



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Contribución al desarrollo de una formulación tópica a base de panela con posible actividad cicatrizante

Laura Alejandra Martínez Contreras

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia
Bogotá, Colombia
2023

Contribución al desarrollo de una formulación tópica a base de panela con posible actividad cicatrizante

Laura Alejandra Martínez Contreras

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magíster en Ciencias Farmacéuticas

Directora:

Ph.D. Yolima Baena Aristizábal

Profesora Titular

Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia

Línea de Investigación:

Diseño y desarrollo de productos fitofarmacéuticos

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación en Tecnología de Productos Naturales - TECPRONA

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia

Bogotá, Colombia

2023

A mi gran amor Sebastian y a mi familia.

Declaración de obra original

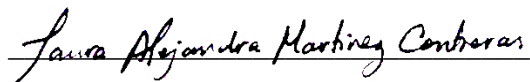
Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



Laura Alejandra Martínez Contreras

30/01/2023

Agradecimientos

A Dios, por la vida, por mi familia y por todas las bendiciones que me rodean.

A la Universidad Nacional de Colombia, por la financiación que recibí para el desarrollo de este proyecto, por permitirme aprender y crecer en todos los aspectos de mi vida.

A Sebastian, por su inmenso amor, por su apoyo incondicional, por sus palabras acertadas en cada momento, por ser el mejor compañero que tuve la fortuna de encontrar. A mis padres, a mi hermano y a mi León por el más puro amor que siempre me brindan, por el apoyo, por su ejemplo, por su dedicación inagotable, por ser mi motor de vida.

A la profesora Yolima Baena, por sus enseñanzas, cariño y calidad humana durante todos estos años, por permitirme reencontrarme con mi profesión y hacer parte de este proyecto de maestría.

Al profesor Luis Fernando Ospina, por su amabilidad, por su disposición y tiempo, por sus enseñanzas y por su gran ayuda sin ningún interés, por compartirme sus conocimientos y todo lo necesario para la realización de los ensayos *in vivo*.

A la profesora Lucia Botero por su orientación con los ensayos histopatológicos. A los profesores Álvaro Orjuela y Juan Carlos Serrato, por su colaboración con el préstamo de los equipos.

A la empresa Vantage, por la donación de las materias primas, en especial a Claudia Torres, por su amable gestión y apoyo.

A la señora Patricia y a Don Jorge por su compañía, conversaciones y risas.

A mis grandes amigos que me acompañaron durante todo este proceso. Gracias a Natalia Linares, por ser esa persona tan única y especial, por compartirme su proceso, por todos los momentos que compartimos en el laboratorio y fuera de él, por el apoyo y las palabras de aliento, por esta nueva y gran amistad.

A Jors Vargas, por las risas, por el apoyo, por ser el mejor gestor y compañero, muchas gracias por la amistad que hemos forjado durante estos años. A Juan José, a David, a Sandra Ojeda, a Sandra Echeverry, a Lina, a Alejandro y a Estefanía por su amistad, compañía y ayuda con todo lo que necesité.

A Sergio, Daniel y Lina por su ayuda con los ensayos *in vivo*. A Juan Pablo, Mateo, Valentina y Jasblendy por su orientación con los diseños. A mis amigos Andrés, Viviana, Paula, Laura y Henry por su compañía y apoyo constante en mi vida.

Resumen

Contribución al desarrollo de una formulación tópica a base de panela con posible actividad cicatrizante

La cicatrización de heridas es un proceso fisiológico altamente regulado para la recuperación de la funcionalidad de la piel después de un daño o lesión en su estructura por trauma o enfermedad. En la medicina tradicional, la panela se ha utilizado empíricamente para el tratamiento tópico de heridas con resultados satisfactorios, por esta razón, el presente trabajo consistió en desarrollar una formulación tópica a base de panela con el objetivo de evaluar su posible actividad cicatrizante. Para ello, la composición cualicuantitativa y las condiciones operacionales definitivas de la crema se obtuvieron mediante la aplicación de diseños estadísticos experimentales de tipo exploratorio y de optimización. La actividad cicatrizante de la formulación final desarrollada fue evaluada mediante la determinación del cambio progresivo de heridas por escisión realizadas en piel de rata durante 12 días de tratamiento.

El porcentaje de aceite, el porcentaje de emulsificante y la velocidad de homogenización fueron los factores estadísticamente significativos para el tamaño de gota $D_{4,3}$ y el span. La formulación final es estable físicamente, presenta el menor tamaño de gota $D_{4,3}$ y la distribución más estrecha de todas las emulsiones preparadas; esta comprende 7,5% de aceite mineral, 2% de cada alcohol graso, 5% del emulsificante estearato de sorbitano con PEG100 estearato y se prepara a una velocidad de homogenización de 5000 rpm durante 20 minutos. La aplicación de la crema de panela en las lesiones genera un aumento estadísticamente significativo en el porcentaje de contracción respecto a las heridas no tratadas, lo cual evidencia su potencial aplicación para el tratamiento tópico de heridas.

Palabras clave: panela, azúcar de caña no centrífuga, crema, emulsión, cicatrización de heridas.

Abstract

Contribution to the development of a non-centrifugal cane sugar-based topical formulation with possible healing activity

Wound healing is a highly regulated physiological process for the recovery of skin functionality after damage or injury to its structure due to trauma or disease. In traditional medicine, non-centrifugal cane sugar has been used empirically for the topical treatment of wounds with satisfactory results. The present study consisted in developing a topical formulation based on non-centrifugal cane sugar, with the aim of evaluating its possible healing activity. For this purpose, the qualitative-quantitative composition and the definitive operational conditions of the cream were obtained through the application of exploratory and optimization experimental statistical designs. The healing activity of the final formulation developed was evaluated by determining the progressive change of excision wounds performed on rat skin during 12 days of treatment.

The percentage of oil, the percentage of emulsifier and the speed of homogenization were the statistically significant factors for the droplet size $D_{4,3}$ and the span. The final formulation developed is physically stable, presents the smallest droplet size and the narrowest distribution of all the emulsions prepared, it comprises 7,5% mineral oil, 2% of each fatty alcohol, 5% of the emulsifier sorbitan stearate with PEG100 stearate and is prepared at a homogenization speed of 5000 rpm for 20 minutes. The application of the non-centrifugal cane sugar cream generates a statistically significant increase in the contraction percentage compared to untreated wounds, which shows its potential application for topical treatment of wounds.

Keywords: non-centrifugal cane sugar, cream, emulsion, wound healing.

Contenido

	Pág.
Resumen.....	XI
Abstract.....	XII
Lista de figuras.....	XV
Lista de tablas.....	XVIII
Lista de símbolos y abreviaturas	XXI
Introducción.....	1
1. Aspectos teóricos	3
1.1 La piel	3
1.1.1 Heridas	4
1.1.2 Proceso de cicatrización	5
1.2 La panela	6
1.2.1 Propiedades bioactivas de la panela.....	7
1.2.2 Caña de azúcar	9
1.2.3 Producción de la panela	9
1.3 Cremas	11
1.3.1 Estabilizantes de superficie: tensioactivos	13
1.3.2 Emolientes y oclusivos.....	15
1.3.3 Humectantes	16
1.4 Modelos animales para el estudio de cicatrización	17
1.4.1 Modelos de cicatrización heridas agudas.....	17
1.4.2 Roedores.....	18
Objetivos.....	21
Objetivo general.....	21
Objetivos específicos	21
2. Formulación de la crema tópica.....	23
2.1 Materiales	23
2.2 Equipos	24
2.3 Métodos	24
2.3.1 Caracterización fisicoquímica de la panela	24
2.3.2 Determinación de la concentración de panela a emplear en la crema tópica	26
2.3.3 Planteamiento de la formulación	27
2.3.4 Ensayos de formulación.....	28

2.3.5	Emulsiones finales de los diseños exploratorio y de optimización	33
2.3.6	Caracterización de la formulación final	33
2.3.7	Estudio de estabilidad a corto y mediano plazo	34
2.4	Resultados y discusión	35
2.4.1	Caracterización fisicoquímica de la panela	35
2.4.2	Determinación de la concentración de panela a emplear en la crema tópica	36
2.4.3	Ensayos preliminares	39
2.4.4	Diseños estadísticos experimentales	52
2.4.5	Emulsiones finales de los diseños exploratorio y de optimización	78
2.4.6	Caracterización de la formulación final	81
2.4.7	Estudio de estabilidad a corto y mediano plazo	87
2.5	Conclusiones	91
3.	Evaluación de la actividad cicatrizante	93
3.1	Materiales	93
3.2	Métodos	94
3.2.1	Evaluación actividad cicatrizante en modelo de herida por escisión en piel de rata	94
3.2.2	Evaluación histopatológica	97
3.3	Resultados y discusión	97
3.3.1	Evaluación de la actividad cicatrizante en modelo de herida por escisión en piel de rata	97
3.3.2	Estudio histopatológico	105
3.4	Conclusiones	108
4.	Conclusiones y recomendaciones	111
4.1	Conclusiones	111
4.2	Recomendaciones	112
A.	Anexo: Validación de la metodología analítica para la cuantificación de sacarosa, glucosa y fructosa en panela	113
B.	Anexo: Datos estadísticos de los diseños estadísticos experimentales exploratorio y de optimización	127
C.	Anexo: Datos estadísticos del diseño experimental para la evaluación de la actividad cicatrizante	131
D.	Anexo: Carta de aval del proyecto por parte del Comité de Ética de la Facultad de Ciencias y Resolución de acreditación de sus integrantes	135
	Bibliografía	141

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1. Estructura de la piel. Tomado y modificado de La Roche-Posey (17).....	3
Figura 1-2. Proceso de cicatrización de heridas. Tomado y modificado de Moeni A, et al(2)	5
Figura 1-3. Efectos principales de extractos herbales y fitocompuestos en la curación ...	8
Figura 1-4. Proceso de producción de la panela. Tomado de Alarcón A (15).	11
Figura 1-5. Tipos de cremas (a) Emulsión w/o (b) Emulsión o/w (c) Doble emulsión o/w/o	12
Figura 1-6. Tipos de heridas hechas en roedores para el estudio de procesos de cicatrización. Tomado y modificado de Sami A, et al (75).....	18
Figura 2-1. Proceso general de elaboración de las emulsiones.	28
Figura 2-2. Estructura química del estearato de sorbitano y PEG100 estearato. Tomada y modificada de Rowe R, et al (89).....	40
Figura 2-3. Estructura química PEG8 estearato. Tomada y modificada de Rowe R, et al (89).....	40
Figura 2-4. Estructura química Steareth 2 y Steareth 21. Tomada y modificada de Rowe R, et al (89).	40
Figura 2-5. Estructura química Span 80 y Tween 80. Tomada y modificada de Rowe R, et al (89).....	41
Figura 2-6. Dependencia de la fracción de fase dispersa y tamaños promedio de gota. Tomado de Derkach SR (93).....	43
Figura 2-7. Micrografías de las formulaciones preparadas en ensayos preliminares (100X)	46
Figura 2-8. Procesos de inestabilización física emulsiones. Tomado y modificado de Wilde PJ (101).....	50
Figura 2-9. Gráfico de Pareto: valor t de los efectos de cada factor sobre la viscosidad (DEE).....	54
Figura 2-10. Cristales líquidos formados por co-emulsificantes y emulsificantes. Tomado y modificado de Ahamadi D, et al. (103).....	55
Figura 2-11. Efecto de la interacción del porcentaje de alcoholes y el tipo de emulsificante sobre la viscosidad (DEE).	56
Figura 2-12. Gráfico de Pareto: valor t de los efectos de cada factor sobre el pH (DEE)	57
Figura 2-13. Gráfico de Pareto: valor t de los efectos de cada factor sobre el tamaño de gota $D_{4,3}$ (DEE)	58

Figura 2-14. Gráfico de Pareto: valor t de los efectos de cada factor sobre el span (DEE)	60
Figura 2-15. Niveles de optimización para disminuir el tamaño de gota y span en cada variable independiente (DEE).	63
Figura 2-16. Gráfico de Pareto: valor t de los efectos de los factores sobre la viscosidad. (DEO)	65
Figura 2-17. Gráfico de superficie respuesta de la influencia del porcentaje de aceite y porcentaje de emulsificante sobre la viscosidad (DEO).....	66
Figura 2-18. Gráfico de superficie respuesta de la influencia del porcentaje de aceite y la velocidad de homogenización (rpm) sobre la viscosidad (DEO).....	67
Figura 2-19. Gráfico de superficie respuesta de la influencia del porcentaje de emulsificante y la velocidad de homogenización (rpm) sobre la viscosidad (DEO)	67
Figura 2-20. Cubo del efecto de los tres factores: porcentaje de aceite, porcentaje de emulsificante y velocidad de homogenización sobre la viscosidad (DEO).....	68
Figura 2-21. Gráfico de Pareto: valor t de los efectos de los factores sobre el pH (DEO).	69
Figura 2-22. Cubo del efecto de los tres factores: porcentaje de aceite, porcentaje de emulsificante y velocidad de homogenización sobre el pH (DEO).....	70
Figura 2-23. Gráfico de Pareto: valor t de los efectos de los factores sobre el tamaño de gota $D_{4,3}$ (DEO)	71
Figura 2-24. Gráfico de superficie respuesta de la influencia del porcentaje de aceite y del porcentaje de emulsificante sobre el tamaño de gota $D_{4,3}$ (DEO).	72
Figura 2-25. Gráfico de superficie respuesta de la influencia del porcentaje de aceite y la velocidad de homogenización sobre el tamaño de gota $D_{4,3}$ (DEO)	73
Figura 2-26. Gráfico de superficie respuesta de la influencia del porcentaje de emulsificante y la velocidad de homogenización sobre el tamaño de gota $D_{4,3}$ (DEO)	73
Figura 2-27. Cubo del efecto de los tres factores: porcentaje de aceite, porcentaje de emulsificante y velocidad de homogenización en el tamaño de gota $D_{4,3}$ (DEO).	74
Figura 2-28. Gráfico de Pareto: valor t de los efectos de los factores sobre el span(DEO).	75
Figura 2-29. Cubo del efecto del porcentaje de aceite, porcentaje de emulsificante y velocidad de homogenización sobre el span (DEO).....	76
Figura 2-30. Niveles de optimización para disminuir el tamaño de gota $D_{4,3}$ y span (DEO)	78
Figura 2-31. Micrografías de las formulaciones finales del diseño estadístico exploratorio y de optimización (100X) DEE: Diseño estadístico exploratorio; DEO: Diseño estadístico de optimización.....	79
Figura 2-32. Micrografías de las emulsiones de estearato de sorbitano y PEG100 estearato con los tamaños de gota $D_{4,3}$ y span más pequeños del diseño estadístico exploratorio E9: Emulsión 9 DEE; E11: Emulsión 11 DEE.....	80
Figura 2-33. Extensibilidad de emulsión final	82

