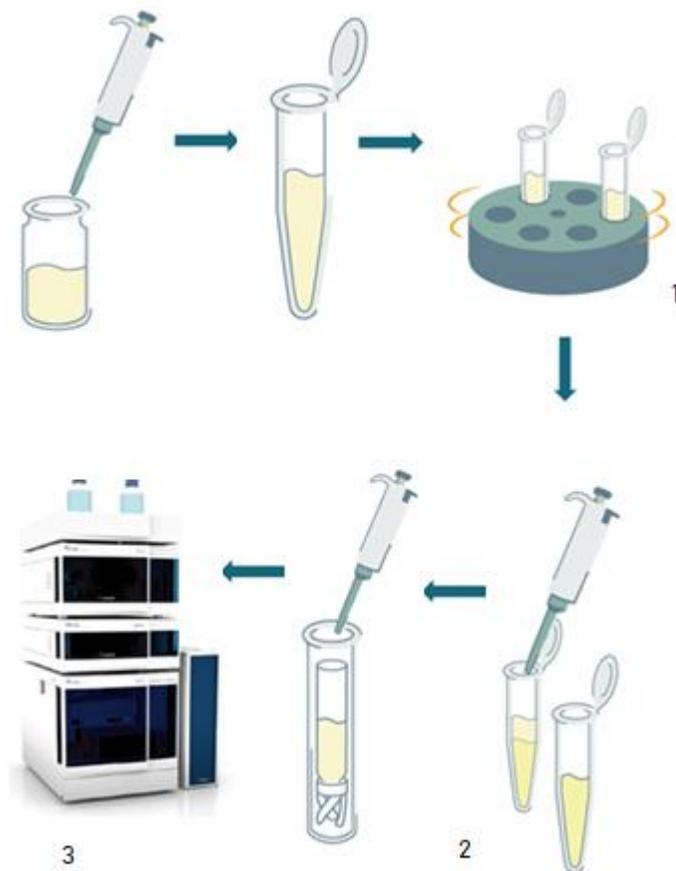


Figura 16. Procedimiento para determinar el porcentaje de encapsulamiento (%EE). Dibujo propio.

7.4 Cinética de Liberación

7.4.1 Reactivos, Material y Equipo

Reactivos: Solución PBS, solución de liposomas.

Material: tubos eppendorf, vasos de precipitados de 50 mL, magnetos de agitación.

Equipo: Placa de agitación Corning®, baño maría.

7.4.2 Procedimiento

Para la realización de este procedimiento, consecutivamente se siguen los puntos:

1. La membrana de acetato de celulosa se cortó 10 cm.
2. Se hidrataron 24 horas previo a la prueba de liberación y se armaron las bolsas.
3. En vasos de precipitados, se añadieron volúmenes de 50 mL de PBS, en los cuales se sumergieron los sacos de diálisis, dentro de estos fueron añadidos 10 mL de una solución de liposomas.
4. Se dejó en agitación constante, en un medio a 37 °C y se inició el muestreo a diferentes tiempos: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12 y 24 horas. El volumen de las muestras fue de 1 ml y el mismo volumen fue reemplazado de PBS. Todas las muestras se guardaron en tubos eppendorf y se guardaron en un congelador a 0°C, hasta su análisis en CLAR (ver sección 7.6), (Figura 17).

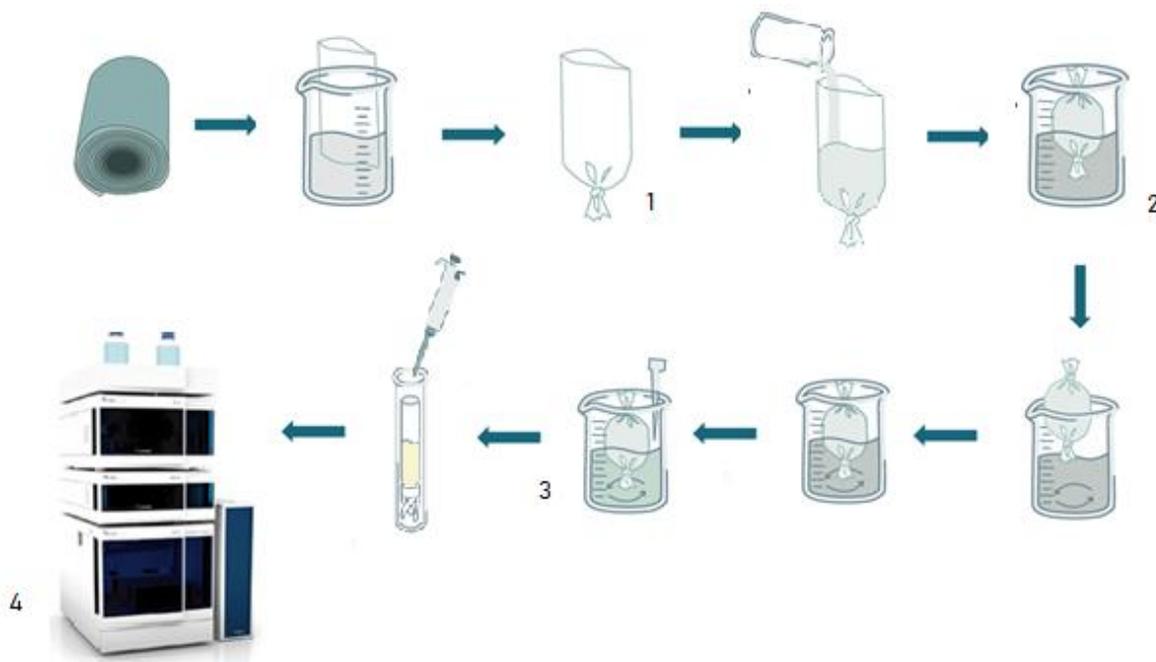


Figura 17. Procedimiento para determinar la cinética de liberación. Dibujo propio.

7.5 Método de Permeación en Piel *in vitro*

7.5.1 Reactivos, Material y Equipo

Reactivos: carbopol, trietilamida, PBS.

Material: tubos eppendorf, pipetas Pasteur, piel de cerdo.

Equipo: Celdas de Franz, placa de agitación Corning®, baño maría.

7.5.2 Procedimiento

Se preparo primeramente un gel para la vehiculización de los liposomas de CBD, para ello, se partió de 25 mL de los liposomas elaborados a evaluar, los cuales fueron añadidos a un vaso de precipitado de 250 mL y se introdujeron en un sistema de baño maría en una placa de agitación constante, se añadió poco a poco 500 mg de carbopol, hasta lograr una completa disolución, la cual se fue tornándose más espesa. Posteriormente, se agregó 1 mL de trietanolamina, hasta alcanzar una consistencia más espesa. Finalmente, todas las formulaciones preparadas se dejaron reposar, durante 24 horas en el refrigerador, para posteriormente realizar las pruebas de permeación.

Para realizar la prueba de permeación, se realizaron los siguientes puntos:

1. Antes de los experimentos, la piel se limpia y se le desprende la mayor cantidad de grasa, de tal manera que solo quede la epidermis. Se seccionaron los cortes redondos de 4.0 cm² y se dejaron inmersos por 24 horas en PBS fresco.
2. Posteriormente, las secciones de piel se dejaron atemperar a 32 °C.
3. Las celdas de Frank se llenaron con 10 mL de una solución de etanol (50/50 v/v), en el compartimento aceptor.
4. La celda de Frank fue armada, acomodando la piel de cerdo y se selló con las abrazaderas para evitar que se moviera la piel de cerdo.
5. Se cargo una alícuota de 1.0 mL del gel con los liposomas de CBD, directamente en el compartimento donante de cada celda de difusión de Franz.
6. El sistema se mantuvo a 37 °C, en el baño maría, manteniendo una fluctuación de 37 ± 1 °C, durante todo el experimento.

7. Se tomaron muestras de 500 μL a los tiempos: 1, 3, 6, 12, 24, 36 y 48 horas, las alícuotas extraídas, fueron reemplazadas con el mismo volumen, para que no se alterara el volumen del medio receptor.
8. Las muestras extraídas, se almacenaron en tubos eppendorf, hasta su posterior análisis por CLAR (ver sección 7.6), (Figura 18).

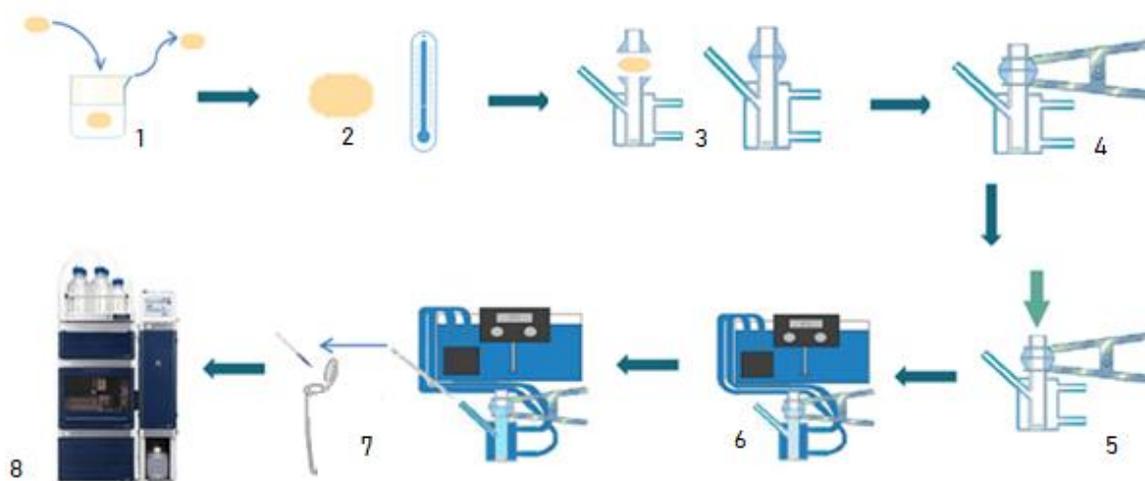


Figura 18. Procedimiento para permeación en celdas de Franz. Dibujo propio.

7.6 Método de Cromatografía de líquidos de Alta Resolución

7.6.1 Material, Reactivos y Equipo

Reactivos: CBD (99%), metanol, acetonitrilo y agua grado CLAR, tetrahidrofurano.

Material: tubos eppendorf, frascos de 20 mL de vidrio. Columna Agilen Zorbax C18 (3.5 μm , 4.6 X 100mm), acrodiscos de polipropileno de 0.25 μm icras.

Equipo: Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Waters 1525, Detector de absorbancia UV Waters 2487, Autoinyector y Software Empower pro1154.

7.6.2 Procedimiento

La cromatografía de líquidos de alta resolución es un método analítico que se utiliza para la separación y cuantificación de compuestos químicos, o mezclas de ellos, para ello es utilizado dos fases, la estacionaria y la móvil, en caso de ser un método de fase reversa, la fase estacionaria consiste en una columna de que soporta un recubrimiento y cuyo material son cadenas de carbonos y que al no reaccionar con los compuestos se denominan inertes. Por su parte la fase móvil consiste en un líquido generalmente combinaciones de líquidos orgánicos y acuosos y su función es arrastrar la muestra a través de la fase estacionaria a presiones elevadas. La separación de la muestra en este sistema ocurrirá por distintas fuerzas químicas y físicas que separarán los componentes, haciendo una elución específica por cada componente, dadas sus propiedades únicas de cada molécula. Por ello, fuerzas como la adsorción, interacciones dipolo, por puente de hidrógeno, dieléctricas, electrostáticas e incluso características como tamaño y polaridad del compuesto van a definir el tiempo de elución en determinadas condiciones cromatográficas como presión, detección (Blum, 2014).