Figura 2-34. Esfuerzo cortante (Pa) vs velocidad de corte (1/s).....	83
Figura 2-35. Perfiles de esfuerzo cortante/velocidad de corte para fluidos no newtonianos. Tomado y modificado de Miner P (129).....	84
Figura 2-36. Log (viscosidad) (Pa*s) vs Log (esfuerzo cortante) (Pa).....	84
Figura 2-37. Log (esfuerzo cortante) (Pa) vs Log (velocidad de corte) (1/s).....	85
Figura 2-38. Log (esfuerzo cortante) y del Log (viscosidad) (Pa*s) vs Log (velocidad de corte) (1/s).....	85
Figura 2-39. Parámetros viscoelásticos de la emulsión en prueba oscilatoria.....	86
Figura 2-40. Parámetros viscoelásticos de la emulsión en prueba de frecuencia.	87
Figura 2-41. Micrografías de la emulsión final antes y después de estudios de estabilidad a corto y mediano plazo. 0M: Emulsión recién preparada, 1M: Emulsión almacenada a 40°C por un mes, 3M: Emulsión almacenada a 30°C ± 2°C /65%HR ± 5%HR por tres meses.	90
Figura 3-1. Fotografía generación heridas por escisión.	94
Figura 3-2. Diseño experimental: Distribución de las unidades experimentales.....	95
Figura 3-3. Diagrama de cajas de la contracción de las heridas tratadas con crema de panela (CP) y su control negativo (CPC).....	99
Figura 3-4. Diagrama de cajas de la contracción de las heridas tratadas con crema de caléndula (CC) y su control negativo (CCC).	100
Figura 3-5. Diagrama de cajas de la contracción de las heridas tratadas con el vehículo (CSP) y su control negativo (CSPC).	101
Figura 3-6. Diagrama de cajas de la contracción de las heridas tratadas con el vehículo (CSP), la crema de panela (CP) y la crema de caléndula (CC).	102
Figura 3-7. Vista microscópica de tejido de cicatrización después de los 12 días. A: Pústula subcorneal con neutrófilos (N) en vehículo (20x) B: Pústula subcorneal severa con neutrófilos (N) en control negativo (20x).	105
Figura 3-8. Vista microscópica de tejido de cicatrización después de los 12 días. A: Epitelio normal en control negativo (10x) B: Epitelio con úlcera (U) y hemorragia a la luz (H) (10x).	106
Figura 3-9. Vista microscópica de tejido de cicatrización después de los 12 días. A: Tejido de granulación en crema de panela (4x) B: Tejido de granulación en crema de caléndula con adelgazamiento leve de la epidermis (AE) (4x) C: Tejido de granulación en vehículo y hemorragia subepitelial (H) (4x) D: Tejido de granulación en control negativo y hemorragia subepitelial (H) (4x).	106
Figura 3-10. Vista microscópica de tejido de cicatrización después de los 12 días. A: Infiltrado linfoplasmocitario (IL) difuso en crema de caléndula (10x) B: Células gigantes (CG) en crema de caléndula (10x).	107
Figura 3-11. Vista microscópica de tejido de cicatrización de crema de panela después de los 12 días con neovascularización moderada (NV)(10x).	108
Figura A-1. Perfil cromatográfico de estándares de sacarosa 10 mg/ml, glucosa 1 mg/ml y fructosa 1 mg/ml.	116
Figura A-2. Curva de calibración sacarosa (Sistema)	118
Figura A-3. Curva de calibración sacarosa (Método)	119
Figura A-4. Curva de calibración glucosa (Sistema)	120
Figura A-5. Curva de calibración glucosa (Método)	120
Figura A-6. Curva de calibración fructosa (Sistema)	121
Figura A-7. Curva de calibración fructosa (Método)	121

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1. Sistemas emulsificantes en cremas cicatrizantes	14
Tabla 1-2. Principales diferencias entre ratones y humanos en la cicatrización de heridas (73)	19
Tabla 2-1. Relación medida densidad óptica con las UFC para cada uno de los microorganismos evaluados.....	26
Tabla 2-2. Composición cualitativa de las formulaciones cicatrizantes de panela desarrolladas.	27
Tabla 2-3. Composiciones desarrolladas para la selección del sistema emulsificante. ...	29
Tabla 2-4. Diseño estadístico experimental exploratorio – Tipo bloques confundido 2 ⁴ . .	31
Tabla 2-5. Diseño estadístico experimental de optimización –2 ³ de dos repeticiones y cuatro puntos centrales.....	32
Tabla 2-6. Propiedades fisicoquímicas en muestras de panela evaluadas.	35
Tabla 2-7. Unidades formadoras de colonia en cada concentración de panela evaluada respecto a su control.....	37
Tabla 2-8. Placas de agar de las concentraciones de panela evaluadas respecto a su control.....	38
Tabla 2-9. Características fisicoquímicas de las emulsiones preliminares.	41
Tabla 2-10. Aspecto físico de las emulsiones preliminares recién preparadas y después de la aplicación de los tres ciclos de choque térmico entre 40°C y 4°C.....	51
Tabla 2-11. Características fisicoquímicas emulsiones diseño estadístico experimental exploratorio de bloques confundido.....	52
Tabla 2-12. Aspecto físico de las emulsiones del diseño exploratorio antes y después de los ciclos de choque térmico.	61
Tabla 2-13. Características fisicoquímicas emulsiones diseño estadístico de optimización.	64
Tabla 2-14. Aspecto físico de las emulsiones del diseño de optimización antes y después de los ciclos de choque térmico.	77
Tabla 2-15. Formulaciones emulsiones óptimas del diseño estadístico exploratorio y de optimización.....	78
Tabla 2-16. Valores de variables respuesta de las emulsiones finales de cada diseño...	79
Tabla 2-17. Composición cualicuantitativa y condiciones de preparación de la formulación final óptima.	81

Tabla 2-18. Aspecto físico de las réplicas de la emulsión final recién preparadas y después de almacenarse a 40°C durante un mes.	88
Tabla 2-19. Aspecto físico de las réplicas de la emulsión final recién preparadas y después de almacenarse a 30°C ± 2°C /65%HR ± 5%HR durante tres meses.....	89
Tabla 2-20. Tamaños de gota $D_{4,3}$ y span promedio de las réplicas de la emulsión final.	90
Tabla 3-1. Porcentaje de contracción de heridas con la crema de panela (CP) y con su control negativo (CPC).	98
Tabla 3-2. Porcentaje de contracción de heridas con la crema de caléndula (CC) y con su control negativo (CCC).	100
Tabla 3-3. Porcentaje de contracción de heridas del vehículo (CSP) y su control negativo (CSPC).....	101
Tabla 3-4. Porcentajes de contracción con la aplicación de la crema de panela (CP), crema de caléndula (CC) y vehículo (CSP).	102
Tabla 3-5. Seguimiento fotográfico del área de las heridas.....	104
Tabla A-1. Parámetros estadísticos t student para la evaluación de la selectividad de sacarosa en el sistema y método	117
Tabla A-2. Parámetros estadísticos t student para la evaluación de la selectividad de glucosa en el sistema y método	117
Tabla A-3. Parámetros estadísticos t student para la evaluación de la selectividad de fructosa en el sistema y método	117
Tabla A-4. Parámetros estadísticos t student para la evaluación de la linealidad de sacarosa en el sistema y método	119
Tabla A-5. Parámetros estadísticos ANOVA para la evaluación de la linealidad de sacarosa en el sistema y método.....	119
Tabla A-6. Parámetros estadísticos t student para la evaluación de la linealidad de la glucosa en el sistema y método	120
Tabla A-7. Parámetros estadísticos ANOVA para la evaluación de la linealidad de glucosa en el sistema y método.....	121
Tabla A-8. Parámetros estadísticos t student para la evaluación de la linealidad de fructosa en el sistema y método.....	122
Tabla A-9. Parámetros estadísticos ANOVA para la evaluación de la linealidad de fructosa en el sistema y método.....	122
Tabla A-10. Parámetros estadísticos Test de Cochran para la evaluación de la repetibilidad de sacarosa en el sistema y método	123
Tabla A-11. Parámetros estadísticos ANOVA para la evaluación de la repetibilidad de sacarosa en el sistema y método	123
Tabla A-12. Parámetros estadísticos Test de Cochran para la evaluación de la repetibilidad de glucosa en el sistema y método.....	123
Tabla A-13. Parámetros estadísticos ANOVA para la evaluación de la repetibilidad de glucosa en el sistema y método	123
Tabla A-14. Parámetros estadísticos Test de Cochran para la evaluación de la repetibilidad de fructosa en el sistema y método	124
Tabla A-15. Parámetros estadísticos ANOVA para la evaluación de la repetibilidad de fructosa en el sistema y método	124

Tabla A-16. Parámetros estadísticos t student para la evaluación de la exactitud de la metodología analítica para la sacarosa.....	124
Tabla A-17. Parámetros estadísticos t student para la evaluación de la exactitud de la metodología analítica para la glucosa.....	125
Tabla A-18. Parámetros estadísticos t student para la evaluación de la exactitud de la metodología analítica para la fructosa.....	125
Tabla A-19. Parámetros estadísticos para la determinación de límites de cuantificación y detección de sacarosa en el sistema y método.....	125
Tabla A-20. Parámetros estadísticos para la determinación de límites de cuantificación y detección de glucosa en el sistema y método.....	126
Tabla A-21. Parámetros estadísticos para la determinación de límites de cuantificación y detección de fructosa en el sistema y método.....	126
Tabla B-1. ANOVA de los factores y su efecto sobre la viscosidad DEE.....	127
Tabla B-2. ANOVA de los factores y su efecto sobre el pH DEE.....	127
Tabla B-3. ANOVA de los factores y su efecto sobre el tamaño de gota $D_{4,3}$ DEE.....	128
Tabla B-4. ANOVA de los factores y su efecto sobre el span DEE.....	128
Tabla B-5. ANOVA de los factores y su efecto sobre la viscosidad DEO.....	129
Tabla B-6. ANOVA de los factores y su efecto sobre el pH DEO.....	129
Tabla B-7. ANOVA de los factores y su efecto sobre el tamaño de gota $D_{4,3}$ DEO.....	130
Tabla B-8. ANOVA de los factores y su efecto sobre el span DEO.....	130
Tabla C-1. ANOVA de dos vías de medidas repetidas para la crema de panela (CP) y su control negativo (CPC).....	131
Tabla C-2. Comparaciones por pares entre grupos de tratamiento CP y CPC.....	131
Tabla C-3. Comparaciones por pares entre puntos de tiempo CP y CPC.....	132
Tabla C-4. ANOVA de dos vías de medidas repetidas para la crema de caléndula (CC) y su control negativo (CCC).....	132
Tabla C-5. Comparaciones por pares entre puntos de tiempo CC y CCC.....	132
Tabla C-6. ANOVA de dos vías de medidas repetidas para el vehículo (CSP) y su control negativo (CSPC).....	133
Tabla C-7. Comparaciones por pares entre puntos de tiempo CSP y CSPC.....	133
Tabla C-8. ANOVA de dos vías de medidas repetidas para crema de panela (CP), crema de caléndula (CC) y vehículo (CSP).....	133
Tabla C-9. Comparaciones por pares entre grupos de tratamiento CP, CC, CSP.....	133
Tabla C-10. Comparaciones por pares entre puntos de tiempo CP, CC, CSP.....	134

Lista de símbolos y abreviaturas

Símbolos

Símbolo	Término
a_w	Actividad de agua
°Brix	Grados Brix (gramos de sacarosa en la solución)
°C	Grado Celsius
C_E	Concentración emulsificante
cm	Centímetro
cP	Centipoise
C_S^{IN}	Concentración inicial de emulsificante
$D_{4,3}$	Diámetro medio volumétrico
D	Velocidad de corte
g	Gramo, gravedad
G'	Módulo elástico o de almacenamiento
G''	Módulo viscoso o de pérdida
G^*	Módulo complejo
Hz	Herzt
K_B	Constante de Boltzmann
mm	Milímetros
μm	Micrómetros
ml	Mililitros
m s. n. m	Metros sobre el nivel del mar
n	Viscosidad
n_o	Viscosidad fase continua
nm	Nanómetros
ρ	Densidad
Pa	Pascales
Pa^*s	Pascales por segundo
Pe	Número de Peclet
R	Radio
R^2	Tamaño de gota
rpm	Revoluciones por minuto
T	Temperatura
T_c	Temperatura de transición gel-líquido
ϕ	Fracción volumen fase dispersa
$\dot{\gamma}$	Velocidad de corte
θ	Fracción volumen fase oleosa

Símbolo	Término
Γ	Adsorción superficial
σ	Tensión superficial
τ	Esfuerzo cortante
γ	Tensión

Abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>ANOVA</i>	Análisis de varianza
<i>CC</i>	Crema de calendula
<i>CCC</i>	Control negativo crema de calendula
<i>CP</i>	Crema panela
<i>CPC</i>	Control negativo crema panela
<i>CSP</i>	Vehículo
<i>CSPC</i>	Control negativo vehículo
<i>DEE</i>	Diseño estadístico experimental exploratorio
<i>DEO</i>	Diseño estadístico experimental de optimización
<i>DS</i>	Desviación estándar
<i>FAO</i>	Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación
<i>MMP2</i>	Matriz metaloproteinasa 2 y gelatinasa A
<i>NCS</i>	Azúcar de caña no centrifuga
<i>SM</i>	Solución madre mezcla
<i>SMP</i>	Solución madre panela
<i>UFC</i>	Unidades formadoras de colonia

Introducción

La integridad de la piel es necesaria para mantener la homeostasis del cuerpo humano, un daño o lesión en su estructura por trauma o enfermedad, activa inmediatamente diferentes eventos celulares y moleculares que tienen como objetivo la cicatrización completa de la lesión. La cicatrización de heridas es un proceso complejo, dinámico y altamente regulado para la recuperación de la funcionalidad, integridad y homeostasis de la piel (1)(2). Sin embargo, algunas de las cicatrices generadas pueden limitar el funcionamiento físico y afectar emocionalmente, estética y psicosocialmente al individuo, de modo que la búsqueda de alternativas terapéuticas que permitan restaurar adecuadamente la herida, a un costo económicamente accesible, es esencial para proporcionar calidad de vida y bienestar a los pacientes (3).

En este contexto, las cremas se han utilizado ampliamente para mejorar las condiciones de cicatrización de la piel, sus propiedades permiten que se extiendan fácilmente sobre la superficie del área afectada (4), presentan alta afinidad por los exudados de la herida, facilitan la hidratación y emoliencia de la piel lesionada debido a sus componentes lipídicos e hidrofiliidad, siendo por tanto, un vehículo farmacéutico apropiado para el tratamiento o curación de las heridas (5)(6).

Se estima que alrededor del 80% de la población en los países en desarrollo depende casi completamente de la medicina casera para sus necesidades primarias de salud, especialmente a través de la utilización de plantas y/o productos derivados de estas (7). En la medicina tradicional, la panela se ha utilizado como producto natural para el tratamiento tópico y empírico de heridas infectadas (8). La panela es un edulcorante natural procesado mínimamente a través de la evaporación de los jugos de la caña de azúcar (9), su mecanismo cicatrizante no se ha establecido con claridad, sin embargo, varios reportes en la literatura sugieren que debido a la gran cantidad de azúcares, la panela genera una carga osmótica alta en la herida y por lo tanto, una baja actividad de agua que dificulta el crecimiento bacteriano y la generación de posibles infecciones que retardarían el proceso

normal de curación (8)(10). Adicionalmente, es conocido que la sacarosa, uno de los componentes mayoritarios de la panela, estimula la formación de tejido de granulación, incrementa la migración de macrófagos, reduce el edema, forma una capa protectora y acelera el desprendimiento de tejido desvitalizado y necrótico de la herida (11)(12).

En la industria panelera, Colombia es el segundo productor y el principal consumidor a nivel mundial. La producción de panela es considerada como la segunda agroindustria rural más importante del país después del café debido al número de establecimientos productivos, al área sembrada y a la mano de obra vinculada, de ahí que se considere como una fuente importante para la generación de empleos; más de 350.000 campesinos viven de ella y en su mayoría pequeños empresarios y grupos familiares residen en lugares de paz (13)(14). Además, su producción es una de las actividades con mayor tradición, ya que es realizada principalmente en pequeñas explotaciones campesinas mediante procesos artesanales en los que prevalece una alta intensidad de trabajo familiar y vecinal, esto involucra un valor social implícito en su producción y con ello, un patrimonio cultural que es de gran importancia conservar (15).

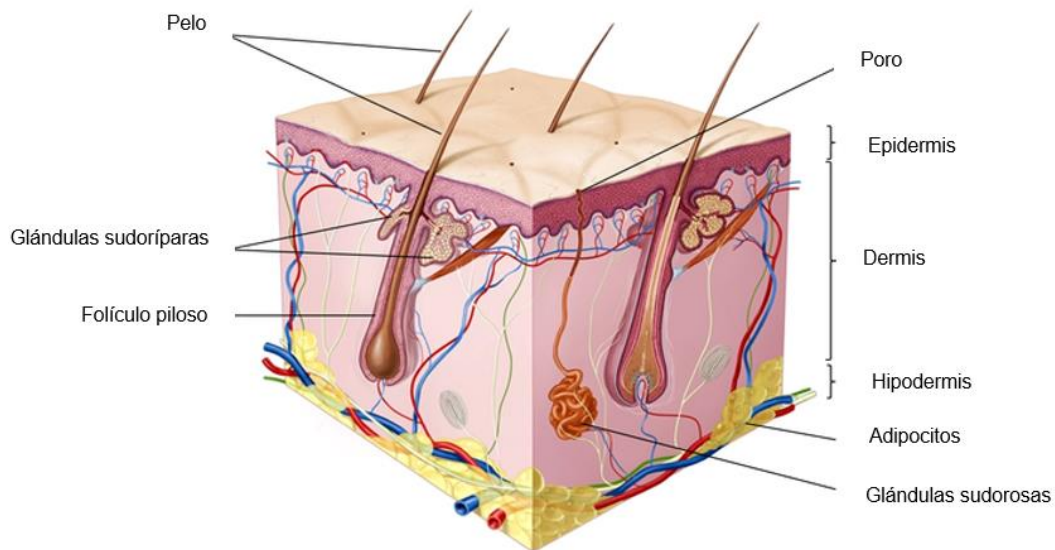
Teniendo en cuenta lo previamente descrito, el presente trabajo consiste en desarrollar una formulación tópica a base de panela mediante la aplicación de diseños estadísticos experimentales de tipo exploratorio y de optimización, con el objetivo de evaluar su posible actividad cicatrizante en modelos *in vivo* de herida por escisión en piel de rata. Con ello, se pretende aprovechar al máximo todas las propiedades funcionales atribuidas, de modo que a mediano y largo plazo su desarrollo pueda influir positivamente en el bienestar integral de los pacientes y de manera complementaria, en aspectos económicos, sociales y culturales del país.

1. Aspectos teóricos

1.1 La piel

La piel es el órgano más grande del cuerpo, cubre toda la superficie externa y es la barrera inicial contra patógenos, alteraciones mecánicas, traumas químicos y daños causados por la luz ultravioleta. Además, es el primer sitio de defensa inmunológica, mantiene la homeostasis del cuerpo al regular la temperatura y pérdida de agua, promueve la formación de vitamina D y través de esta, se perciben diferentes sensaciones como el dolor, el frío y calor (16)(17).

Figura 1-1. Estructura de la piel. Tomado y modificado de La Roche-Posey (17).



La piel está conformada por tres capas que varían significativamente en su anatomía y función, las cuales se conocen como epidermis, dermis e hipodermis. La epidermis o capa externa de la piel representa la principal barrera contra los factores externos, incluye el estrato basal (porción más profunda de la epidermis), estrato espinoso, estrato granuloso, estrato lucido y estrato córneo (porción más superficial), sus células principales son los queratinocitos, melanocitos, células de Langerhans y células de Merkel. La dermis consta

de la matriz extracelular, de terminaciones nerviosas, de vasos sanguíneos y de los fibroblastos que liberan colágeno y elastina para conferir resistencia mecánica y elasticidad a la piel, morfológicamente presenta dos capas: la capa papilar y la capa reticular. Por su parte, la hipodermis es la capa más profunda de la piel, está constituida principalmente de tejido adiposo, es la responsable del aislamiento térmico y de la protección mecánica del cuerpo (2)(16).

1.1.1 Heridas

Una herida es una disrupción en la función y estructura anatómica normal de la piel que resulta de procesos patológicos internos o externos en los órganos implicados, estas pueden ser agudas o crónicas dependiendo del tiempo previsto de reparación. En las heridas agudas el proceso de reparación se completa en un lapso de aproximadamente cuatro semanas y en una secuencia ordenada de fases. En las heridas crónicas, el proceso de reparación es lento debido a lesiones del tejido repetidas y/o a patologías subyacentes que interfieren con el periodo de tiempo y con la secuencia ordenada en que ocurre el proceso de cicatrización (18).

Las heridas también se pueden clasificar de acuerdo con la profundidad de la lesión en:

- **Heridas superficiales de espesor parcial:** Involucran solo la epidermis y la dermis papilar. Curan mediante la epitelización de las unidades pilosebáceas supervivientes. No hay formación de cicatrices y contracción de la herida (19).
- **Heridas profundas de espesor parcial:** Afectan la epidermis, dermis papilar y dermis reticular. Debido a la pérdida de la dermis, la re-epitelización completa puede demorar hasta cuatro semanas (20).
- **Heridas de espesor total:** Involucran las capas más profundas debajo de la dermis reticular, afectando a todas las capas de la piel (19).

Adicionalmente, el cierre de la herida puede ser de primera o segunda intención en función del tamaño de la herida y de la proximidad entre los bordes de esta.

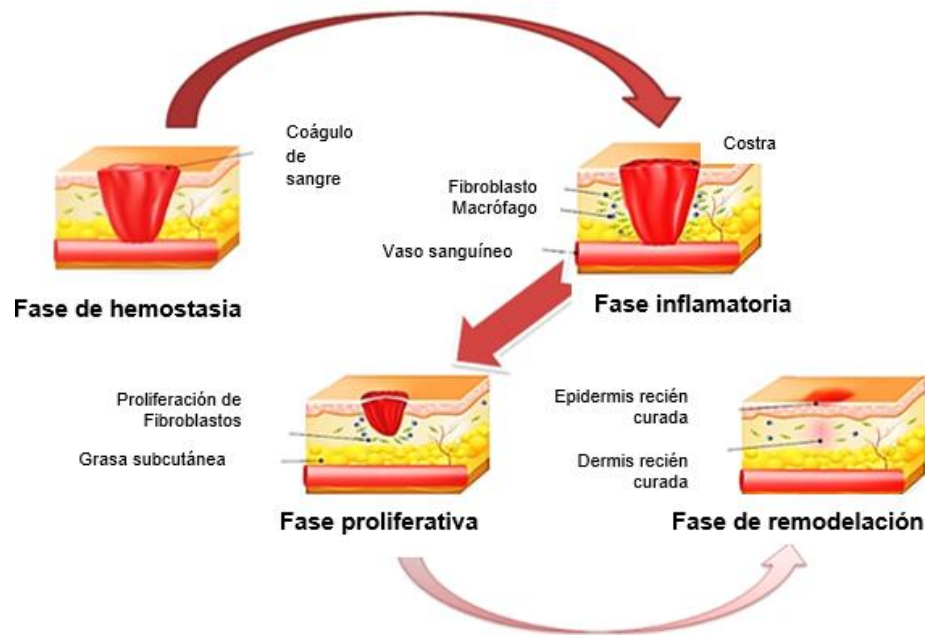
- **Cierre por primera intención:** Proceso que ocurre cuando los bordes de la herida están muy próximos y se pueden unir empleando suturas, cintas quirúrgicas o dispositivos mecánicos.
- **Cierre por segunda intención:** Proceso en heridas de tamaño superior a cuatro centímetros de diámetro, con bordes irregulares y con alguna complicación

(infección, inflamación, comorbilidades del paciente) que impide el cierre quirúrgico. El cierre es dependiente de la formación de tejido de granulación y de una contracción eficiente de los bordes de la herida (21).

1.1.2 Proceso de cicatrización

La cicatrización de heridas es un proceso fisiológico importante para mantener la integridad de la piel después de un traumatismo, ya sea por accidente o por intención. Esta implica cuatro fases sucesivas pero superpuestas, conocidas como fase de hemostasia, inflamatoria, proliferativa y de remodelación (22), las cuales se ilustran en la Figura 1-2.

Figura 1-2. Proceso de cicatrización de heridas. Tomado y modificado de Moeni A, et al (2).



En la fase de hemostasia se evita la pérdida de fluido sanguíneo mediante el cese de la hemorragia y formación del coágulo, el cual consiste en una agregación de trombocitos y plaquetas en una red de fibrina. La acción y agregación de factores de activación incrementan la migración celular al microambiente de la lesión y estimulan la proliferación de fibroblastos (23).

Posteriormente en la fase de inflamación, se presenta una respuesta protectora para destruir y aislar aquellos agentes que representen peligro para el tejido, esta fase se caracteriza por la afluencia de leucocitos en el área de la herida y por la activación de

células inmunitarias como mastocitos, células gamma-delta y células Langerhans que expresan citoquinas proinflamatorias y gran cantidad de sustancias antimicrobianas altamente reactivas (especies reactivas de oxígeno, péptidos catiónicos y proteasas) en el sitio de la lesión. La respuesta inflamatoria continúa con el reclutamiento activo de neutrófilos en respuesta a la activación del sistema complemento, los cuales se encargan de la limpieza del tejido y destrucción de agentes invasores. A partir de las 48 horas posteriores a la lesión, ocurre la migración y diferenciación de los monocitos a macrófagos para la fagocitosis de sustancias patógenas y para la liberación de factores de crecimiento pro-angiogénicos y fibrogénicos que contribuirán al paso de la tercera fase (23).