La determinación de CBD en cromatografía se basó en el método publicado (Ambrach y cols., 2014). Para el análisis cromatográfico se utilizó un sistema Waters®, el cual se detalla las especificaciones del equipo como detector (Waters 2487 Dual λ Absorbance detector), bomba (Waters 1525 Binary HPLC Pump), autoinyector (Waters 717 plus autosampler). Las condiciones se establecieron de la siguiente manera: columna C18 (Agilent®) y una fase móvil de la mezcla de acetonitrilo/tetrahidrofurano 0.1% (65:35 v/v) a un flujo isocrático de 1.8 min/mL. El volumen de inyección se estableció en 10 μ L y a señal de detección fue a una λ de 200 nm. El tiempo de la corrida total fue de 5 min. En estas condiciones, el tiempo de retención del CBD fue de 3.6 min.

Para la cuantificación de CBD, se procedió a preparar una solución patrón con una concentración inicial de 1 mg/mL, se disolvió en metanol y posteriormente se prepararon la curva de calibración de las siguientes concentraciones, que se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Curva de calibración para análisis de CBD

No. Punto	Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
1	0.05
2	0.50
3	5.00
4	50.00
5	100.00

La preparación de las soluciones fue como a continuación se detalla: para la solución núm. 5 con concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, se tomaron 100 μl de la solución patrón, colocándose en tubos eppendorf y se le agregaron 900 μL de metanol para completar 1ml, para la solución núm. 4 con concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, se tomaron 500 μL de la solución núm. 5, colocándose en tubo eppendorf y se agregaron 500 μL de metanol para completar 1mL. Para la solución núm. 3 con concentración de 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se tomaron 100 μl de la solución núm. 4, llevándose a tubos eppendorf y se le agregaron 900 μL de metanol para completar 1mL. Para la solución núm. 2 con concentración de 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se tomaron 100 μL de la solución núm. 3, llevando sea tubos eppendorf, y se le agregaron 900 μL de metanol para completar 1ml. Por último, para la solución núm. 1 con concentración de 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$, se tomaron 100 μl de la solución núm. 2, llevándose a un tubo eppendorf, y se le agregaron 900 μL de metanol para completar 1mL, todas las soluciones se agitaron rigurosamente en vórtex durante 30 segundos. Se prepararon 3 curvas de calibración, que posteriormente se colocaron en los viales e inyectaron, colocándolas en orden creciente en el autoinyector, teniendo siempre un vial núm. 1 como lavado con metanol. Todas las muestras siempre fueron filtradas en acrodiscos de polipropileno de 0.25 μmicras , para evitar obstruir la columna cromatográfica.

8. RESULTADOS

8.1 Primera Etapa

Los resultados de índice de polidispersidad, Potencial Zeta y tamaño de partícula, para la segunda etapa de la optimización con el software Minitab se calcularon con el promedio de 3 réplicas y los resultados se establecen en la Tabla 11.

Tabla 11. Valores de las características de los liposomas de la primera etapa

# FORMULACIÓN	COMPONENTES (mg)			VALORES		
	LECITINA	TWEEN 80%	CBD	Potencial Zeta	PDI	Tamaño de Partícula
1	95	5	2	-28.63	0.430	145.7 nm
2	95	5	3	-26.20	0.198	163.53 nm
3	95	5	4	-25.63	0.212	107.1 nm

En esta primera determinación de las características de liposomas, que inicialmente se establecieron, para la combinación de factores, resalta observar que los resultados han sido positivos y se logró la elaboración de formulaciones liposomales, cuyas características derivadas de los valores de potencial Z son cercanos a los valores de alrededor de -25.63 a -28.63 mV, lo que indica que son formulaciones liposomales con cierta estabilidad coloidal, en cuanto al tamaño de partícula este valor está alrededor de 107 a 163 nm, por lo que están dentro del rango de liposomas del tipo unilamlares grandes. En cuanto a los índices de polidispersidad se observaron valores de 0.2 a 0.4, cuyo rango es amplio, teniendo en cuenta que alrededor de 0.2 es un valor aceptable.

8.2 Segunda Etapa

Para la segunda etapa de la optimización con el software Minitab, se calcularon con el promedio de 3 réplicas de las formulaciones 1 a 5 que contienen un nivel bajo de CBD (2%). Las características de las formulaciones se visualizan en la tabla 12.

Tabla 12: Valores de las características de los liposomas de la segunda etapa a nivel bajo de CBD

# FORMULACIÓN	COMPONENTES (mg)			VALORES		
	LECITINA	TWEEN 80%	CBD	Potencial Zeta	PDI	Tamaño de Partícula
1	95	5	2	-25.46	0.23	187.8
2	90	10	2	-19.73	0.47	330.8
3	85	15	2	-19.36	0.26	170.0
4	80	20	2	-17.50	0.37	89.3
5	75	25	2	-13.63	0.26	165.8

Los resultados de las características de las formulaciones 6 a la 10 de la segunda etapa, con un nivel medio 3% de CBD, se agrupan en la Tabla 13.

Tabla 13. Valores de las características de los liposomas de la segunda etapa a nivel medio de CBD

# FORMULACIÓN	COMPONENTES (mg)			VALORES		
	LECITINA	TWEEN 80%	CBD	Potencial Zeta	PDI	Tamaño de Partícula
6	95	5	3	-19.06	0.20	167.1
7	90	10	3	-16.43	0.21	168.6
8	85	15	3	-13.90	0.23	173.9
9	80	20	3	-12.90	0.23	162.5
10	75	25	3	-11.96	0.42	239.2

Y por último los resultados de la optimización de las formulaciones 11 a la 15, con un nivel alto 4% de CBD. Estos valores se agrupan en la Tabla 14.

Tabla 14: Valores de las características de los liposomas de la segunda etapa a nivel alto de CBD

# FORMULACIÓN	COMPONENTES (mg)			VALORES		
	LECITINA	TWEEN 80%	CBD	Potencial Zeta	PDI	Tamaño de Partícula
11	95	5	4	-22.03	0.23	133.00
12	90	10	4	-20.00	0.26	93.99
13	85	15	4	-15.13	0.26	90.59
14	80	20	4	-11.83	0.42	252.33
15	75	25	4	-13.93	0.31	71.49

Como mencionamos anteriormente el potencial Zeta mide la estabilidad coloidal, los valores de potencial Zeta comúnmente reportados para partículas lipídicas, varían de -20 mV a -40 mV, por lo que podemos observar en nuestros resultados de la segunda etapa, los mejores valores se logran en las formulaciones con cantidades de lecitina a niveles altos, 90 a 95 mg, en cuanto a las cantidades de tween 80%, se correlaciona con menores cantidades de 5 o 10 mg. Para el caso del tamaño de partícula, los resultados arrojados caben en un rango de 80 nm a 1000 nm por lo que se consideran liposomas unilamelares grandes. Y los valores del índice de polidispersidad varían, sin embargo, son los más cercanos a 0.2 lo que nos indica que se trata de partículas monodispersas.

8.3 Tercera Etapa

Los resultados de la caracterización para la tercera etapa, basados en los datos obtenidos de la segunda etapa, tanto de Potencial Zeta, Tamaño de partícula, y PDI, se calcularon con el promedio de 3 réplicas y fueron los siguientes:

Tabla 15. Valores de las características de los liposomas de la tercera etapa

# corrida	COMPONENTES (mg)			VALORES		
	lecitina	tween 80%	CBD	Potencial Zeta	PDI	Tamaño de Partícula
1	93.00	5.00	2.0	-21.56	0.397	263.26
2	85.00	11.00	4.0	-24.70	0.26	127.56
3	90.75	6.75	2.5	-22.83	0.48	277.00
4	86.75	9.75	3.5	-21.66	0.40	284.33
5	86.75	10.75	2.5	-16.26	0.25	188.53
6	88.5	8.50	3.0	-23.90	0.40	155.06
7	91.00	5.00	4.0	-25.50	0.23	148.96
8	89.75	6.75	3.5	-22.93	0.38	299.30
9	85.00	13.00	2.0	-19.63	0.44	181.36

Una vez realizada la optimización, y habiendo obtenido los resultados para cada parámetro, Minitab nos arroja diferentes gráficos:

a) Grafica de probabilidad normal

Para la construcción del grafico de probabilidad norma, se graficó en el eje vertical, los valores ordenados de los datos: X_1, X_2, X_n , es decir los porcentajes que corresponden a las cantidades de lecitina, CBD, y tween 80% para las formulaciones, y en el eje de horizontal, el valor esperado del i-enésimo estadístico de orden de una distribución normal. La respuesta para este para este gráfico es el potencial Zeta. En el gráfico que nos arrojó MINITAB, podemos observar que los residuos se ajustan bastante bien a la línea reta de regresión, lo que nos da confiabilidad de que los datos que estamos generando son de distribución normal (Figura 19).

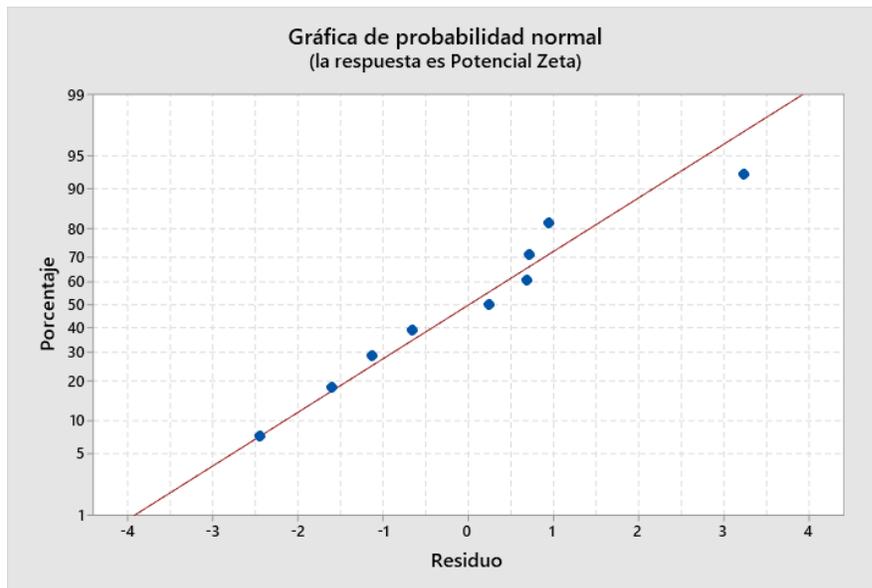


Figura 19. Probabilidad normal

b) Gráfico de ajustes

Para la construcción del gráfico de ajustes, se graficó en el eje vertical, los residuos y en el eje de las x, los valores ajustados, es decir, los porcentajes que corresponden a las cantidades de lecitina, CBD, y tween 80% para las formulaciones. La respuesta para este gráfico es el potencial Zeta. En el gráfico de ajustes que nos arrojó MINITAB, podemos observar que no hay una manipulación de los residuos, lo que significa que hay una varianza constante o homogénea y observando la gráfica de probabilidad normal y el gráfico de ajustes, inferimos que hay una distribución normal, con lo que podemos concluir que no hay sesgo en la experimentación, y el análisis es confiable (Figura 20).

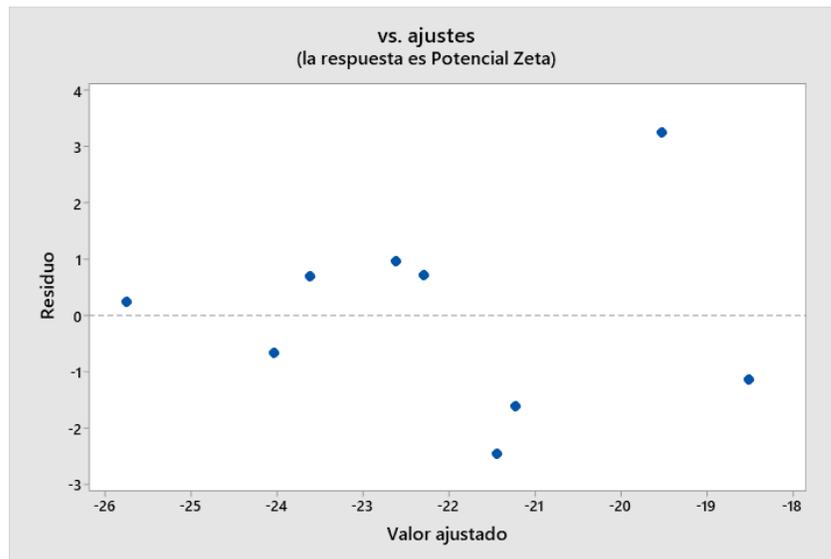


Figura 20. Gráfico de ajustes

c) Gráfico de rastreo

En el gráfico de ajustes que nos arrojó MINITAB, podemos observar que para este caso la línea azul corresponde a la Lecitina, la línea roja punteada al CBD, y la línea verde punteada al Tween, para el caso de la lecitina como vemos en la gráfica: Conforme aumenta la cantidad de lecitina mezclada, el potencial Zeta va aumentando más cercano al +30 mV, es decir entre menor cantidad de lecitina se utiliza, la formulación será más estable, más cercano al -30 mV.

Para el caso del CBD como vemos en la gráfica, en la línea punteada roja: “Conforme menor cantidad de CBD se añada a la formulación, el potencial Zeta va disminuyendo (más cercano al -30 mV), es decir entre menor cantidad de CBD se utiliza, la formulación será más estable, más cercano al -30 mV. Para el caso del Tween como vemos en la gráfica en la línea punteada verde: “Conforme mayor cantidad de Tween se añada a la formulación, el potencial Zeta va disminuyendo (más cercano al -30 mV), es decir entre mayor cantidad de Tween se utiliza, la formulación será más estable, más cercano al -30 mV. (Figura 21).

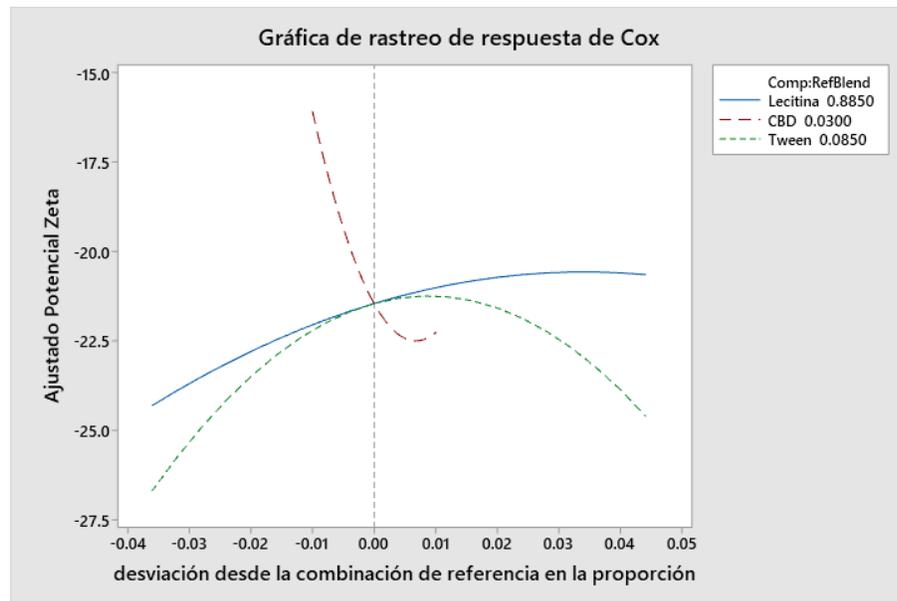


Figura 21. Gráfico de rastreo de respuesta

d) Gráfico de superficie de mezcla

El gráfico de superficie de mezcla que nos arroja Minitab, muestra como una variable de respuesta, en éste caso: Potencial Zeta, se relaciona con tres componentes: cantidad de lecitina, CBD y tween 80%. Al ser un gráfico tridimensional es más sencillo ir manipulándolo en el software de Minitab para observar mejor, las cantidades óptimas de los componentes para la respuesta buscada (Figura 22).

La gráfica de contorno es un gráfico que ayuda a examinar la relación entre una variable de respuesta y dos variables predictoras, se representa en los ejes X y Y y los valores para la variable de respuesta se representa mediante regiones sombreadas, es decir como un mapa topográfico en el cual se grafican los valores X, Y y Z, en lugar de longitud, latitud y altitud (Figura 23).

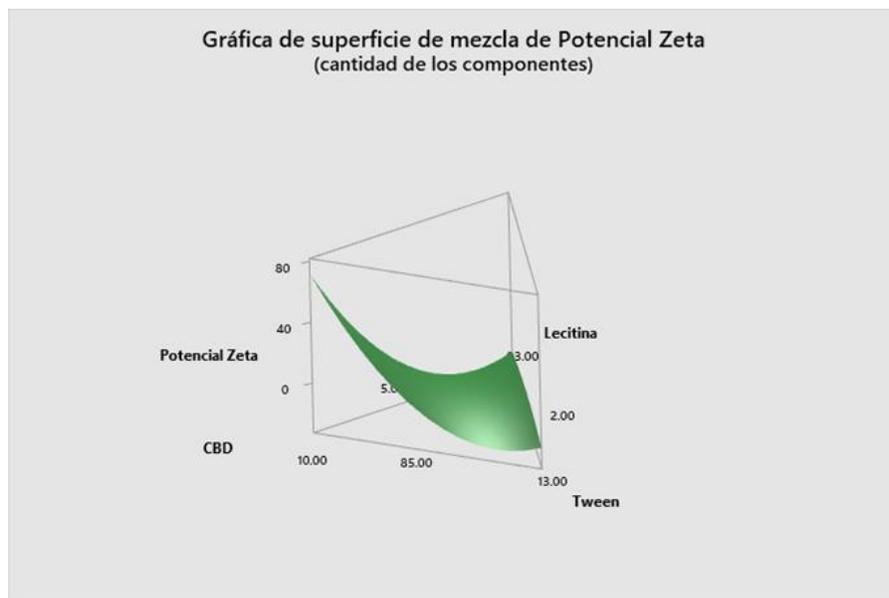


Figura 22. Gráfico de superficie de mezcla

Estos gráficos se utilizan para ayudar a visualizar la forma de superficie de respuesta, en estas gráficas, se trazan las líneas de respuesta constante en el plano. Cada contorno corresponde a una altura particular de la superficie de respuesta. Como se observa en este gráfico que nos arroja MINITAB, se observa en cada vértice del triángulo, un componente diferente: CBD, tween 80% y lecitina, las regiones más oscuras, indican valores de potencial Z más bajos, es decir, menores a -20 mV, que es la variable de respuesta que estamos buscando, que nos indica una mayor estabilidad de nuestra mezcla.

Tabla 16. Valores de las características de los lipomas de la cuarta etapa

# corrida	COMPONENTES (mg)				VALORES		
	lecitina	tween 80%	CBD	colesterol	Potencial Zeta	PDI	Tamaño de Partícula
1	54	5	2	38	-19.36	0.23	217.73
2	59	6	3.5	39	-15.90	0.21	187.33
3	55	6	3	39	-17.76	0.28	292.33
4	56	5	4	40	-20.23	0.33	256.30

Los resultados de estas nuevas formulaciones con colesterol, para el caso del tamaño de partícula, los valores arrojados caben en un rango de 80 nm a 1000 nm por lo que se consideran liposomas unilamelares grandes. Los valores del PDI son muy cercanos a 0.2 exacto lo que nos indica que se trata de partículas monodispersas. Sin embargo, como podemos observar para potencial Z, los resultados van en un rango menor a -20mV, recordando que el potencial Z mide la estabilidad coloidal, proporcionándonos información sobre la magnitud de la carga en la superficie de las partículas en dispersión acuosa y permite predecir, la estabilidad física a largo plazo e las formulaciones, por lo que podemos observar en nuestros resultados, no serían estables si se le añade colesterol a la formulación.

8.5 Quinta Etapa

En una etapa final, donde la selección de formulaciones con las características óptimas de tamaño de partícula, índice de polidispersidad y potencial Z, es necesario también analizar un factor más como el porcentaje de encapsulación (% EE), para ello se analizaron a todas las formulaciones mediante un procedimiento se muestra detalladamente en la Sección 6.3. Los resultados obtenidos se integraron en la Tabla

17, donde se seleccionaron cinco formulaciones, cuyo valor de % EE es mayor a 70%, lo que significa que la mayor cantidad de CBD fue atrapado en la estructura del liposoma.

Tabla 17 Valores de las características de los lipomas de la quinta etapa

% EE	Formulación	Potencial Z	Tamaño de partícula (nm)	PDI	CBD	Lecitina	Tween 80%
80.63	CBD 4% Primer etapa (1)	-25.65	107.1	0.21	4.1	95.4	5.8
78.19	Sol Global Minitab (b) (2)	-23.5	141.56	0.26	3.7	92.6	5.5
75.55	Sol Global Minitab (a) (3)	-27.16	207.33	0.22	2.9	93.0	8.5
71.71	CBD 2% Primer etapa (4)	-28.63	145.70	0.43	2.1	95.4	5.8
70.51	CBD 3% Primer etapa (5)	-26.2	163.53	0.19	3.0	95.1	5.5

Posteriormente, estas mismas formulaciones, fueron analizadas para determinar su cinética de liberación y permeación según los procedimientos detallados en la sección 6.4 y 6.5.

8.6 Cinética de liberación

Las formulaciones seleccionadas fueron sometidas al análisis de la cinética de liberación, es decir una vez que el CBD se ha integrado en los liposomas, es importante también analizar la manera en cómo se libera, este valor entonces es importante.

Para ello, el tiempo que fue seleccionado para su liberación en bolsas de diálisis fue de 12 horas, donde como se muestra detalladamente en la sección 6.4, se toma la muestra fuera de la membrana de diálisis y se determina su concentración, y su concentración acumulativa construyendo el curso temporal y tomando la ecuación de

comportamiento sabremos qué tipo de liberación presenta. Las concentraciones se determinaron, por medio de CLAR (ver sección 6.6), tales valores se representan en la Tabla 18 y su grafica se observa en la Figura 24.