La fase proliferativa se inicia en el tercer día y dura aproximadamente de 15 a 20 días, se caracteriza por la activación de la angiogénesis, migración de fibroblastos y re-epitelización, lo cual facilita la formación de una matriz extracelular viable con la disminución del área del tejido lesionado. Un tejido de granulación se produce como resultado del crecimiento de capilares y vasos linfáticos de vasos existentes presentes en el sitio de la lesión (neovascularización) (23).

Por último, tras dos o tres semanas del inicio de la lesión ocurre la fase de remodelación cuya finalidad es obtener la máxima resistencia a la tracción mediante la reorganización, degradación y resíntesis de la matriz extracelular. Se produce un intento de recuperar la estructura tisular normal y el tejido de granulación se remodela gradualmente formando un tejido cicatricial obtenido tras la contracción de la herida a causa de los miofibroblastos y de la organización de paquetes de colágeno (23). El objetivo final de un proceso de curación es la *regeneración* de la piel lesionada sin formación de cicatrices (2).

1.2 La panela

La panela es un producto sólido sin refinar obtenido por evaporación del jugo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum L.*). Es un edulcorante procesado mínimamente, cuya importancia radica en su sabor tradicional característico y en las propiedades nutricionales de sus componentes principales (9).

De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), su denominación técnica es azúcar de caña no centrífugo (NCS), no obstante, dependiendo del país de origen es conocida por diferentes nombres, dentro de

los que se encuentran: panela, papelón, rapadura, piloncillo, tapa dulce, jaggery, muscovado y kokuto (9).

La sacarosa es el componente más importante, ya que se encuentra dentro del 76,55 – 89,48%, le siguen agentes reductores como la glucosa y fructosa en un porcentaje del 3,69-10,5%, agua (1,5 – 15,8%), minerales (0,3 y 3,6%), proteínas (0,37 y 1,7%) y grasas (0 y 0,1%). El rango de valores dependerá principalmente de las diferencias entre las variedades de caña de azúcar, condiciones agronómicas y de procesamiento (24).

1.2.1 Propiedades bioactivas de la panela

La panela puede considerarse como un producto bioactivo potencial, ya que presenta actividad antioxidante, citoprotectora y anticancerígena (25). Además, se ha utilizado para el tratamiento tópico y empírico de heridas con resultados satisfactorios; aunque no existe claridad sobre el mecanismo de cicatrización, aparentemente promueve la curación de heridas debido a su alto contenido de azúcar (8).

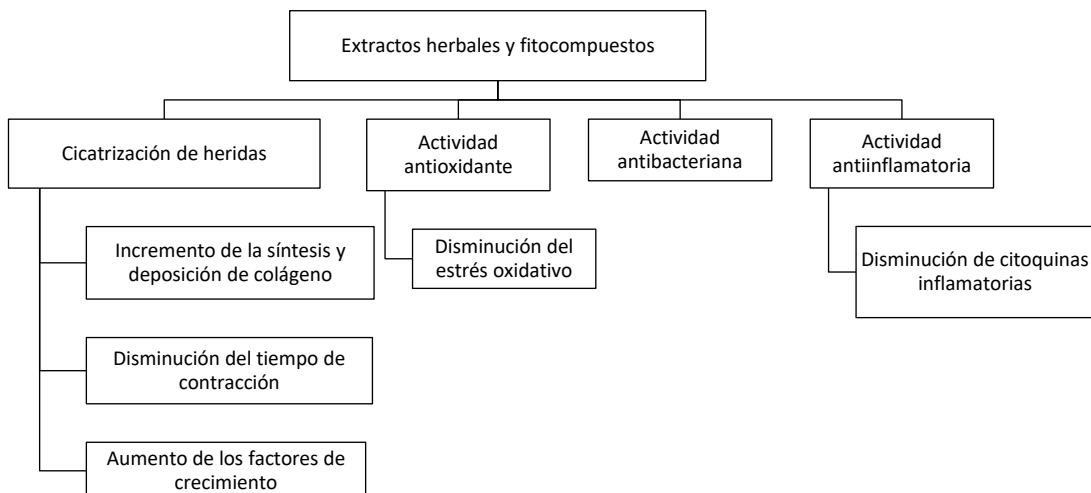
El uso de azúcar para el tratamiento de heridas es uno de los primeros métodos conocidos, se sabe que los mesopotámicos lavaban las heridas con agua o leche y luego las vendaban con miel o resina. En los tiempos modernos su aplicación como cicatrizante se ha expandido hacia América Latina, Europa y Asia (12); los indígenas de la Cordillera Andina la utilizaban de forma empírica para el tratamiento de heridas infectadas a través de productos como la panela en Colombia y de la melaza o chancaca en Ecuador y Perú. Se tiene conocimiento que hacia la década de 1900 se empleaba de forma habitual en hospitales y en remedios curativos. Actualmente, en varios países se vierte sobre las heridas (26), estando su uso principalmente asociado a tratamientos empíricos de la práctica clínica y casera.

El azúcar genera un efecto local de bajo contenido de agua o de alta osmolaridad en la herida que genera la inhibición del crecimiento de bacterias sobre la lesión (10). Reportes adicionales divulgan que el azúcar promueve la formación de tejido de granulación, reduce el edema en las heridas, disminuye el pH de la herida con lo cual se mejora el efecto bacteriostático, estimula la migración de la linfa hacia la solución azucarada proporcionando nutrientes a la estructura tisular (12), acelera el desprendimiento de tejido desvitalizado y necrótico, provee de una fuente de energía local y evita el mal olor sobre la herida (10). La baja actividad de agua no afecta a las células hísticas, ya que existe un

flujo constante de agua desde las regiones internas tan rápido como se transfiere de las células circundantes a la cavidad de la herida (27).

Por otra parte, también se conoce que la panela tiene propiedades antioxidantes debido a la presencia de polifenoles y ácidos fenólicos en su composición, tales como el ácido cafeico, ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido siríngico, ácido vanílico y ácido clorogénico. Ensayos *in vitro* revelan que la panela puede remover radicales libres y reducir cationes férricos, quelar iones metálicos e inhibir la peroxidación. Asimismo, algunos estudios demuestran que incluso produce sustancias antiinflamatorias o reduce el proceso inflamatorio, dado que minimiza significativamente la cantidad de citoquinas inflamatorias como la interleuquina 1 β , interleuquina 6 y el factor de necrosis tumoral TNF α (28). Igualmente, ácidos fenólicos como el ácido gálico y el ácido cinámico proporcionan un efecto bacteriostático al alterar la hidrofiliidad de las membranas bacterianas, lo cual desencadena la formación de poros y su ruptura local (29). De este modo, la mezcla compleja de diversos componentes con propiedades funcionales diferentes (antiinflamatorias, antioxidantes, antimicrobianas), puede resultar en un efecto sinérgico para mejorar la curación y tratamiento de las heridas en la piel (30). En el presente caso, la panela evidencia estas propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y antibacterianas, que en conjunto podrían potenciar los procesos de cicatrización en las lesiones. La Figura 1-3 presenta los principales efectos de los compuestos fitoquímicos y de los extractos herbales en la curación de heridas (31).

Figura 1-3. Efectos principales de extractos herbales y fitocompuestos en la curación de heridas. Tomado y modificado de Safta DA, et al (31).



1.2.2 Caña de azúcar

Como se ha mencionado previamente, la panela se obtiene a partir de la evaporación del jugo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum L.*). La caña de azúcar *Saccharum officinarum L.*, es una gramínea originaria de Nueva Guinea. Su recolección se realiza antes de que la planta florezca, ya que el proceso de floración reduce el contenido de azúcar (32). El cultivo presenta buen desarrollo en altitudes entre los 700 y 2.000 m. s. n. m., a temperaturas entre los 25 y 27 °C, y con precipitaciones entre los 1.500 y 1.750 mm/año, preferiblemente con suelos francos y franco-arcillosos, profundos, bien drenados y con un pH entre los 6,1 y los 7,7 (33).

Las condiciones previamente descritas influyen directamente en la calidad de la panela obtenida, particularmente en propiedades como el color, pH, contenido de azúcares reductores (la glucosa y fructosa) y sacarosa, por lo cual es necesario llevar a cabo un control de la cosecha, de las variedades de caña de azúcar, de las condiciones ambientales pretemporada y del proceso de producción (34), cuyas etapas y aspectos principales se detallan a continuación.

1.2.3 Producción de la panela

La producción mundial de NCS está liderada por India, Colombia y Pakistán. En Colombia la producción y área cultivada de panela ocupa el segundo lugar de importancia después del café, esto implica la generación de empleos directos e indirectos, más de 350.000 campesinos viven de ella y en su mayoría pequeños empresarios y grupos familiares residen en lugares de paz (13,14). Además, su producción va acompañada de un gran valor social, ya que involucra relaciones de mano de obra familiar y vecinal tras la asociación y reunión en las unidades productoras conocidas como trapiches (15).

Para el año 2021, los principales productores de panela en Colombia fueron los departamentos de Antioquia, Cundinamarca, Santander, Nariño, Huila y Valle del Cauca (35). En el área de exportaciones, se encuentra que durante los cuatro años anteriores al 2021, el 39% del total de las exportaciones de panela se dirigía a Estados Unidos y el 34% a España (14). Aún no se encuentran datos disponibles de los procesos de producción y exportación de la panela para el año 2022.

El proceso de producción de la panela se esquematiza en la Figura 1-4, este inicia con el apronte que consiste en la recolección y transporte de la caña a los trapiches; el tiempo de almacenamiento no debe ser superior a tres días para evitar la destrucción del tallo e inversión de la sacarosa.

La caña se muele para extraer los jugos, obteniéndose además un subproducto sólido conocido como bagazo, empleado como combustible para la concentración de los jugos y mieles de caña en las etapas finales del proceso.

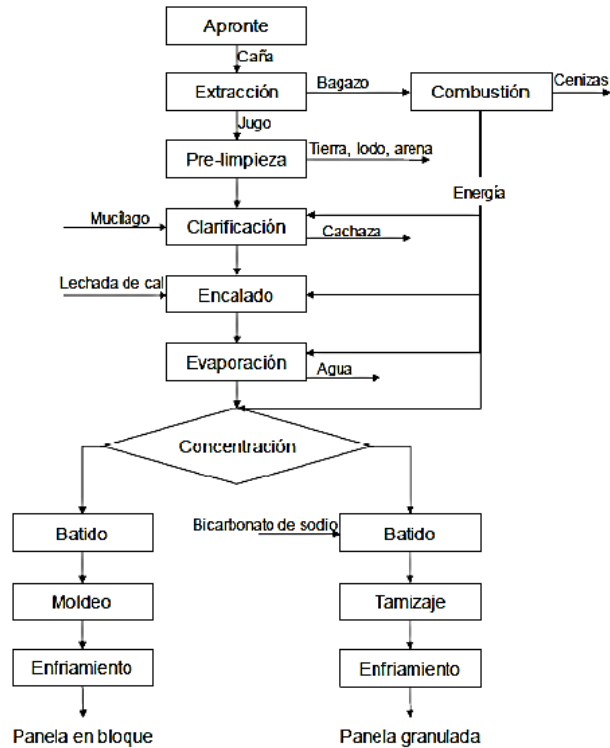
Posteriormente, los jugos de caña obtenidos son sometidos a una etapa de pre-limpieza, con el objetivo de eliminar las impurezas mediante la decantación y precipitación de sólidos como la tierra, barro o arena.

Debido a que los flavonoides y los ácidos orgánicos contribuyen al oscurecimiento del color natural de los jugos de caña, se debe realizar una etapa de clarificación que permita retirarlos a través del calentamiento y de la adición de un material coagulante (mucílago) que elimina los sólidos disueltos y suspendidos del jugo. En la etapa de encalado subsiguiente, se agrega lechada de cal hasta obtener un pH cercano a 5,8, con el cual se evita la generación de azúcares reductores.

Una vez terminada la clarificación y encalado, se realiza la evaporación de los jugos de caña eliminando el agua y aumentando el contenido de sólidos totales de 17°Brix a 70°Brix, punto en el que se obtienen las mieles de caña, a las cuales es recomendable adicionar un agente antiadherente y antiespumante (cera de laurel, aceite de ricino o aceite de coco) para facilitar su homogenización y evitar la quema de la panela.

Finalmente, la evaporación continúa hasta obtener un producto de 90 - 96°Brix, momento en que se genera la panela, la cual requiere un enfriamiento mediante un batido que le permite adquirir la textura ideal para su moldeo tras la cristalización.

Dentro de las principales presentaciones comerciales de la panela están: bloque, pastilla, granulada, y aglomerada (15).

Figura 1-4. Proceso de producción de la panela. Tomado de Alarcón A (15).