Tabla 18. Concentraciones temporales de CBD liberada por método de diálisis

Tiempo minutos	CBD mg				
	F1	F2	F3	F4	F5
0	0.27	0.49	0.014	0.00	0.00
60	2.54	2.48	2.08	2.18	2.72
120	3.63	3.73	3.08	2.76	3.71
180	4.29	3.37	3.71	3.46	4.90

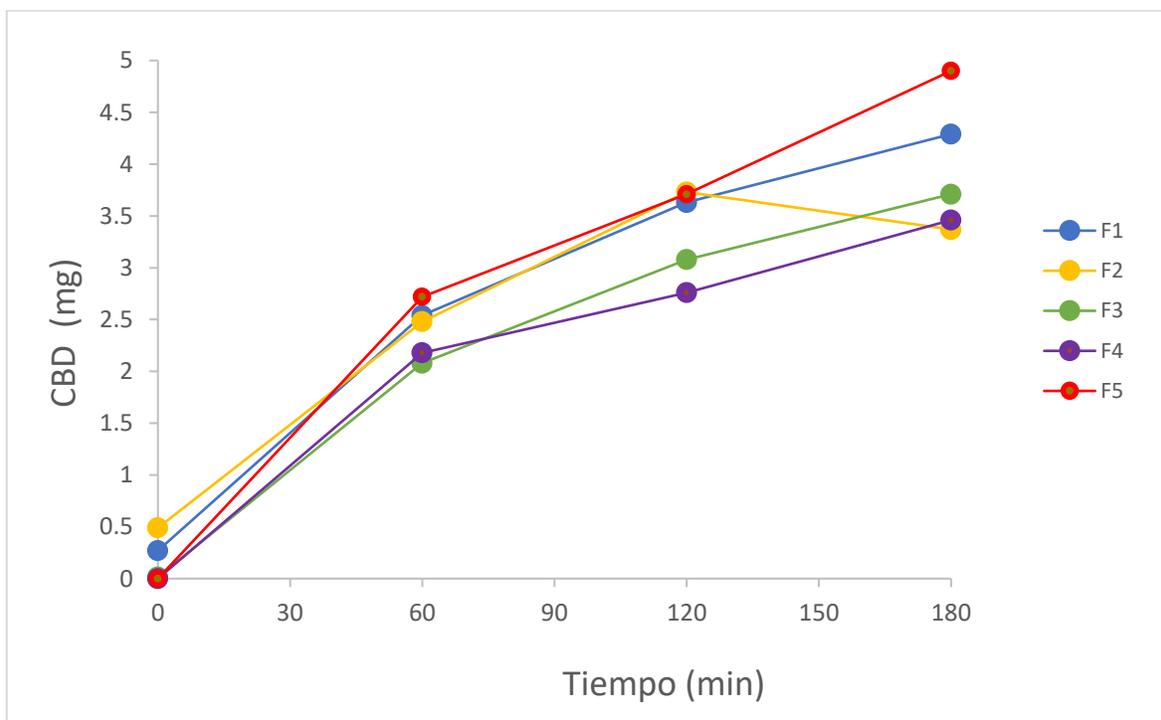


Figura 24. Perfiles de liberación de CBD por diálisis en las 5 mejores formulaciones de liposomas

Posteriormente se ajustaron al modelo Koismeyer-Peppas, cuya ecuación es como ya se definió en la sección 1.4.1.5.6, $M_t/M_\infty = Kt^n$, para ello, se diseñó una planilla en Excel para obtener los valores de K, n y el coeficiente de correlación (R^2) resultante se ingresar los datos y ajustar a la ecuación mediante la función de "solve", en excel, que nos regresa el valor de K y n y la correlación de la función calculada con la función original (Figura 25).

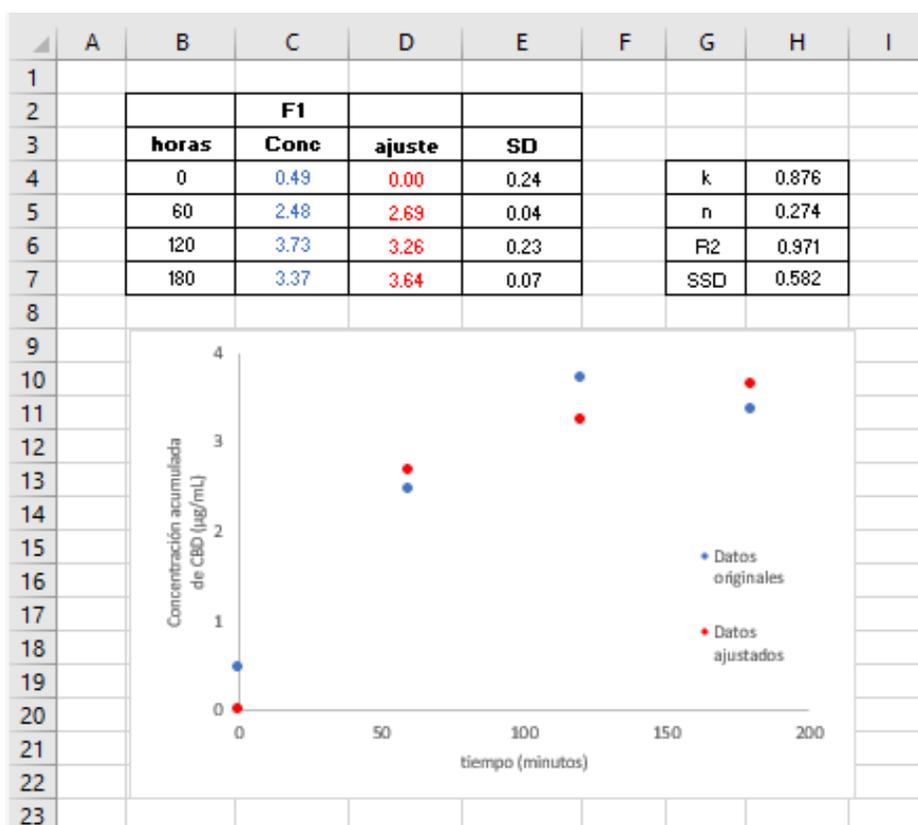


Figura 25. Análisis de ajuste de ecuación Koismeyer-Peppas, mediante excel

En la siguiente tabla 19, se representan los valores de K, n y R^2 para cada formulación analizada.

Tabla 19. Valor de los parámetros de K, n y R²

Formulación	Parámetros		
	K	n	R ²
F1	0.879	0.272	0.997
F2	0.876	0.274	0.971
F3	0.879	0.272	0.997
F4	0.879	0.272	0.992
F5	00.879	0.272	0.997

El parámetro K (en general 0.89) o constante de liberación indica la velocidad que ocurre de desprendimiento del CBD desde los liposomas, por ello un valor de K alta indica una liberación más rápida del CBD. Si se realiza una comparación de las constantes, se observa que todas las formulaciones liberan de la misma forma al CBD, y aunque sus formulaciones variaron en sus componentes, se tienen cinéticas muy similares. Un valor de K de valores bajo, ello indicaría una liberación deficiente del CBD desde los liposomas. El valor de n es un valor de aproximadamente 0.24, cuyo valor es menor a 0.45, por lo que representa un modelo fickiano.

8.7 Permeación en Piel Porcina

Como se ha indicado anteriormente las mismas formulaciones estudiadas en las cinéticas de liberación, posteriormente fueron vehiculizadas en gel, para hacer la solución más maleable y que es la apropiada para la administración tópica.

Una vez realizado el experimento de permeación, cuyo procedimiento se ha detallado en la sección 6.5. Al final de los experimentos, se colectan todas las muestras y se determina su concentración, es importante señalar que se realiza una transformación de datos de la concentración que se va cuantificando en el espacio de reservorio de la

celda de Frank, donde se determinara la cantidad acumulada, donde se considera los 20 mL de capacidad de nuestras celdas, por lo que posteriormente se divide entre el área de la celda, la cual es 4.91 cm^2 , estos valores se visualizan en la Tabla 20, la representación gráfica de los cursos temporales de la permeación en celda de Franz, de las 5 formulaciones seleccionadas, se muestra en la Figura 26.

Tabla 20. Cursos temporales de la cantidad acumulada que permea por área

Tiempo	CANTIDAD ACUMULADA/ AREA ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)				
Minutos	F1	F2	F3	F4	F5
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
60	0.21	0.00	0.24	0.00	0.00
180	0.21	0.00	1.26	0.00	0.14
360	4.12	0.57	2.64	1.02	0.36
720	4.28	2.10	3.87	1.34	0.58

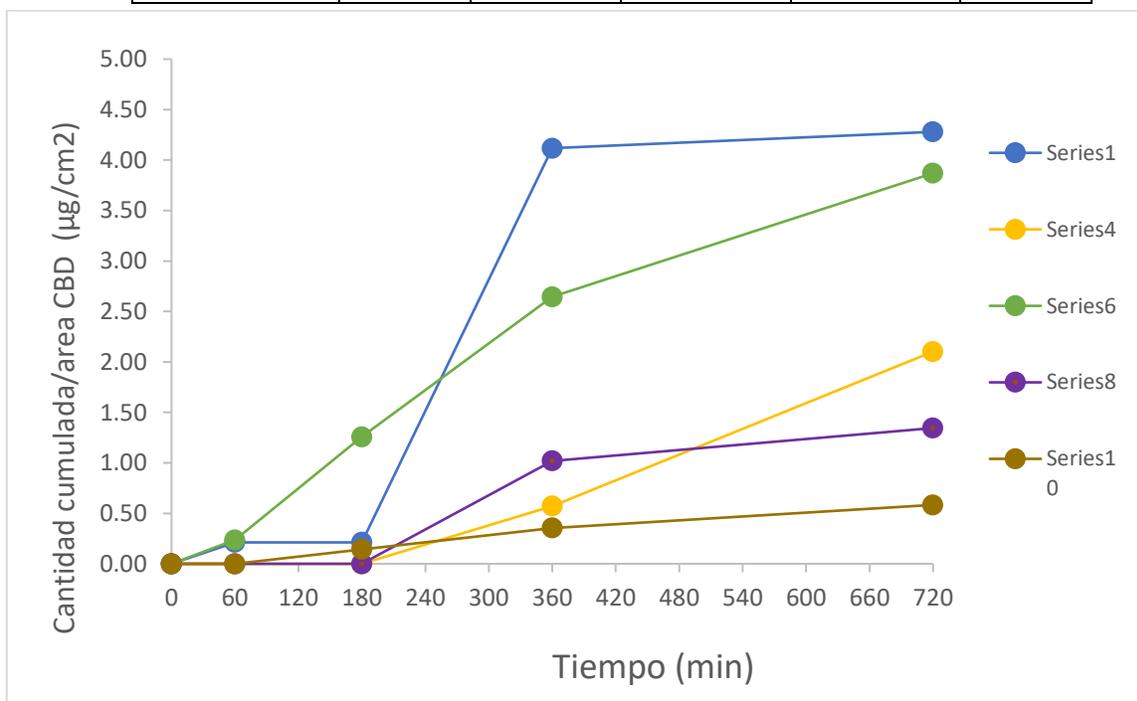


Figura 26. Perfiles de permeación del gel de CBD en celdas de Franz

Para entender el comportamiento matemático de la permeación esta se basa en la ecuación $J_s = K_p * C_s$ que se detalló en la sección 1.4.5.7.

La cual se representa en Excel, como la sección lineal del comportamiento del curso temporal, donde se obtiene la pendiente K_p y C_s es la concentración inicial, y J_s es la multiplicación de ambos (Figura 27).

En donde el valor importante es la K_p indicando la velocidad a la cual el CBD penetra la piel.

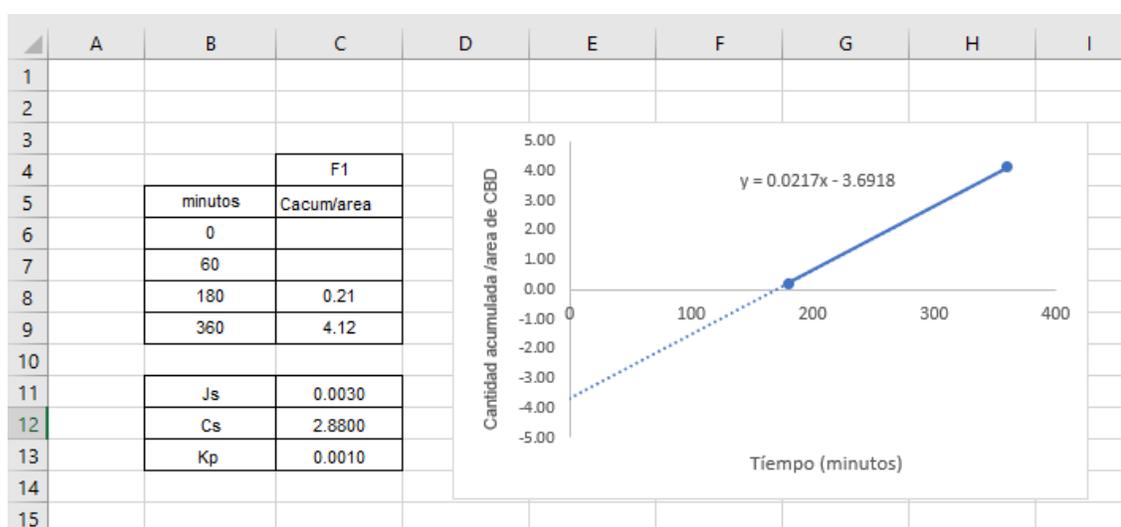


Figura 27. Analisis de pendiente K_p y J_s desde Excel

En la tabla 21, se representan los valores de coeficiente de permeabilidad K_p , flujo al estado estacionario J_{ss} y Concentración inicial C_s de las mejores 5 formulaciones de liposomas de CBD.

Tabla 21. Valores de parámetros J_s y K_p

Parámetro	Formulaciones				
	1	2	3	4	5
J_s	0.021	0.003	0.008	0.006	0.001
C_s	3.280	2.880	2.170	1.490	2.100
K_p	0.006	0.001	0.004	0.004	0.001

Como ya se señaló, los valores de K_p determinarían la velocidad en que el CBD atravesara la piel, en este caso, como uno de las ideas para la formulación es que el CBD permanezca más tiempo en la epidermis, dado que las enfermedades dérmicas se originan en este sitio, lo ideal es que el CBD se mantenga más tiempo a este nivel, por ello el cálculo de la K_p menor nos daría esa característica que se observa en la formulación 2 y 5 (0.001 para ambos) de menor valor que las demás formulaciones cuyos valores van desde 0.004 hasta 0.006.

8.8 Método de cuantificación de cannabidiol por CLAR

El método descrito en la sección 6.6, nos permitió tener una separación del CBD, más debido a que se trata de una determinación en solución etanólica, lo que simplifica su cuantificación al tratarse de una matriz realmente simple. Como se muestra en el cromatograma la elución se presenta a los 2.0 minutos, como se observa en el cromatograma correspondiente al punto de calibración de 25 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 28), por lo que las condiciones permitieron una resolución rápida.

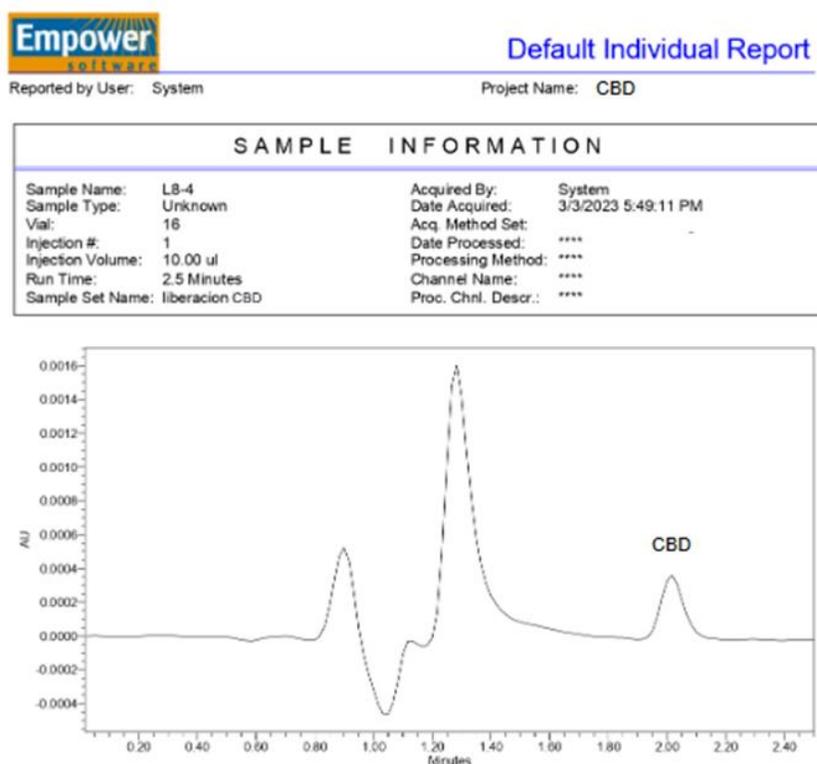


Figura 28. Cromatograma correspondiente a la señal de CBD del punto de calibración de 25 $\mu\text{g/mL}$.

Es importante solo recalcar que las muestras generadas para su cuantificación se sometieron un filtrado en acrodisco de 0.25µm para evitar dañar la columna cromatográfica.

Para la cuantificación de las concentraciones de CBD, tanto del porcentaje de encapsulamiento, cinética de liberación y permeación en piel, se determinó mediante una curva de calibración, la cual se estableció desde los puntos definidos en la sección 6.6. Una vez obtenidas las áreas bajo la curva y mediante el sistema de Empower®, se reportó la curva visualizada en la Figura 29.

La ecuación de la curva de calibración obtenida fue $Y = 1.80 \times 10^4 X + 1.45 \times 10^4$ con un coeficiente de correlación $R^2 = 0.998$, lo que indica una muy buena relación proporcional de concentración con el área bajo la curva del cromatograma generado, lo que indica que el método constituye un buen método para la cuantificación de CBD en solución etanólica.

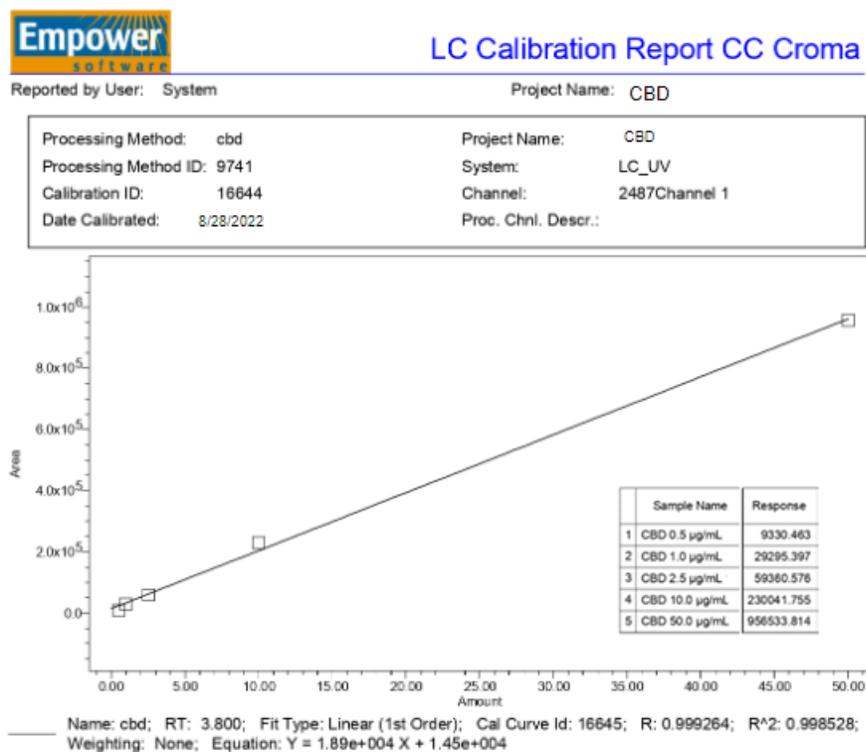


Figura 29. Curva de calibración para determinar concentraciones de CBD en CLAR

9. DISCUSIÓN

La preparación de liposomas, con la gran variedad de metodología y técnicas para su caracterización, constituye en estos tiempos un proceso fácil y barato, que puede mejorar la liberación de algunos fármacos para uso terapéutico, principalmente de aplicación tópica. El uso de CBD en México desde su legalización en el año 2019, ha aumentado considerablemente, aunque su uso es más aceptado como uso cosmético y sus presentaciones son formulaciones como ungüentos y aceites. Esto abre una posibilidad del uso formal de formulaciones liposomadas de CBD para algunas enfermedades dérmicas como psoriasis, dermatitis atópica, prurito, e incluso un uso que podría ser objetivo de estudio como el tratamiento de cáncer en la piel.

Específicamente en nuestro estudio, se ha logrado una optimización con los componentes de las formulaciones de liposomas, que incluye lecitina, tween 80% y CBD, lo que podríamos decir que son clasificados como transferosoma al incluir únicamente un activador de borde (tween 80%). Otro punto importante en este trabajo fue que al ser el CBD un compuesto liofílico, dada su valor LogP o/w de 3.9 y considerado como baja solubilidad en agua, fue relativamente más fácil su integración en las membranas lipídicas de las estructuras de lecitina (datos de EXPASY).

El método que fue elegido a priori para la elaboración de las formulaciones de liposomas, basado en una búsqueda bibliográfica donde este tipo de metodología podría producir liposomas de alto encapsulamiento. Es importante señalar que existen pocos procedimientos para la elaboración de liposomas de CBD y de los que se encontraron esta un método similar reportado para la elaboración de liposomas de CBD y lidocaína (Franzè y cols., 2022), sin embargo, nuestro objetivo fue únicamente la elaboración de liposomas de CBD. Hay que reconocer que existe otra preparación más completa como son la reportadas por los mismos autores (Franzè y cols., 2023), en donde se elaboran proliposomas que resuelven una desventaja de los liposomas fluidos como la fuga de fármaco, y que consisten en proponer un nuevo vehículo que encierra fármacos hidrofóbicos en el núcleo interno de las vesículas, concretamente un sistema de fármaco en micelas en liposomas (DiMiL) y después secado por

pulverización o método de suspensión probando lactosa y sacarosa como vehículos. En general en este método solo pudo incrementar la estabilidad de las formulaciones, sin que se mejorara la constante de permeación del CBD.

De tal manera que la elección de la metodología que se elige en este estudio además de ser sencillo pues está basado en las primeras metodologías propuestas como lo es la hidratación de capa fina y de sonicación para disminución del tamaño de liposomas. Es importante señalar, que esta metodología podría tener el problema de escalamiento para producción a granel de formulaciones lisosomales y generar un cierto grado de contaminación dado el uso de solventes, en nuestro método el uso de solvente de cloroformo se realiza en una mezcla con etanol, por lo que se puede disminuir al mínimo el uso de cloroformo, pero hay que considerar que es parte de las algunas desventajas que siempre acompañan a procesos de transformación de materiales.