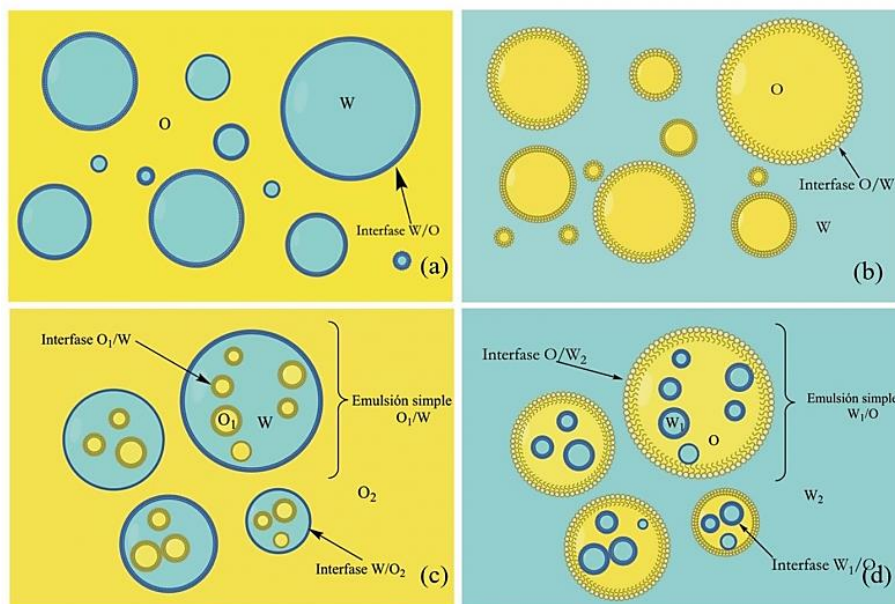
1.3 Cremas

Los productos farmacéuticos aplicados en la piel pueden ser dermatológicos (dentro de la piel), de acción local (región) o transdérmicos (sistémica) (36). Existe un gran número de formas de dosificación disponibles en el mercado, sin embargo, los productos semisólidos son los más utilizados para la aplicación tópica (37), estos normalmente se presentan en forma de cremas, geles, ungüentos o pastas (38).

La selección del tipo de dosificación semisólida depende de varios factores, como el efecto terapéutico deseado, la naturaleza del ingrediente activo incorporado, la disponibilidad del ingrediente activo en el sitio de acción, el tiempo de uso del producto terminado y las condiciones de administración del producto (39). En particular, las cremas se han empleado durante siglos para mejorar las condiciones de curación de las heridas, para tratar enfermedades de la piel y para retardar el proceso de envejecimiento. Las cremas son formas de dosificación semisólidas de consistencia esparcible relativamente suave y de fácil extensión sobre la superficie de la piel (4), que se caracterizan por contener más del 20% entre agua y agentes volátiles, y un porcentaje inferior al 50% de hidrocarburos,

ceras o polietilenglicoles (38,40). Las cremas se clasifican en emulsiones de tipo agua en aceite (w/o), de aceite en agua (o/w) o dobles emulsiones (Figura 1-5).

Figura 1-5. Tipos de cremas (a) Emulsión w/o (b) Emulsión o/w (c) Doble emulsión o/w/o (d) Doble emulsión w/o/w. Tomado y modificado de Freire M, et al (40).



Actualmente, para tratamientos dermatológicos, las emulsiones de tipo o/w son las más empleadas, se aplican directamente sobre la piel y presentan alta afinidad con los exudados de la herida debido a su hidrofiliidad, lo que promueve la liberación de activos (4). Además, proporcionan una sensación calmante de anestesia como resultado de la evaporación de la fase acuosa, e incrementan la penetrabilidad en las membranas celulares a causa de los componentes lipídicos de la fase oleosa, que hidratan y generan emolencia en la piel (5,6).

Es oportuno mencionar que para lograr un tratamiento efectivo en la cicatrización de las heridas, es necesario considerar la naturaleza, propiedades y cantidades de los componentes base de la formulación, toda vez que estos pueden incrementar o disminuir la actividad terapéutica de los ingredientes activos, soportar, impedir su liberación o producir efectos adicionales, por lo tanto, la búsqueda y selección de estos deberá estar relacionada directamente con la fisiología del tejido afectado (5).

En el estado del arte, no se encuentra ningún producto farmacéutico desarrollado a base de panela para la cicatrización de heridas. Los productos más relevantes comprenden una crema cicatrizante de miel con polirricinoleato de poli glicerol (41), un ungüento de azúcar con polietilenglicol 400 y peróxido de hidrógeno (42) o una pasta de yodopovidona con azúcar (43).

Sin embargo, dentro del Grupo de investigación de procesos químicos y bioquímicos de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Colombia se han desarrollado productos cosméticos a base de panela, en forma de exfoliante tipo gel (44), de mascarilla facial emulsionada (45) y de polvo exfoliante (46).

Adicionalmente, una crema de panela como prototipo de producto cosmético con posible actividad antioxidante y de antienvjecimiento se desarrolló en el grupo de investigación de Tecnología de Productos Naturales-TECPRONA de la Facultad de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia.

A continuación, se describen los principales excipientes a considerar para el desarrollo de la emulsión tópica dirigida a la curación de heridas.

1.3.1 Estabilizantes de superficie: tensioactivos

Una emulsión es un sistema disperso constituido principalmente por dos líquidos inmiscibles (36) y un emulsificante que facilita la formación y estabilización de la emulsión. Los emulsificantes (estabilizantes) pueden ser moléculas simples o iones, tensioactivos, polímeros, polielectrolitos o partículas sólidas (47).

Dentro de los estabilizantes comúnmente utilizados se encuentran los tensioactivos, su estructura química consta de grupos lipofílicos e hidrofílicos que se ubican entre la fase acuosa y oleosa para disminuir el exceso de energía libre interfacial (48). Se ha encontrado que algunos tensioactivos causan reacciones de irritación en la piel debido a la estructura anfifílica y propiedades fisicoquímicas, lo cual genera cambios bioquímicos en el cuerpo ya sea por la unión a proteínas de superficie de la piel, solubilización o desorganización de lípidos intercelulares, desnaturalización de proteínas, penetración a través de la barrera lipídica epidérmica o interacción con las células vivas (49)(50).

La presencia de cargas iónicas en los tensioactivos catiónicos y aniónicos favorece la formación de interacciones electrostáticas fuertes con las proteínas del estrato corneo, generando desnaturalización proteica y posterior inflamación e irritación de la piel. En los tensioactivos no iónicos este efecto es menor, puesto que la unión a proteínas se debe principalmente a enlaces débiles del tipo van der Waals, cuya probabilidad de interacción con los distintos blancos celulares es menor (51)(52). Dentro de los tensioactivos no iónicos se encuentran principalmente compuestos derivados de ésteres de sorbitano conocidos comercialmente como Span, polisorbatos o polioxietilen ésteres de sorbitano (Tweens), polioxietilen estearatos (PEG 100 estearato), polioxietilen alquil éteres como el polioxietilen 2 estearil éter (Steareth 2) o polioxietilen 20 cetearil éter (Ceteth 20), esterres de glicerol, entre otros (36).

En el tratamiento tópico de heridas, los emulsificantes no deben ser citotóxicos ni causar reacciones de irritación cuando se aplican sobre las heridas (53), es ideal que promuevan la penetración de los activos a través de la piel, que sean estables químicamente, compatibles con el resto de los ingredientes de la formulación, y que proporcionen un efecto reversible sobre el estrato córneo cuando sean removidos de la piel (54).

En la Tabla 1-1 se describen diferentes activos y sistemas emulsificantes comúnmente utilizados en cremas cicatrizantes:

Tabla 1-1. Sistemas emulsificantes en cremas cicatrizantes

Autor	Componente activo	Emulsificante	Tipo de Emulsificante
Suthasinee Sriroda, et al. (55)	Extracto de <i>Curcuma Mangga</i>	Cremophor A6 y A25 Gliceril Monoestearato	No iónico
N. S. Jagtap, et al. (56)	Extracto de <i>Centella asiática</i> y <i>Curcuma longa</i>	Polisorbato 60	No iónico
V. O. Tarasenko, et al. (5)	Ofloxacina, nimesulida	Tween 80, Polioxietileno 400	No iónico, Polímero
Jamshiya Shamsu. (57)	Extracto de <i>zadirachta indica</i> , <i>Samadera indica</i> , <i>Curcuma longa</i> , <i>Glycyrrhizagalbraith</i> y <i>Aloe vera</i>	Tween 80	No iónico
Steinbrenner, I., et al.	Extracto seco de corteza de abedul	Hidroxipropilmetilcelulosa	Polimérico

(58)			
Namjoyan, F., et al (59)	Extracto etanolico de <i>C. lechleri</i>	Span 20, Tween 80	No iónico
Baie, S. H., et al (60)	Extracto de <i>Channa striatus</i>	Span 80, Tween 80 Gliceril monoestearato	No iónico
Kuhlmann, et al. (61)	Péptidos Pep19-2.5 y Pep19-4LF	Glicerilmonoestearato PEG-20 Gliceril Estearato	No iónico
Farzana Sadaf, et al. (62)	Extracto de <i>Sphaeranthus indicus</i>	Cetomacrogol Alcohol cetoestearilico	No iónico
Beaulieu Andre (63)	Fibronectina	Ceteth-20 Alcohol cetoestearilico	No iónico
Akman enes emre (64)	Extracto de calabaza amarga	PEG100 estearato Glicerilmonoestearato Trietanolamina Ácido Esteárico	No iónico Iónico Iónico
Sulur Subramaniam Vanangamudi, et al (65)	Sulfadiazina de plata	Cetomacrogol (polioxietilen 20 cetearil eter) Alcohol cetoestearilico	No iónico
Farber Elliott (66)	Alantoína	PEG-100 estearato Gliceril estearato	No iónico
Thomas J. Hall, et al (41)	Miel	Polirricinoleato de poliglicerol	No iónico

1.3.2 Emolientes y oclusivos

La barrera epidérmica consta de células del estrato córneo, proteínas y lípidos intercelulares como ceramidas, ácidos grasos libres y colesterol.

En una lesión dérmica existe una alteración de la barrera epidérmica tras la generación de cambios intercelulares o alteraciones en la diferenciación de las células de la epidermis (67), de manera que con la adición de determinados excipientes en la fase oleosa se intenta imitar a los lípidos intercelulares que sintetizan los queratinocitos durante la diferenciación epidérmica para recuperar su función (68); dichos excipientes presentan características emolientes y oclusivas.

Los emolientes generalmente son ácidos grasos de cadena larga (ácido esteárico, linoleico, oleico, láurico) y alcoholes grasos que se encuentran naturalmente en la grasa de lana, aceite de coco y aceite de palma, estos influyen positivamente en la fisiología y

patología de la piel produciendo eicosanoides, aumentando la fluidez de membrana, mejorando la reparación y la permeabilidad de la piel, los cuales usualmente se combinan con agentes emulsificantes.

Las sustancias oclusivas crean una barrera hidrofóbica y contribuyen a la formación de la matriz intercelular del estrato córneo, dado que se ubican entre los lípidos celulares (67)(68). Adicionalmente, previenen la deshidratación de la herida reteniendo un ambiente húmedo y protegen físicamente la lesión del polvo y de los microorganismos para la restauración de la piel. Una de las fuentes principales de materiales oclusivos es el petróleo, este proporciona sustancias como el aceite mineral, hidrocarburos y vaselina, no obstante, también se suelen emplear ceras, ester de ceras y lanolina.

1.3.3 Humectantes

Una barrera cutánea intacta es fundamental para evitar la desecación por pérdida excesiva de agua y también para prevenir la penetración de sustancias exógenas perjudiciales en el cuerpo. Esta barrera está controlada principalmente por la capa más externa de la epidermis, el estrato córneo, que está compuesto por corneocitos rodeados por diferentes lípidos laminares (69). En una lesión, clínicamente se recomienda aplicar algún tratamiento que facilite la hidratación (70) y emoliencia de la piel, dado que puede existir una pérdida de las glándulas sudoríparas y sebáceas del tejido.

Los agentes humectantes pueden aumentar la hidratación del estrato córneo, ya sea por reducción de la pérdida de agua mediante la oclusión de la superficie de la piel con sustancias hidrofóbicas (aceites minerales, vaselina, parafina, silicona); o por medio de la hidratación del estrato córneo con humectantes como el propilenglicol, glicerol o pantenol (polialcoholes).

Los polialcoholes, tales como la glicerina o el propilenglicol, aumentan la capacidad de retención de agua en el estrato córneo durante la restauración de la barrera cutánea (69), puesto que forman puentes de hidrogeno con los grupos hidroxilo del agua, disminuyendo en paralelo, la pérdida de agua de la formulación por posible evaporación (6).

1.4 Modelos animales para el estudio de cicatrización

Los modelos animales han proporcionado información valiosa sobre los principios del manejo de heridas y cicatrización, la mayoría de los estudios se realizan en roedores y cerdos, sin embargo, su selección debe considerar varios factores como el costo, disponibilidad, facilidad de manejo, familiaridad del investigador y similitud con los humanos.

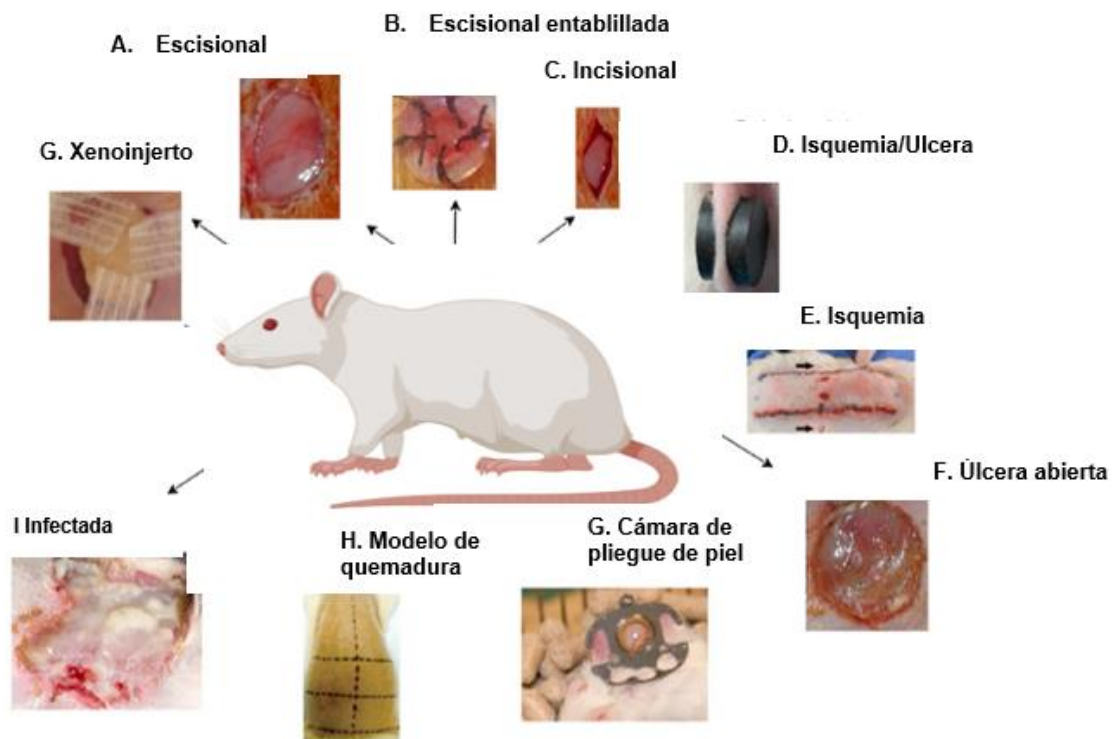
Existen modelos animales para la curación de heridas agudas o crónicas, los modelos de curación aguda son útiles para estudiar los procesos naturales de cicatrización y para el descubrimiento de fármacos, estos normalmente incluyen modelos de escisión, incisión y quemaduras. Los modelos animales para curación crónica se pueden obtener a partir de una herida aguda induciendo en los animales, enfermedades como diabetes, isquemia o lesión por perfusión; las heridas crónicas son poco frecuentes en animales y, por lo tanto, la mayoría de los modelos presentan limitaciones (71).

1.4.1 Modelos de cicatrización heridas agudas

- **Modelo de herida por escisión:** Son el tipo más común de modelo de herida para estudiar el proceso de cicatrización. Consisten en remociones o extirpaciones de un tejido de área aproximada a dos centímetros cuadrados en la región torácica dorsal para roedores y cerdos, y en la región ventral de las orejas para conejos. Estas pueden ser de espesor parcial o total, existiendo variaciones en la metodología sobre el tamaño y herramientas utilizadas para generar la herida (72). Además, se puede acceder fácilmente al lecho de la herida para aplicar agentes tópicos. Las heridas recolectadas se pueden examinar histológicamente para evaluar la brecha epitelial y las características de la matriz de granulación (poblaciones de células reclutadas, vascularización, alteraciones) (73).
- **Modelo de herida por incisión:** Son heridas realizadas por medio de un corte longitudinal de aproximadamente seis centímetros, el cual pasa por las diferentes capas de la piel (74). Es el segundo modelo de herida más utilizado, empleado principalmente para estudiar las cicatrices de la herida, para análisis biomecánicos de la fuerza de tensión, histopatológicos e inmunohistológicos (18).

En la Figura 1-6 se identifican otros tipos de heridas usualmente realizadas en el estudio de los procesos de cicatrización.

Figura 1-6. Tipos de heridas hechas en roedores para el estudio de procesos de cicatrización. Tomado y modificado de Sami A, et al (75).



1.4.2 Roedores

Los ratones y ratas a menudo se usan como primera opción debido al amplio conocimiento científico de su fisiología, por su pequeño tamaño, capacidad de manipulación genética, dietética y ambiental, bajo costo, disponibilidad y periodo de gestación (19 y 22 días)(74). Los ratones son fáciles de alojar y mantener. Además, se han generado diversas mutaciones y herramientas transgénicas innovadoras para estudiar la fisiopatología de diferentes enfermedades de la piel (73).

El proceso de cicatrización entre los roedores y los humanos difiere en algunos aspectos, ya que la curación de heridas en los roedores se da principalmente por contracción, mientras que en los humanos prevalecen los procesos de re-epitelización. Igualmente, se

encuentra que anatómicamente el grosor de las capas de la piel es distinto, puesto que los roedores tienen la epidermis delgada, un cabello denso y ausencia de glándulas apocrinas y ecrinas. Además, los roedores se caracterizan por presentar una fuente endógena de vitamina C, que es crucial en todas las fases de curación, así como un panículo subcutáneo musculoso carnoso que promueve la contracción rápida de la herida (75).

A pesar de estas diferencias, los roedores se han estudiado ampliamente en el proceso de cicatrización de heridas, su contribución en la comprensión de la biología y enfermedades de la piel ha sido muy significativa, especialmente cuando se prueban medicamentos nuevos antes de la realización de ensayos clínicos en humanos (74)(75). Por todas las razones expuestas previamente, estos se emplearán como modelo animal para el estudio de la actividad cicatrizante de la crema tópica desarrollada.

En la Tabla 1-2 se describen las principales diferencias entre ratones y humanos en el proceso de cicatrización.

Tabla 1-2. Principales diferencias entre ratones y humanos en la cicatrización de heridas (73)

	Ratón	Humano
Ciclo del pelo	Aproximadamente 3 semanas.	Altamente variable, dependiente de la región.
Arquitectura epitelial	Sin crestas reticulares.	Crestas reticulares presentes.
Glándulas sudoríparas apocrinas	No presente en la piel, extenso en glándulas mamarias.	Presente en las regiones de la piel axilar, inguinal y perianal.
Propiedades biomecánicas	Delgado, flexible, suelto.	Grueso, relativamente rígido, adherente a los tejidos subyacentes.
Espesor hipodérmico	Dependiente del ciclo del cabello.	Menos variable.
Capa muscular subcutánea	Presente en todo como panículo carnoso.	Presente solo en la región del cuello como platisma.
Principal método de cicatrización de heridas	Contracción.	Formación de tejido de granulación y re-epitelización.

Objetivos

Objetivo general

Contribuir al desarrollo a escala laboratorio, de una formulación de crema tópica a partir de panela con posible actividad cicatrizante.

Objetivos específicos

- Seleccionar la composición cualicuantitativa y condiciones del proceso definitivos mediante la evaluación de algunas propiedades fisicoquímicas y de estabilidad, aplicando un diseño estadístico experimental.
- Evaluar la posible actividad cicatrizante de la crema de administración tópica a base de panela, en modelos *in vivo* de herida por escisión en piel de rata.

2. Formulación de la crema tópica

En este capítulo se presentan los resultados de las etapas de preformulación y formulación de la crema tópica a base de panela. En los estudios de preformulación, se caracterizaron algunas propiedades fisicoquímicas de la panela (humedad, pH, perfil de azúcares) y se determinó la cantidad de panela que se agregaría en la composición mediante la realización de un ensayo microbiológico de sensibilidad bacteriana.

En los estudios de formulación, se seleccionaron los componentes básicos de la crema tópica tras la realización de ensayos preliminares enfocados en evaluar características como la viscosidad, pH, tamaño de gota ($D_{4,3}$), span y estabilidad física. Posteriormente, mediante un diseño estadístico experimental exploratorio de bloques confundido se determinaron los factores de la composición y del proceso de elaboración que tenían un efecto significativo en las variables respuesta: viscosidad, pH, tamaño de gota ($D_{4,3}$) y span, con el objetivo de establecer mediante dichos factores y de las variables respuesta evaluadas, la composición cualicuantitativa y condiciones operacionales definitivas de la crema a través de un diseño estadístico de optimización 2^3 con dos repeticiones y cuatro puntos centrales. A todas las formulaciones desarrolladas se le evaluó su estabilidad física tras someterlas a ciclos de choque térmico entre 40°C y 4°C por seis días.

La formulación óptima derivada de los diseños estadísticos implementados sería caracterizada por su reología, extensibilidad, adherencia y por su estabilidad física a corto y mediano plazo.

2.1 Materiales

Panela pulverizada (Doña panela, Lotes: 071010 y 120522, Colombia), sacarosa (Grado HPLC, Sigma Aldrich, Lote BCBR5505V, EEUU), fructosa (Grado HPLC, Sigma Aldrich, Lote BCCC2792, EEUU), glucosa (Grado HPLC, Sigma Aldrich, Lote BCBQ9800V, EEUU),

agar Mueller Hinton (Scharlau®, Lote 106207, España), aceite mineral blanco (Ciacomeq S.A.S, Lote S385, Colombia), alcohol cetílico (Proquímicas JG, Lote 141115, Colombia), alcohol estearílico (Proquímicas JG, Lote 896584, Colombia), propilenglicol (Grado USP, ICN Biomedicals, Inc, Lote 3041B, EEUU), metilparabeno sódico (Disproalquímicos S.A., Lote 20120415, Colombia), propilparabeno sódico (Ciacomeq S.A.S, Lote 20200520, Colombia), Lipocol S-2 (Vantage, Lote 458930, EEUU), Lipocol S-21 (Vantage, Lote 382290, EEUU), Lipopeg 100-S (Vantage, Lote 378468, EEUU), Liposorb™ S (Vantage, Lote 16222052020, Lote L78ZB3, EEUU), Span 80, Tween 80, LipoPEG 4-S (Vantage, Lote 413169, EEUU).

2.2 Equipos

DV-E Viscometer, Modelo RVDVE, Brookfield Engineering, EEUU; pH metro Orion 3 Star, Thermo Scientific, EEUU; Microscopio óptico, Nikon Eclipse E200LED 626340, Nikon Corporation, China; Ultraturax T18 digital, IKA, Alemania; balanza analítica PA3102 y PA214, OHAUS, EEUU; lector de absorbancia de microplacas de 96 pozos iMark™ Biorad®, EEUU; plancha de calentamiento C-MAG HS7, IKA, EEUU; plancha de agitación multipunto, RT 15, IKA, EEUU; estufa universal, Memmert, Edelstah Rost Frei, Alemania; cromatógrafo Thermo Dionex Ultimate 3000 (*Sunnyvale, CA*) equipado con detector de índice de refracción (IR); reometro C-VOR, Bohlin Instruments, UK.

2.3 Métodos

2.3.1 Caracterización fisicoquímica de la panela

Se utilizaron muestras de panela pulverizada marca Doña Panela. Las propiedades fisicoquímicas evaluadas fueron el contenido de humedad, el pH de la solución y el perfil de azúcares.

- **Contenido de humedad:**

El contenido de humedad se midió por método gravimétrico, siguiendo la norma AOAC 925.45. En una caja de Petri se agregaron 5 g de la muestra de panela, posteriormente la muestra se llevó al horno a temperatura de 110°C durante aproximadamente tres horas, se retiró del horno, se enfrió en un desecador durante 40 minutos y se pesó. La diferencia

de peso se registró como pérdida de agua y se expresó como porcentaje humedad, de acuerdo con la ecuación 2-1. Las muestras se analizaron por triplicado.

$$\%Humedad = \frac{\text{Peso muestra húmeda (g)} - \text{peso muestra seca (g)}}{\text{Peso muestra húmeda (g)}} * 100 \quad \text{Ecuación 2-1}$$

- **pH:**

El pH de las muestras se determinó siguiendo la norma AOC 981.12. Se diluyó 1 g de panela en 10 ml de agua previamente aclimatada a 20°C, posteriormente se midió el pH de la muestra en el pH metro Orion 3 Star. La determinación del pH se realizó por triplicado y se reportó como unidades de pH.

- **Perfil de azúcares**

El perfil de azúcares de la panela se determinó por cromatografía líquida de alta eficiencia -HPLC, mediante una metodología analítica que fue validada en este estudio.

Para esto, se tomaron 0,550 g de panela y se disolvieron en 25 ml de agua destilada. Posteriormente la muestra se filtró a través de una membrana de 0,45 µm de poro. La cuantificación de azúcares se realizó teniendo en cuenta las curvas de linealidad obtenidas en la validación de la metodología analítica. La determinación del contenido de azúcares se realizó por triplicado y se reportó como porcentaje de azúcar en la muestra.

Validación de la metodología analítica para cuantificación de azúcares

El método analítico fue validado según las directrices de la *ICH Q2R* evaluando las características de desempeño: selectividad, linealidad, exactitud, precisión, límite de detección y límite de cuantificación.

Se empleó el procedimiento de adición de estándar sobre la panela para la elaboración de las curvas de calibración del método, dado que no fue posible obtener una matriz de la panela sin los analitos (sacarosa, glucosa y fructosa).

Se utilizó un cromatógrafo Thermo Dionex Ultimate 3000 (*Sunnyvale, CA*) equipado con un detector de índice de refracción (IR) y una columna WaterSugar Pak 300 (300 mm x 7,8 mm, 9 µm). La fase móvil fue agua desionizada, la velocidad de flujo se mantuvo constante a 0,5 ml/min, el volumen de inyección fue de 20 µl, se manejó una temperatura isocrática de 80°C y un tiempo de análisis de 15 minutos.

La descripción y resultados de la validación analítica se presentan en el Anexo A.

2.3.2 Determinación de la concentración de panela a emplear en la crema tópica

La realización de un ensayo antibacteriano se utilizó como primera aproximación para establecer la concentración de panela a emplear en la crema tópica. Para ello, se emplearon las cepas: *Pseudomona aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Escherichia coli* ATCC 8739.

▪ Preparación del inóculo

El inóculo de cada cepa fue preparado por suspensión directa en caldo Mueller Hilton ajustando la densidad óptica a 0,5 McFarland (1×10^8 UFC/ml). La medición espectrofotométrica a 590 nm debía estar entre los rangos especificados de la Tabla 2-1 en cada cepa, los cuales fueron establecidos y estandarizados previamente en el grupo de investigación (76).