Por otra parte el uso de diseño de optimización que, aunque es una parte del diseño para calidad, permitió encontrar las mejores formulaciones que presente las características deseadas como ya se estableció en los liposomas, el tamaño de partícula, índice de polidispersidad, potencial z, porcentaje de encapsulamiento, para después valorar su cinética de liberación y permeación en piel porcina, fue de un valor significativo, pero quedo pendiente y hay que reconocerlo que este diseño fue sencillo y pudo haber incorporado aún más factores que van desde costos de producción hasta otras metodologías.

En particular, lo que pudo arrojar nuestro diseño en concreto fue que las características que se determinaron arrojan unas formulaciones optimas, basado primeramente en las características, que en primer lugar y como tamaño de partícula y de acuerdo con los resultados arrojados nuestras formulaciones estuvieron dentro de 80 nm a 1000 nm por lo que se consideran liposomas unilamelares grandes. Los resultados para el índice de polidispersidad fueron mejores para la tercera formulación cuyo contenido es 95 mg de lecitina, 5 mg de tween 80% y 4 mg de CBD, cuyo valor en promedio fue de 0.2, que indica la presencia de partículas monodispersas ya que valores mayores a 0.4, nos pudieron haber indicado partículas heterogéneas. Es importante que, sin duda, falto un estudio de microscopia para corroborar estos datos

de tamaño de partícula y polidispersidad y nos hubiera también generado datos como tipo de liposomas en cuanto a la lamelalidad. En cuanto a la determinación del potencial Z, este valor ronda alrededor de -25 mV, que es un valor que indica estabilidad en la solución de liposomas, pues es una magnitud de atracción/repulsión de carga entre partículas.

Una vez finalizada la elaboración de soluciones liposomadas, es necesario calcular el porcentaje de encapsulamiento, es decir la cantidad de CBD que queda atrapada en las estructuras de los liposomas, que en este caso después de evaluar varias formulaciones, se seleccionan, aquellas cuyo porcentaje es mayor a 70%, que corresponde a un buen valor de encapsulamiento. Para que este valor sea lo mayor posible, dependerá tanto de las condiciones metodológica y también incluso de las propiedades del compuesto a encapsular, como se había ya indicado el CBD es un compuesto lipofílico, lo cual le confiere ventaja para poderlo elaborar en liposomas.

Además del encapsulamiento, es indispensable que esos liposomas después de un tiempo sean capaces de liberar este compuesto, para que representen un sistema de liberación continua, en este sentido se realizan los estudios de cinética de liberación, para lo cual los liposomas se colocan en una bolsa de membrana de celulosa, para sumergirlas en una solución PBS y liberen su CBD atrapado y según su curso temporal, se define el modelo matemático que explique esa liberación. Ya se han definido algunos modelos matemáticos, de los más utilizados y completos es el Korsmeyer-Peppas, cuya ecuación es: $M_t/M_\infty = Kt^n$, las cinéticas de las 5 mejores formulaciones presentaron un modelo similar, cuyo K promedio fue de 0.85 y una n de 0.25. indicando una liberación fikiana. Aunque el muestreo se realizó hasta 48 horas, se observó que a las 3 horas ya se había liberado la totalidad de CBD, lo que concuerda con una constante de liberación cercana a uno.

La permeación es un proceso más complejo, dado que las formulaciones liposomadas se vehiculiza en gel, para formar una formulación semisólida y factible para aplicación en la piel, entonces la manera en que esta formulación atraviesa la piel es a veces no correspondiente con la liberación y por ello tiene otra modelo en que se puede calcular la constante de permeación, o velocidad de penetración. La ecuación que resulto fue

que $J_{ss} = K_p \cdot C_s$, donde la K_p representa la pendiente en la zona lineal del curso temporal de las cantidades de CBD que traspasan la piel, en nuestras formulaciones, se observaron diferencias importantes, sobre todo porque existieron 2 formulaciones donde este valor de K_p fue de 0.001, es decir una velocidad baja de permeación, con respecto a los 3 restantes, que tuvieron una K_p de 0.004 y 0.006. Por ello se decidió que las formulaciones 2 y 5 con menores K_p , podrían ser las mejores, dado que al ser lento la velocidad de permeación, el CBD durara más tiempo en las capas corneas y podrá ejercer más su efecto terapéutico o cosmético.

Una cuestión también de interés en este sentido es que México aún no existen normas específica para el control de calidad de ungüentos liposomadas, e incluso de estudios de bioequivalencia en formulaciones tópicas, aunque puede ser que estos parámetros están alineados en guías de la OCDE como en el prueba 428, denominada de absorción dérmica, que determina al menos las especificaciones de la prueba de permeabilidad en celdas de Frank, de las cuales tanto la preparación de la piel, las características de temperatura, y las concentraciones de principio activos se siguieron bajo estas recomendaciones, así como el procedimiento de análisis de datos.

Sin embargo, una prueba faltante a esta prueba es la determinación de la toxicidad, (OCDE prueba 402), donde se reporta tabulaciones de efectos observados después de la aplicación en piel de ratas, observando mortalidad, severidad y duración de los efectos tóxicos, cambios de peso corporal, así como estudio de una biopsia post eutanasia, para determinar el estatus de daño en piel, si es que este se presentara.

10. CONCLUSIONES

El objetivo principal de este trabajo consistió en formular y caracterizar las formulaciones de liposomas mediante la evaluación in vitro, con estudios de liberación y permeación.

En base a los resultados obtenidos, se plantean las siguientes conclusiones:

- La técnica de inyección de solvente y extrusión de membrana es apropiada para la elaboración de liposomas con CBD, dado que, fue posible encapsular el CBD en los

liposomas obteniendo resultados de (%EE) porcentaje de eficiencia de encapsulación, superiores a los reportados en la literatura (70%), para este método.

- El uso del software MINITAB, y la optimización de diseño de mezclas, para esta formulación fue adecuado, debido a que las variaciones de las concentraciones de los componentes lecitina, colesterol, tween 80% y porcentaje de CBD, fueron exactas y originaron valores de potencial Zeta, PDI y tamaño de partícula, que nos indicaron una dispersión estable, así como la presencia de partículas monodispersas.
- La incorporación de colesterol a las formulaciones no representó diferencias en cuanto a la estabilidad de las formulaciones ni se obtuvieron mayores porcentajes de eficiencia de encapsulación de CBD, por lo que se limitó su uso.
- El método de análisis de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) fue el adecuado para determinar la cantidad de CBD en los liposomas.
- El método de membrana de diálisis es adecuado para evaluar la liberación de CBD, puesto que se encontró una buena correlación con el modelo de Korsmeyer-Peppas, además de indicar una liberación fickniana.
- La permeabilidad de las formulaciones en gel de CBD, a través de la piel porcina mediante celdas de Frank, determinada por la constante de permeación K_p , cuyo valor fue de 0.001, lo que sustenta la posibilidad de ser una formulación liposomal de liberación efectiva de administración tópica de CBD, por lo que estas formulaciones son efectivas para ser comercializadas.

11. PERSPECTIVAS

Se ha identificado que, para completar este estudio, deberían de obtenerse la morfología de superficie de los liposomas mediante microscopio de barrido, para comprobar el tamaño de partícula, índice de polidispersidad y lamelaridad.

Se debería también realizar estudios de estabilidad de los liposomas, tanto en la formulación inicial o vehiculizado en gel, que es un factor muy importante para su comercialización.

Se podría realizar también este estudio basado en otra plataforma de optimización como Design Expert, que es un software comercial, que permite aplicar herramientas estadísticas y pruebas multifactoriales para diseño de experimentos.

Se propone, que, dentro de los diseños de calidad, este estudio podría ser más amplio, e incluirse dentro de un QbD (Quality by design), diseño por calidad, que ya es un proceso de desarrollo y fabricación y que integra los máximos factores de optimización, desde los básicos hasta factores como lo son los costos de producción, con la mira de optimizarse una producción para comercialización.

Posteriormente que se lograra todo un diseño por calidad, se deberían realizar, estudios de toxicidad y estudios preclínicos o clínicos para verificar el efecto de estas formulaciones en ciertas patologías dérmicas incluyendo cáncer de piel.

12. BIBLIOGRAFIA

Abdayem R, Haftek M. Barrière épidermique [The epidermal barrier]. *Ann Dermatol Venereol*. 2018 Apr;145(4):293-301. French. doi: 10.1016/j.annder.2017.12.001. Epub 2018 Apr 4. PMID: 29625778.

Akomeah FK. Topical dermatological drug delivery: quo vadis? *Curr Drug Deliv*. 2010 Oct;7(4):283-96. doi:10.2174/156720110793360612. PMID: 20695839.

Ambach L, Pintsch F, Broillet A, König S, Weinmann W, Bernhard W. Simultaneous quantification of delta-9-THC, THC-acid A, CBN and CBD in seized drugs using HPLC-DAD. *Forensic Sci Int*. 2014 Oct;243:107-11. doi: 10.1016/j.forsciint.2014.06.008. Epub 2014 Jun 13. PMID: 25005819.

Ascenso A, Raposo S, Batista C, Cardoso P, Mendes T, Praça FG, Bentley MV, Simões S. Development, characterization, and skin delivery studies of related ultradeformable vesicles: transfersomes, ethosomes, and transethosomes. *Int J Nanomedicine*. 2015 Sep 18; 10:5837-51. doi: 10.2147/IJN.S86186. PMID: 26425085; PMCID: PMC4583114.

Ashizawa K. [Nanosize Particle Analysis by Dynamic Light Scattering (DLS)]. *Yakugaku Zasshi*. 2019;139(2):237-248. Japanese. doi: 10.1248/yakushi.18-00171-1. PMID: 30713234.

Atalay S, Jarocka-Karpowicz I, Skrzydlewska E. Antioxidative and Anti-Inflammatory Properties of Cannabidiol. *Antioxidants (Basel)*. 2019 Dec 25;9(1):21. doi: 10.3390/antiox9010021. PMID: 31881765; PMCID: PMC7023045.

Baert B., Boonen J., Burvenich C., Roche N., Stillaert F., Blondeel P., Bocxlaer JV. And DeSpiegeleer B. A New Discriminative Criterion for the Development of Franz Diffusion Tests for Transdermal Pharmaceuticals. *J Pharm Pharmaceut Sci (www.cspsCanada.org)* 13(2) 218 - 230, 2010.

Bangham AD, Horne RW. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *J mol biol*. 1964 may; 8:660-8. doi: 10.1016/s0022-2836(64)80115-7. pmid: 14187392.

Batzri S, Korn ED. Single bilayer liposomes prepared without sonication. *Biochim Biophys Acta*. 1973 Apr 16;298(4):1015-9. doi: 10.1016/0005-2736(73)90408-2. PMID: 4738145.

Baxa U. Imaging of Liposomes by Transmission Electron Microscopy. *Methods Mol Biol*. 2018; 1682:73-88. doi: 10.1007/978-1-4939-7352-1_8. PMID: 29039095.

Blum F. High performance liquid chromatography. *Br J Hosp Med (Lond)*. 2014 Feb;75(2):C18-21. doi: 10.12968/hmed.2014.75.Sup2.C18. PMID: 24521830.

Bozzuto G, Molinari A. Liposomes as nanomedical devices. *Int J Nanomedicine*. 2015 Feb 2; 10:975-99. doi: 10.2147/IJN.S68861. PMID: 25678787; PMCID: PMC4324542.

Casiraghi A, Musazzi UM, Centin G, Franzè S, Minghetti P. Topical Administration of Cannabidiol: Influence of Vehicle-Related Aspects on Skin Permeation Process. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2020 Oct 23;13(11):337. doi: 10.3390/ph13110337. PMID: 33114270; PMCID: PMC7690861.

Cevc G, Blume G. Lipid vesicles penetrate intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. *Biochim Biophys Acta*. 1992 Feb 17;1104(1):226-32. doi: 10.1016/0005-2736(92)90154-e. PMID: 1550849.

Clogston JD, Patri AK. Zeta potential measurement. *Methods Mol Biol*. 2011; 697:63-70. doi: 10.1007/978-1-60327-198-1_6. PMID: 21116954.

COFEPRIS. Lineamientos en materia de control sanitario de la cannabis y derivados de la misma. Oficio no. SOO/143/2018.

Crocq MA. History of cannabis and the endocannabinoid system^[P]_[SEP]. *Dialogues Clin Neurosci*. 2020 Sep;22(3):223-228. doi: 10.31887/DCNS.2020.22.3/mcrocq. PMID: 33162765; PMCID: PMC7605027.
Cui M, Wiraja C, Chew SWT, Xu C. Nanodelivery Systems for Topical Management of Skin Disorders. *Mol Pharm*. 2021 Feb 1;18(2):491-505. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.0c00154. Epub 2020 Jun 14. PMID: 32470311.

DrugBank: Cannabidiol (página de internet). DrugBank; 2023. <https://go.drugbank.com/drugs/DB09061>

EMA/H/C/004675. Epidoex <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/epidyolex>

Environmental Health Criteria 235. Dermal Absorption (WHO, 2006).

EXPASY (Expert Protein Analysis System, Sistema Experto de Análisis de Proteínas) <https://www.expasy.org/>

Fan Y, Marioli M, Zhang K. Analytical characterization of liposomes and other lipid nanoparticles for drug delivery. *J Pharm Biomed Anal*. 2021 Jan 5; 192:113642. doi: 10.1016/j.jpba.2020.113642. Epub 2020 Sep 19. PMID: 33011580.

Farm Bill Primer: Hemp Cultivation and Processing) <https://crsreports.congress.gov> | IF11088. 2018.

FDA. Liposome Drug Products Chemistry, Manufacturing, and Controls; Human Pharmacokinetics and Bioavailability and Labeling. 2018. Documentation Guidance for Industry. <https://www.fda.gov/media/70837/download>.

Franz K, Kanz KG, Bogner-Flatz V. Schürfwunden gründlich säubern! [Skin abrasion]. *MMW Fortschr Med*. 2021 Sep;163(16):48-49. German. doi: 10.1007/s15006-021-0223-y. PMID: 34533728.

Franzè S, Angelo L, Casiraghi A, Minghetti P, Cilurzo F. Design of Liposomal Lidocaine/Cannabidiol Fixed Combinations for Local Neuropathic Pain Treatment. *Pharmaceutics*. 2022 Sep 10;14(9):1915. doi: 10.3390/pharmaceutics14091915. PMID: 36145663; PMCID: PMC9504077.

Franzè S, Ricci C, Del Favero E, Rama F, Casiraghi A, Cilurzo F. Micelles-in-Liposome Systems Obtained by Proliposomal Approach for Cannabidiol Delivery: Structural Features and Skin Penetration. *Mol Pharm*. 2023 Jul 3;20(7):3393-3402. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.3c00044. Epub 2023 Jun 12. PMID: 37306238.

Frederik PM, Hubert DH. Cryoelectron microscopy of liposomes. *Methods Enzymol*. 2005; 391:431-48. doi: 10.1016/S0076-6879(05)91024-0. PMID: 15721395.

Galiègue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carrière D, Carayon P, Bouaboula M, Shire D, Le Fur G, Casellas P. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem*. 1995 Aug 15;232(1):54-61. doi: 10.1111/j.1432-1033.1995.tb20780.x. PMID: 7556170.

Gęgotek A, Atalay S, Rogowska-Wrzesińska A, Skrzydlewska E. The Effect of Cannabidiol on UV-Induced Changes in Intracellular Signaling of 3D-Cultured Skin Keratinocytes. *Int J Mol Sci*. 2021 Feb 2;22(3):1501. doi: 10.3390/ijms22031501. PMID: 33540902; PMCID: PMC7867360.

Gao HL, Jiang XG. [The progress of novel drug delivery systems]. *Yao Xue Xue Bao*. 2017 Feb;52(2):181-8. Chinese. PMID: 29979498.

Gravitz L. Skin. Nature. 2018 Nov;563(7732): S83. doi: 10.1038/d41586-018-07428-4. PMID: 30464282. Guimarães D, Cavaco-Paulo A, Nogueira E. Design of liposomes as drug delivery system for therapeutic applications. Int J Pharm. 2021 May 15; 601:120571. doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.120571. Epub 2021 Apr 2. PMID: 33812967.

Hammell DC, Zhang LP, Ma F, Abshire SM, McIlwrath SL, Stinchcomb AL, Westlund KN. Transdermal cannabidiol reduces inflammation and pain-related behaviours in a rat model of arthritis. Eur J Pain. 2016 Jul;20(6):936-48. doi: 10.1002/ejp.818. Epub 2015 Oct 30. PMID: 26517407; PMCID: PMC4851925.

Handa K, Herrmann S. Defining cytolytic T lymphocyte recognition of chemically modified self. I. Response to trinitrophenyl-H-2Kk. J Immunol. 1985 Sep;135(3):1564-72. PMID: 2410495.

Has C, Sunthar P. A comprehensive review on recent preparation techniques of liposomes. J Liposome Res. 2020 Dec;30(4):336-365. doi: 10.1080/08982104.2019.1668010. Epub 2019 Sep 27. PMID: 31558079.

Ibeas Bih, C., Chen, T., Nunn, A. V., Bazelot, M., Dallas, M., & Whalley, B. J. (2015). Molecular targets of cannabidiol in neurological disorders. *Neurotherapeutics*, 12, 699-730.

Ita KB. Prodrugs for transdermal drug delivery - trends and challenges. J Drug Target. 2016 Sep;24(8):671-8. doi: 10.3109/1061186X.2016.1154562. Epub 2016 Mar 17. PMID: 26878159.

Jensen JM, Proksch E. The skin's barrier. G Ital Dermatol Venereol. 2009 Dec;144(6):689-700. PMID: 19907407.

Jeong, S., Kim, M. S., Lee, S. H., & Park, B. D. (2019). Epidermal endocannabinoid system (EES) and its cosmetic application. *Cosmetics*, 6(2), 33.

Kamra, M., & Diwan, A. Liposomes in dermatological diseases. *Journal of Applied Pharmaceutical Research* 2017, 5(2): 01–08

Kumar S, Singh JP, Giri D, Mishra S. Effect of polydispersity on the dynamics of active Brownian particles. Phys Rev E. 2021 Aug;104(2-1):024601. doi: 10.1103/PhysRevE.104.024601. PMID: 34525623.

Large DE, Abdelmessih RG, Fink EA, Auguste DT. Liposome composition in drug delivery design, synthesis, characterization, and clinical application. Adv Drug Deliv Rev. 2021 Sep; 176:113851. doi: 10.1016/j.addr.2021.113851. Epub 2021 Jul 2. PMID: 34224787.

Lasch, J. "Preparation of liposomes, in "Liposomes," edited by VP Torchilin and V. Weissig." (2003).

Liu, P.; Chen, G.; Zhang, J. A Review of Liposomes as a Drug Delivery System: Current Status of Approved Products, Regulatory Environments, and Future Perspectives. *Molecules* 2022, 27, 1372. <https://doi.org/10.3390/molecules27041372>

Lu HC, Mackie K. Review of the Endocannabinoid System. Biol Psychiatry Cogn Neurosci Neuroimaging. 2021 Jun;6(6):607-615. doi: 10.1016/j.bpsc.2020.07.016. Epub 2020 Aug 1. PMID: 32980261; PMCID: PMC7855189.

Manosro A, Jantrawut P, Khositsuntiwong N, Manosroi W, Manosroi J. Novel Elastic Nanovesicles for Cosmeceutical and pharmaceutical Applications. Chiang Mai J Sci. 2009;36(2):168–178.

Martins AM, Gomes AL, Vilas Boas I, Marto J, Ribeiro HM. Cannabis-Based Products for the Treatment of Skin Inflammatory Diseases: A Timely Review. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2022 Feb 9;15(2):210. doi: 10.3390/ph15020210. Erratum in: *Pharmaceuticals (Basel)*. 2022 Jul 11;15(7): PMID: 35215320; PMCID: PMC8878527.

Marwah H, Garg T, Goyal AK, Rath G. Permeation enhancer strategies in transdermal drug delivery. *Drug Deliv.* 2016;23(2):564-78. doi: 10.3109/10717544.2014.935532. Epub 2014 Jul 9. PMID: 25006687.

McDonagh MS, Morasco BJ, Wagner J, Ahmed AY, Fu R, Kansagara D, Chou R. Cannabis-Based Products for Chronic Pain: A Systematic Review. *Ann Intern Med.* 2022 Aug;175(8):1143-1153. doi: 10.7326/M21-4520. Epub 2022 Jun 7. PMID: 35667066.

Mendez R. Sonication-Based Basic Protocol for Liposome Synthesis. *Methods Mol Biol.* 2023; 2625:365-370. doi: 10.1007/978-1-0716-2966-6_31. PMID: 36653658.

Minitab®. 2020. <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/20/>

Mlost J, Bryk M, Starowicz K. Cannabidiol for Pain Treatment: Focus on Pharmacology and Mechanism of Action. *Int J Mol Sci.* 2020 Nov 23;21(22):8870. doi: 10.3390/ijms21228870. PMID: 33238607; PMCID: PMC7700528.

Montgomery, D.C. (2012) *Design and Analysis of Experiments*. 8th Edition, John Wiley & Sons, New York.

Moghtaderi M, Sedaghatnia K, Bourbour M, Fatemizadeh M, Salehi Moghaddam Z, Hejabi F, Heidari F, Quazi S, Farasati Far B. Niosomes: a novel targeted drug delivery system for cancer. *Med Oncol.* 2022 Sep 29;39(12):240. doi: 10.1007/s12032-022-01836-3. PMID: 36175809.

Mortazavi SM, Mohammadabadi MR, Khosravi-Darani K, Mozafari MR. Preparation of liposomal gene therapy vectors by a scalable method without using volatile solvents or detergents. *J Biotechnol.* 2007 May 10;129(4):604-13. doi: 10.1016/j.jbiotec.2007.02.005. Epub 2007 Feb 14. PMID: 17353061.

Nakhaei P, Margiana R, Bokov DO, Abdelbasset WK, Jadidi Kouhbanani MA, Varma RS, Marofi F, Jarahian M, Beheshtkhoo N. Liposomes: Structure, Biomedical Applications, and Stability Parameters With Emphasis on Cholesterol. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021 Sep 9; 9:705886. doi: 10.3389/fbioe.2021.705886. PMID: 34568298; PMCID: PMC8459376.

Navarro-Tovar G. Liposomas. Nanoburbuja de lípidos con aplicaciones en biomedicina. *Universitarios Potosinos. Revista de divulgación científica. UASLP.* Año 15 numero 229 noviembre 2018.

OECD (2004), Test No. 428: Skin Absorption: In Vitro Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, doi.org/10.1787/9789264071087-en.