Tabla 2-1. Relación medida densidad óptica con las UFC para cada uno de los microorganismos evaluados

Microorganismo	Absorbancia	UFC
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	0,060-0,065	$0,8 - 1,1 \times 10^8$
<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 9027	0,053- 0,057	$0,6 - 0,9 \times 10^8$
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	0,048-0,052	$0,8 - 1,1 \times 10^8$

Dentro de los 15 minutos de preparación, el inóculo se diluyó hasta obtener una concentración de 5×10^5 UFC/ml en cada pozo de la placa.

▪ Preparación de la solución de panela

Se realizaron diluciones seriadas en los pozos (por triplicado), partiendo de tres concentraciones iniciales de panela (SMP): 60, 64,3 y 70,6g de panela/ 100g de solución.

Las concentraciones obtenidas en los pozos de la placa por cada concentración inicial de panela (SMP) fueron:

SMP 60g panela/ 100g solución: 30, 15, 7,5 g panela/100 g solución.

SMP 64,3g panela/100g solución: 32,1,16,1, 8,0 g panela/100g solución.

SMP 70,6g panela/100g solución: 35,3, 17,6, 8,8 g panela/100g solución.

- **Incubación**

La incubación se realizó a 37°C durante 16-20 horas. En cada placa incubada se incluyó un control de crecimiento del inóculo (5×10^5 UFC/ml) y un control de esterilidad del medio (caldo Mueller Hinton).

- **Siembra en placa**

Luego de la incubación, se realizaron diluciones en serie 1:10 de todas las concentraciones de panela con *Pseudomona aeruginosa* (cuatro diluciones), *Staphylococcus aureus* (seis diluciones) y *Escherichia coli* (seis diluciones). De la última dilución, se tomó 0,1 ml de la dispersión, se sembró en agar Mueller Hilton y se incubó a 37°C durante 16 a 20 horas. Transcurrido este tiempo se realizó el conteo de las colonias por placa.

2.3.3 Planteamiento de la formulación

Los componentes de la formulación y su cantidad fueron establecidos con base en la revisión bibliográfica de los excipientes comúnmente empleados en cremas cicatrizantes. En la Tabla 2-2, se describe la funcionalidad de cada componente seleccionado en las diferentes emulsiones desarrolladas a lo largo del estudio.

Tabla 2-2. Composición cualitativa de las formulaciones cicatrizantes de panela desarrolladas.

Materia Prima	Funcionalidad
Aceite mineral	Emoliente
Alcohol cetílico	Emoliente y coemulsificante
Alcohol estearílico	
Estearato de sorbitano y PEG100 estearato	Emulsificantes
PEG8 estearato	
Tween 80 (Monooleato polioxietilen (20) sorbitano) y Span 80 (Monooleato de sorbitano)	
Steareth 2 y Steareth 21	
Propilenglicol	Agente humectante
Metilparabeno de sodio y propilparabeno de sodio	Agentes preservantes
Panela	Principio activo
Agua destilada	Fase dispersante

2.3.4 Ensayos de formulación

Ensayos preliminares

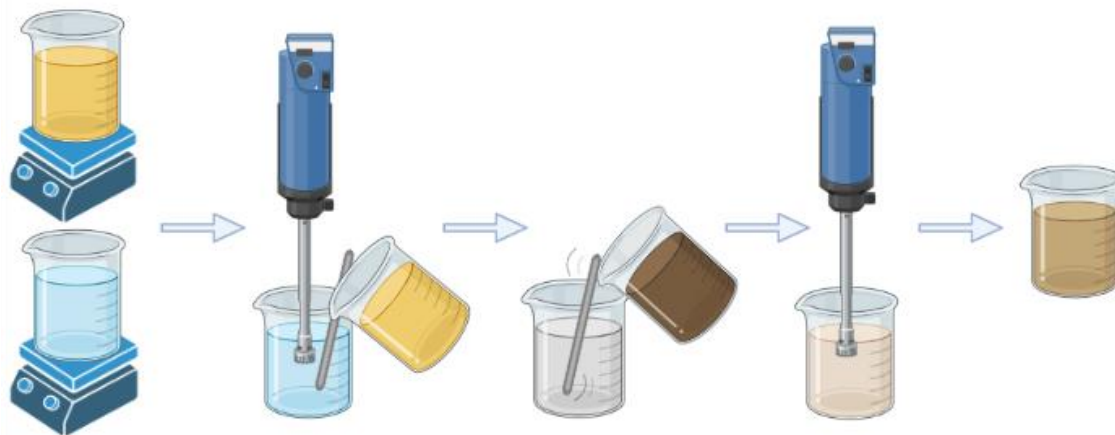
En los ensayos preliminares se evaluó la capacidad emulsificante de cuatro sistemas propuestos (estearato de sorbitano y PEG100 estearato **(F1)**; PEG8 estearato **(F2)**; Steareth 2 y Steareth 21 **(F3)**; Tween 80 y Span 80 **(F4)**), con la finalidad de establecer aquellos que proporcionaran las mejores características fisicoquímicas y de estabilidad en las emulsiones preparadas.

Para ello, cada emulsión fue evaluada en términos de sus propiedades fisicoquímicas como viscosidad, pH, tamaño de gota ($D_{4,3}$) y span; así como por su estabilidad física tras someterse a ciclos de choque térmico entre 40°C y 4°C.

▪ **Proceso de elaboración de las emulsiones**

Los componentes de la fase acuosa (agua y emulsificantes hidrófilos) y la fase oleosa (aceite mineral, alcoholes grasos y emulsificante lipófilo) fueron mezclados y calentados por separado entre 80°C (fase acuosa) y 78°C (fase oleosa) hasta fusión completa de los componentes sólidos. Posteriormente, la fase oleosa se vertió sobre la fase acuosa con agitación constante a 4.000 rpm durante siete minutos en un homogeneizador Ultraturrax®. Una vez la emulsión alcanzó una temperatura de 40°C se adicionó la fase de panela y se homogenizó por tres minutos adicionales a 4.000 rpm (Figura 2-1).

Figura 2-1. Proceso general de elaboración de las emulsiones.



En la Tabla 2-3, se refieren las composiciones cualicuantitativas de las cuatro emulsiones desarrolladas en los ensayos preliminares. Las cantidades de los emulsificantes se establecieron con base en las recomendaciones reportadas por cada fabricante; para el resto de los componentes, las concentraciones a utilizar se seleccionaron de acuerdo con la revisión bibliográfica realizada.

Tabla 2-3. Composiciones desarrolladas para la selección del sistema emulsificante.

Fase	Materia Prima	F1 g/100g	F2 g/100g	F3 g/100g	F4 g/100g
Oleosa	Aceite mineral	10	10	10	10
	Alcohol cetílico	2	2	2	2
	Alcohol estearílico	2	2	2	2
	Estearato de sorbitano	1,04	-	-	-
	Steareth 2	-	-	1,11	-
	Span 80	-	-	-	0,96
Acuosa	Agua	30	30	30	30
	PEG100 estearato	1,96	-	-	-
	PEG8 estearato	-	3	-	-
	Steareth 21	-	-	1,89	-
	Tween 80	-	-	-	2,04
Panela	Panela	35	35	35	35
	Agua	18	18	18	18

▪ Caracterización de las emulsiones

La viscosidad, pH, $D_{4,3}$ y span fueron medidos 24 horas después de la preparación de las emulsiones como se describe a continuación:

-Viscosidad: En un recipiente se adicionaron 100g de emulsión, se sumergió el vástago, se ajustó la velocidad a 50 rpm y se consideraron como significativas aquellas mediciones en donde el torque se encontrará entre el 10% y 70%. La determinación de la viscosidad se realizó por triplicado y se reportó como cP.

-pH: El pH de la muestra se midió en el pH metro Orion 3 Star diluyendo 2g de cada emulsión en 20 ml de agua previamente aclimatada a 20°C. La determinación del pH se realizó por triplicado y se reportó como unidades de pH.

Tamaño de gota: El tamaño de gota se determinó a través de microscopía óptica en un microscopio óptico Nikon Eclipse E200LED. Para ello, se diluyeron 2g de emulsión en 20ml

de agua y se observaron en el objetivo de 100X mediante la adición de aceite de inmersión. Cada imagen fue procesada a través del software Image J®, en el cual se midieron por lo menos 400 gotas para el cálculo del diámetro medio de volumen $D_{4,3}$ y el span.

-El $D_{4,3}$ es el diámetro medio volumétrico de las gotas, el cual es sensible a la presencia de gotículas de gran tamaño (77). Se calcula de acuerdo con la ecuación 2-2, donde d_i es el diámetro de la gotícula medido a través del microscopio.

$$D_{4,3} = \sum \frac{d_i^4}{d_i^3} \quad \text{Ecuación 2-2}$$

-**Span** es una medida del índice de dispersión del tamaño de las gotas de la emulsión. Este se calcula según la ecuación 2-3, en donde el D_{90} , el D_{50} y el D_{10} corresponden a los diámetros por debajo del 90%, 50% y 10% de las gotas (77). Estos se obtuvieron por medio del histograma de la frecuencia acumulada del diámetro de las gotículas, ajustando los datos a las escalas Log Normal, Weibull o Doble Logarítmica, según se describe en (78).

$$Span = \frac{D_{90} - D_{10}}{D_{50}} \quad \text{Ecuación 2-3}$$

▪ Estabilidad física de las emulsiones

Las emulsiones preparadas fueron sometidas a ciclos de choque térmico entre 40°C y 4°C cada 24 horas durante seis días. Al finalizar los ciclos, se evaluaron los cambios físicos relacionados con la apariencia, color y uniformidad de las emulsiones respecto a su aspecto inicial.

Diseños estadísticos experimentales

Para la implementación de los diseños estadísticos experimentales, se seleccionaron como agentes emulsificantes al estearato de sorbitano con PEG100 estearato (**F1**) y al Steareth 2 con Steareth 21 (**F3**).

A continuación, se describen los factores y variables respuesta evaluadas en cada uno de los diseños estadísticos experimentales implementados.

▪ Diseño estadístico experimental exploratorio

Se empleó un diseño estadístico experimental exploratorio de tipo bloques confundido factorial 2^4 (79). En el presente caso, cada bloque representa un tipo de emulsificante a un nivel bajo y a un nivel alto. Se establecieron como factores o variables independientes: el tipo de emulsificante, el porcentaje de emulsificante, el porcentaje de aceite, el porcentaje de alcoholes, la velocidad y el tiempo de homogenización; cada uno de estos a un nivel bajo y a un nivel alto.

En la Tabla 2-4, se presentan las condiciones que se emplearon en los experimentos desarrollados. A cada una de las emulsiones obtenidas, se le determinaron como variables respuesta: la viscosidad, el tamaño de gota $D_{4,3}$, el span y el pH siguiendo la misma metodología descrita en la caracterización de las emulsiones de los ensayos preliminares. Complementariamente se les evaluó la estabilidad física mediante los ciclos de choque térmico descritos. El proceso de elaboración de las emulsiones se realizó de acuerdo con el procedimiento referido en los ensayos previos, modificando los valores de tiempo y velocidad de homogenización según se indica en la Tabla 2-4.

Tabla 2-4. Diseño estadístico experimental exploratorio – Tipo bloques confundido 2^4 .

No	BLOQUE	Tipo de Emulsificante	%Emulsif.	A: %Aceite	B: %Alcoholes	C: *** (1C/SC) (min)	D: **** (rpm)
1	1	ES/PS*	2,5	7,5	1,5	7/3	3000
2	1	ES/PS	2,5	15	2,5	14/6	3000
3	1	ES/PS	2,5	7,5	2,5	7/3	5000
4	1	ES/PS	2,5	15	1,5	14/6	5000
5	2	S2/S21**	2,5	15	1,5	7/3	3000
6	2	S2/S21	2,5	7,5	2,5	14/6	3000
7	2	S2/S21	2,5	15	2,5	7/3	5000
8	2	S2/S21	2,5	7,5	1,5	14/6	5000
9	3	ES/PS	5	15	2,5	7/3	3000
10	3	ES/PS	5	7,5	1,5	14/6	3000
11	3	ES/PS	5	15	1,5	7/3	5000
12	3	ES/PS	5	7,5	2,5	14/6	5000
13	4	S2/S21	5	7,5	2,5	7/3	3000
14	4	S2/S21	5	15	1,5	14/6	3000
15	4	S2/S21	5	7,5	1,5	7/3	5000
16	4	S2/S21	5	15	2,5	14/6	5000

*ES/PS: Estearato de sorbitano con PEG100 estearato **S2/S21: Steareth 2 con Steareth 21 *** C:(1C/SC) (min): Tiempo de homogenización: minutos primer ciclo/ minutos segundo ciclo ****D: Velocidad de homogenización en revoluciones por minuto (rpm).

Los datos fueron procesados mediante el software Design Expert 13.0. De acuerdo con los resultados obtenidos en el diseño experimental exploratorio, se establecieron como variables independientes para el diseño estadístico de optimización: el porcentaje de aceite, el porcentaje de emulsificante y la velocidad de homogenización.

▪ Diseño estadístico experimental – Optimización

Se empleó un diseño estadístico experimental 2^3 con dos repeticiones y cuatro puntos centrales. Los factores o variables independientes fueron el porcentaje de aceite, el porcentaje de emulsificante y la velocidad de homogenización a un nivel bajo, medio y alto.

En cada emulsión preparada, el porcentaje de alcoholes se mantuvo constante en un 2% para cada alcohol, y el tiempo de homogenización se fijó a 20 minutos: 14 minutos en el primer ciclo y seis minutos en el segundo ciclo.

Las emulsiones fueron obtenidas y caracterizadas siguiendo la metodología de preparación de los ensayos preliminares, teniendo como variables respuesta a la viscosidad, el tamaño de gota $D_{4,3}$, el span y el pH. Además, las emulsiones fueron evaluadas por su estabilidad física tras la aplicación de los ciclos de choque térmico de los ensayos previos. Las condiciones de cada emulsión desarrollada se ilustran en la Tabla 2-5. Los datos fueron procesados mediante el software Design Expert 13.0.