OECD (2017), Test No. 402: Acute Dermal Toxicity, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, doi.org/10.1787/9789264070585-en.

Opatha SAT, Titapiwatanakun V, Chutoprapat R. Transfersomes: A Promising Nanoencapsulation Technique for Transdermal Drug Delivery. *Pharmaceutics.* 2020 Sep 9;12(9):855. doi: 10.3390/pharmaceutics12090855. PMID: 32916782; PMCID: PMC7559928.

Peng J, Fan M, And C, Ni F, Huang W, Luo J. A narrative review of molecular mechanism and therapeutic effect of cannabidiol (CBD). *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2022 Apr;130(4):439-456. doi: 10.1111/bcpt.13710. Epub 2022 Feb 6. PMID: 35083862.

Pisanti, S., Malfitano, A. M., Ciaglia, E., Lamberti, A., Ranieri, R., Cuomo, G., ... & Bifulco, M. (2017). Cannabidiol: State of the art and new challenges for therapeutic applications. *Pharmacology & therapeutics*, 175, 133-150.

Poznansky MJ, Juliano RL. Biological approaches to the controlled delivery of drugs: a critical review. *Pharmacol Rev.* 1984 Dec;36(4):277-336. PMID: 6395142.

Prigent F. L'hypoderme appartient à la peau [The hypodermis belongs to the skin]. *Ann Dermatol Venereol.* 2002 Aug-Sep;129(8-9):1053. French. PMID: 12442108.

Rojo-Bustamante E, Íñigo-Marco I, Abellanas MA, Vinueza-Gavilanes R, Baltanás A, Luquin E, Arrasate M, Aymerich MS. CB2 Receptors and Neuron-Glia Interactions Modulate Neurotoxicity Generated by MAGL Inhibition. *Biomolecules.* 2020 Aug 18;10(8):1198. doi: 10.3390/biom10081198. PMID: 32824740; PMCID: PMC7464766.

Romero EL, Morilla MJ. Highly deformable and highly fluid vesicles as potential drug delivery systems: theoretical and practical considerations. *Int J Nanomedicine.* 2013; 8:3171–3186.

Rutter N. The dermis. *Semin Neonatol.* 2000 Nov;5(4):297-302. doi: 10.1053/siny.2000.0016. PMID: 11032713.

Santos LL, Swofford NJ, Santiago BG. In Vitro Permeation Test (IVPT) for Pharmacokinetic Assessment of Topical Dermatological Formulations. *Curr Protoc Pharmacol.* 2020 Dec;91(1):e79. doi: 10.1002/cpph.79. PMID: 32991075.

Saroz Y, Kho DT, Glass M, Graham ES, Grimsey NL. Cannabinoid Receptor 2 (CB2) Signals via G-alpha-s and Induces IL-6 and IL-10 Cytokine Secretion in Human Primary Leukocytes. *ACS Pharmacol Transl Sci.* 2019 Oct 1;2(6):414-428. doi: 10.1021/acspsci.9b00049. PMID: 32259074; PMCID: PMC7088898.

Scheau, C., Badarau, I. A., Mihai, L. G., Scheau, A. E., Costache, D. O., Constantin, C., ... & Caruntu, A. (2020). Cannabinoids in the pathophysiology of skin inflammation. *Molecules*, 25(3), 652.

Schurman LD, Lu D, Kendall DA, Howlett AC, Lichtman AH. Molecular Mechanism and Cannabinoid Pharmacology. *Handb Exp Pharmacol.* 2020; 258:323-353. doi: 10.1007/164_2019_298. PMID: 32236882; PMCID: PMC8637936.

Sheriff, T., Lin, M. J., Dubin, D., & Khorasani, H. (2020). The potential role of cannabinoids in dermatology. *Journal of Dermatological Treatment*, 31(8), 839-845.

Simões A, Veiga F, Vitorino C, Figueiras A. A Tutorial for Developing a Topical Cream Formulation Based on the Quality by Design Approach. *J Pharm Sci.* 2018 Oct;107(10):2653-2662. doi: 10.1016/j.xphs.2018.06.010. Epub 2018 Jun 20. PMID: 29935297.

Smith MC, Crist RM, Clogston JD, McNeil SE. Zeta potential: a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes. *Anal Bioanal Chem.* 2017 Sep;409(24):5779-5787. doi: 10.1007/s00216-017-0527-z. Epub 2017 Jul 31. PMID: 28762066.

Ständer, S., Schmelz, M., Metze, D., Luger, T., & Rukwied, R. (2005). Distribution of cannabinoid receptor 1 (CB1) and 2 (CB2) on sensory nerve fibers and adnexal structures in human skin. *Journal of dermatological science*, 38(3), 177-188.

Szoka F Jr, Papahadjopoulos D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978 Sep;75(9):4194-8. doi: 10.1073/pnas.75.9.4194. PMID: 279908; PMCID: PMC336078.

Teitelbaum J. A Hemp oil, CBD, and Marijuana Primer: Powerful Pain, Insomnia, and Anxiety-relieving Tools! *Altern Ther Health Med.* 2019 Jun;25(S2):21-23. PMID: 31202200.

Touitou E, Alkabes M, Dayan N, Eliaz M. Ethosomes: novel vesicular carriers for enhanced skin delivery. *Pharm Res.* 1997; 14:305–306.

Verme, J. L., Fu, J., Astarita, G., La Rana, G., Russo, R., Calignano, A., & Piomelli, D. (2005). The nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor- α mediates the anti-inflammatory actions of palmitoylethanolamide. *Molecular pharmacology*, 67(1), 15-19.

Vitorino C, Sousa J, Pais A. Overcoming the skin permeation barrier: challenges and opportunities. *Curr Pharm Des.* 2015;21(20):2698-712. doi: 10.2174/1381612821666150428124053. PMID: 25925125.

von Wrede R, Helmstaedter C, Surges R. Cannabidiol in the Treatment of Epilepsy. *Clin Drug Investig.* 2021 Mar;41(3):211-220. doi: 10.1007/s40261-021-01003-y. Epub 2021 Feb 9. PMID: 33559102; PMCID: PMC7946683.

Wang FC, Acevedo N, Marangoni AG. Encapsulation of phytosterols and phytosterol esters in liposomes made with soy phospholipids by high pressure homogenization. *Food Funct.* 2017 Nov 15;8(11):3964-3969. doi: 10.1039/c7fo00905d. PMID: 28972217.

Woodle MC, Papahadjopoulos D. Liposome preparation and size characterization. *Methods Enzymol.* 1989; 171:193-217. doi: 10.1016/s0076-6879(89)71012-0. PMID: 2593841.

Wu IY, Bala S, Škalko-Basnet N, di Cagno MP. Interpreting non-linear drug diffusion data: Utilizing Korsmeyer-Peppas model to study drug release from liposomes. *Eur J Pharm Sci.* 2019 Oct 1; 138:105026. doi: 10.1016/j.ejps.2019.105026. Epub 2019 Jul 30. PMID: 31374254.

Yu M, Yuan W, Li D, Schwendeman A, Schwendeman SP. Predicting drug release kinetics from nanocarriers inside dialysis bags. *J Control Release.* 2019 Dec 10; 315:23-30. doi: 10.1016/j.jconrel.2019.09.016. Epub 2019 Oct 16. PMID: 31629038.

Zhang H. Thin-Film Hydration Followed by Extrusion Method for Liposome Preparation. *Methods Mol Biol.* 2017; 1522:17-22. doi: 10.1007/978-1-4939-6591-5_2. PMID: 27837527.

13. GLOSARIO

- 2AG.** (2 - Araquinoil Glicerol)
- 5HT1A.** Receptores serotoninérgicos del tipo 1A
- Å.** Angstrom
- ADN.** Ácido desoxirribonucleico
- AEA.** (N- Araquidonoil- etanolamina)
- CLAR.** Cromatografía líquida de alta resolución
- CB1.** Receptor cannabinoide tipo 1
- CB2.** Receptor cannabinoide tipo 2
- CBC.** Cannabicromeno
- CBD.** Cannabidiol
- CBG.** Cannabigerol
- CBN.** Cannabinol
- CO2.** Dióxido de Carbono
- COFEPRIS.** Comisión Federal para la protección contra riesgos sanitarios
- COX.** Enzima ciclooxigenasa
- Cs.** Diferencia de concentración del soluto a través de la membrana
- d.** Grosor de la membrana
- D.** Promedio del coeficiente de difusión a través de la membrana para el soluto
- Da.** Daltons
- DA.** Dermatitis atópica
- DAC.** Dermatitis alérgica de contacto
- DELOS.** Despresurización de un líquido expandido método de solución orgánica-suspensión
- DEO.** Diseño de experimentos para optimización
- DLS.** Dispersión de luz dinámica
- DOPC.** Dioleoil-sn-glicero-3-fosfolina
- DOPE.** 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
- DOPG.** Dioleoil fosfatidilglicerol
- DRXP.** Dispersión de rayos X de ángulo pequeño
- EA.** Eczema asteotótico
- ELD.** Electroforesis Laser Doppler
- EMA.** Agencia Europea de medicamentos
- FAAH.** Amida Hidrolasa de ácidos grasos
- FDA.** Administración de Alimentos y Medicamentos (EUA)
- GPR55.** Receptor acoplado a proteínas G55
- GS.** Glándulas sebáceas
- GUV.** Giant unilamellar vesicle – Vesículas unilamelares gigantes
- HaCaT.** Células epiteliales humanas transformadas de forma espontánea
- IL 12.** Interleucina 12
- IL 17.** Interleucina 17
- IL 2.** Interleucina 2
- IL 22.** Interleucina 22
- IL 6.** Interleucina 6
- IL 8.** Interleucina 8

IL 9. Interleucina 9

Js. Flujo del soluto en el estado de equilibrio

Km. Coeficiente de partición del soluto (solución/piel)

Kp. Coeficiente de permeabilidad

Kt . Constante de liberación

LPS. Lipopolisacáridos

LUV. Large Unilamellar Vesicle

LUV. Large unilamellar vesicle – Vesículas unilamelares grandes

MCP-2. Proteína quimiotáctica de quimocitos

MFA. Microscopía de fuerza atómica

MLV. Multilamellar vesicle – Vesículas multilamelares

Mt/M ∞ . Fracción de masa al tiempo t y masa total

n. Comportamiento tipo Fick

NFK β . Factor nuclear Kappa Beta

PCS. Espectroscopía de correlación fotónica

PEG. Polietilenglicol

pH. Potencial de iones hidrógeno

PPAR. Receptores activadores proliferadores de peroxisomas

PSI. Libra de fuerza por pulgada cuadrada

pZ. Potencial Zeta

QELS. Dispersión cuasi elástica de luz

SAS. Anti-solvente supercrítico

SCF. Métodos de fluidos supercríticos

SCRPE. Evaporación de fase inversa supercrítica

SEC. Sistema endocannabinoide

SEM. Microscopía óptica de barrido

SNC. Sistema nervioso central

SUV. Small Unilamellar Vesicle

SUV. Small unilamellar vesicle -Vesículas unilamelares pequeñas

TEM. Microscopía electrónica de transmisión

Th2. T helper 2 linfocitos T cooperadores o linfocitos T CD4+

THC. Tetrahidrocannabinol

THCV. Tetrahidrocannabivarin

TNF α . Factor de necrosis tumoral alfa

TRPM8. Receptor del potencial transitorio tipo melastina

TRPV1. Receptores del potencial transitorio