Tabla 2-5. Diseño estadístico experimental de optimización -2^3 de dos repeticiones y cuatro puntos centrales.

Ensayo	A: %Aceite	B: %Emulsificante	C: Velocidad de homogenización (rpm)*
1	7,5	2,5	3000
2	11,25	3,75	4000
3	15	5	3000
4	15	2,5	3000
5	11,25	3,75	4000
6	7,5	5	3000
7	15	2,5	5000
8	7,5	2,5	3000
9	7,5	2,5	5000
10	11,25	3,75	4000
11	7,5	5	3000
12	11,25	3,75	4000

13	15	5	3000
14	7,5	5	5000
15	15	2,5	3000
16	7,5	2,5	5000
17	7,5	5	5000
18	15	5	5000
19	15	5	5000
20	15	2,5	5000

*rpm: Velocidad de homogenización en revoluciones por minuto (rpm)

2.3.5 Emulsiones finales de los diseños exploratorio y de optimización

Se prepararon dos emulsiones empleando las condiciones de preparación óptimas derivadas de cada uno de los diseños implementados.

Las emulsiones finales de cada diseño fueron caracterizadas y comparadas en términos de su viscosidad, pH, tamaño de gota $D_{4,3}$, span y estabilidad física, acorde con las metodologías previas de los ensayos preliminares.

2.3.6 Caracterización de la formulación final

De los diseños estadísticos experimentales y de la preparación de las emulsiones finales obtenidas en cada diseño, se seleccionó la emulsión con menor tamaño de gota $D_{4,3}$ y span. Adicional a las características fisicoquímicas ya evaluadas, la formulación final fue caracterizada a través de su extensibilidad, adherencia y perfil reológico, los cuales se detallan a continuación.

-Extensibilidad: 2g de emulsión fueron incluidos en el centro de dos placas de vidrio. Secuencialmente se adicionaron pesos crecientes con un tiempo de reposo de un minuto entre cada peso agregado. Para cada peso incluido, se midió el diámetro alcanzado por la emulsión. Cada determinación se realizó por triplicado (77).

-Adherencia: 2g de emulsión fueron agregados entre dos placas metálicas. Se adicionaron pesos crecientes con un tiempo de reposo de un minuto entre cada peso agregado. Se registró el peso necesario para separar las placas metálicas unidas por la emulsión. Cada determinación se realizó por triplicado (77).

-Propiedades reológicas

La medición del comportamiento reológico de la formulación final se realizó por triplicado en un reómetro (C-VOR, Bohlin Instruments, UK). Para ello, se determinó el esfuerzo cortante y la viscosidad de la emulsión frente a la deformación por medio de ensayos de viscosimetría y oscilación. Las condiciones empleadas fueron geometría de cono y plato, un ángulo de 4°, un diámetro de 40 mm, y un gap de 0.5 mm. Cada muestra se colocó sobre el plato previamente acoplado al vacío ajustando el gap. Las mediciones se llevaron a cabo a una temperatura constante de 25°C, en un rango de velocidad de deformación de entre 0,001/s y 1500/s para la determinación de la viscosidad, y con un barrido de amplitud en un rango de esfuerzo de 0,001 a 1000 y de frecuencia en un rango de 0,01 a 10 Hz para la determinación de la deformación.

2.3.7 Estudio de estabilidad a corto y mediano plazo

Se prepararon tres emulsiones de la formulación final desarrollada, las cuales fueron sometidas a un ensayo de estabilidad de corto y mediano plazo. En la estabilidad a corto plazo, las emulsiones se almacenaron a 40°C durante un mes. En las condiciones de mediano plazo, las emulsiones se sometieron por tres meses a una temperatura de 30°C \pm 2°C y 65% \pm 5% de humedad relativa. En el transcurso del tiempo de estudio, las emulsiones fueron monitoreadas y evaluadas para identificar posibles cambios físicos relacionados con la apariencia, color y uniformidad respecto a su aspecto inicial.

Al finalizar el estudio, las muestras fueron caracterizadas mediante su tamaño de gota $D_{4,3}$ y span, los cuales fueron comparados con los valores obtenidos al inicio del estudio. La cuantificación de los azúcares sacarosa, glucosa y fructosa no se realizó en los estudios de formulación y de estabilidad, ya que el equipo no se encontraba disponible para los análisis.

2.4 Resultados y discusión

2.4.1 Caracterización fisicoquímica de la panela

En la Tabla 2-6, se describen los valores de humedad, pH, y del porcentaje de sacarosa, glucosa y fructosa en las muestras de panela evaluadas.

Tabla 2-6. Propiedades fisicoquímicas en muestras de panela evaluadas.

Características fisicoquímicas panela	
% Humedad ± DS	1,6591 ± 0,1571*
pH ± DS	6,86 ± 0,05*
%Sacarosa ± DS	82,3490 ± 0,1318*
%Glucosa ± DS	3,6767 ± 0,0074*
%Fructosa ± DS	2,4379 ± 0,0142*

*DS: Desviación estándar

De acuerdo con la Norma Técnica Colombiana NTC 1311, la panela granulada debe cumplir con requisitos fisicoquímicos, los cuales incluyen máximo un 5% de humedad, máximo un 93% de azúcares totales (sacarosa) y mínimo un 5% en los azúcares reductores glucosa y fructosa, el pH no tiene ningún requerimiento según la normatividad colombiana (79).

Teniendo en cuenta las consideraciones previas, las muestras de panela presentan los estándares requeridos, y además dichos resultados son cercanos a lo reportado en estudios previos, en donde el contenido de humedad en muestras de panela granulada es de un 2,74% ± 0,11% (80), el pH es de 5,58 a 6,9 (81), y el contenido de azúcares es del 91,9%, ≥ 2,9% y 1,6% para la sacarosa, glucosa y fructosa respectivamente (80).

El rango de valores de cada componente presumiblemente refleja diferencias entre las variedades de caña de azúcar, condiciones agronómicas, procesamiento, temperatura y tiempo (28). La relación del genotipo, rendimiento y calidad del azúcar de caña ha llevado a la creación de colecciones de cultivos de caña de azúcar para su producción por parte de institutos de investigación agrícola en países como Colombia y Venezuela, sin embargo, dichas variedades generalmente han sido evaluadas solo para el estudio del rendimiento y de parámetros agroecológicos (82), por lo anterior, es recomendable estandarizar y adaptar la tecnología básica de los procesos de elaboración de la panela con el objeto de

garantizar que las propiedades fisicoquímicas se encuentren dentro de un rango específico que cumpla con los requerimientos exigidos, y que además permita llevar a cabo su trazabilidad (81).

2.4.2 Determinación de la concentración de panela a emplear en la crema tópica

Un proceso de reparación inadecuado en la piel puede causar daños severos, tales como pérdida del tejido, inicio de una infección, daños en las capas de la piel subyacentes e incluso alteraciones a nivel sistémico. El impedimento más común e inevitable para la cicatrización de heridas, es la aparición de una infección. Aunque las bacterias se localizan de una forma normal en la microflora de la piel intacta y las heridas, su crecimiento por encima de determinado umbral puede generar infecciones bacterianas y fúngicas con altos índices de mortalidad y morbilidad colectivos, más aún en un entorno no estéril como la herida (83).

Tan pronto como la piel se daña, microorganismos típicos de la flora normal de la piel, bacterias y hongos exógenos pueden acceder a los tejidos subyacentes que proporcionan un ambiente húmedo, cálido y rico en nutrientes propicio para la proliferación y colonización microbiana. En las fases iniciales, los microorganismos Grampositivos son los que más aparecen, en su mayoría el *Staphylococcus aureus*. En las fases avanzadas, las especies Gramnegativas, por ejemplo, *Escherichia coli* y *Pseudomona ssp* están presentes en mayor proporción y es probable que entren en las capas más profundas de la piel afectando significativamente los tejidos y retrasando el cierre de la herida como consecuencia de un estadio inflamatorio agravado y prolongado ocasionado por el desarrollo ilimitado de microorganismos (83).

Como se ha mencionado previamente, empíricamente la panela se ha utilizado para el tratamiento de heridas infectadas, si bien su modo de acción es complejo e imposible de reducir a un solo mecanismo, en el presente estudio se realizó un ensayo de sensibilidad bacteriana como primera aproximación de la cantidad de panela a adicionar en la crema tópica a desarrollar. La panela proporciona un efecto osmótico en el lugar de la lesión debido a la alta proporción de azúcares en su composición, con el cual se disminuye el crecimiento bacteriano (10). Las cepas bacterianas utilizadas en el ensayo fueron:

Staphylococcus aureus ATCC 6538, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 9027 y *Escherichia coli* ATCC 8739, dado que se han identificado como los microorganismos de mayor prevalencia en las heridas infectadas (83–85).

En la Tabla 2-7 se evidencian las Unidades Formadoras de Colonia (UFC/ml) obtenidas del inóculo de cada cepa tras la adición de concentraciones crecientes de panela. Según se observa, las bacterias *Staphylococcus Aureus* y *Escherichia coli* disminuyeron su crecimiento dos unidades logarítmicas en las concentraciones de 30g y 35,3g de panela/100g de solución, con relación a sus controles de crecimiento respectivamente. Para el caso de la *Pseudomona aeruginosa*, la concentración de panela más efectiva en reducir el crecimiento bacteriano fue la de 35,3g de panela/100g de solución, ya que en el control de crecimiento y en las concentraciones de panela inferiores a 32,1g/100g solución, las UFC crecieron de forma indeterminada para poder realizar el conteo.

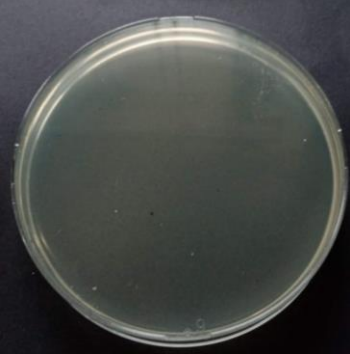
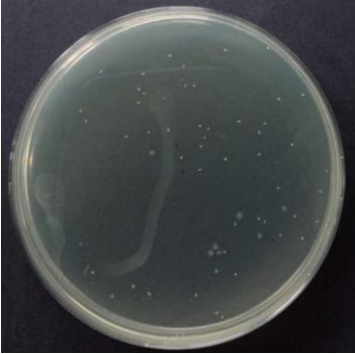
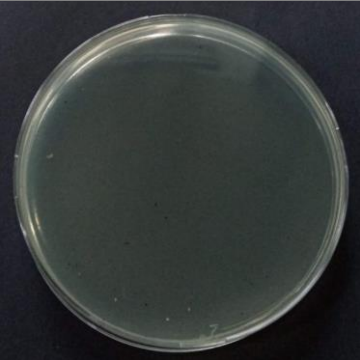

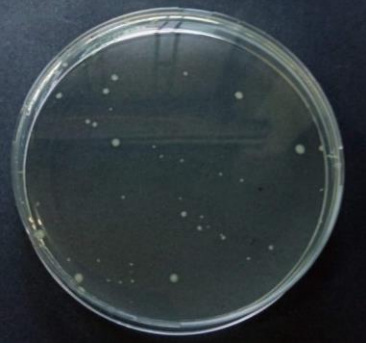

Tabla 2-7. Unidades formadoras de colonia en cada concentración de panela evaluada respecto a su control.

Concentración (g panela/100g solución)	<i>Staphylococcus Aureus</i> (UFC*/ml)	<i>Escherichia coli</i> (UFC*/ml)	<i>Pseudomona aeruginosa</i> (UFC*/ml)
7,5	4,2 x 10 ⁸	5,9 x 10 ⁸	NC*
8,0	3,5 x 10 ⁸	4,2 x 10 ⁸	NC
8,8	4,6 x 10 ⁸	3,2 x 10 ⁸	NC
15,0	6,5 x 10 ⁸	7,1 x 10 ⁸	NC
16,1	4,3 x 10 ⁸	6,8 x 10 ⁸	NC
17,6	6,6 x 10 ⁸	6,1 x 10 ⁸	NC
30,0	3 x 10 ⁶	4,6 x 10 ⁸	NC
32,1	7 x 10 ⁶	1,8 x 10 ⁸	5,4 x 10 ⁶
35,3	9 x 10 ⁶	3 x 10 ⁷	4,4 x 10 ⁶
Control de Crecimiento	7,5 x 10⁸	1 x 10⁹	NC

*UFC: Unidades formadoras de colonias; NC: No contables.

Aunque en las concentraciones evaluadas no se evidencia una concentración mínima inhibitoria que reduzca completamente el crecimiento bacteriano, sí es posible identificar una disminución del crecimiento en al menos 100 UFC en la concentración de panela de 35,3g/100g de solución, como se ilustra en las Tablas 2-7 y 2-8.

Tabla 2-8. Placas de agar de las concentraciones de panela evaluadas respecto a su control.

Microorganismo	Solución panela	Control de crecimiento
<i>Staphylococcus Aureus</i>		
	30g panela/ 100g solución	
<i>Escherichia coli</i>		
	35,3g panela/ 100g solución	
<i>Pseudomona aeruginosa</i>		
	35,3g panela/ 100g solución	

De acuerdo con lo anterior, sería recomendable ampliar el rango de concentraciones por encima de la última concentración aplicada, para así determinar la concentración mínima inhibitoria de panela en las tres cepas bacterianas. Sin embargo, debido a que en la placa multipozos la concentración más alta de panela preparada (70,6g de panela/100g de

solución) se reduce a la mitad (35,3g de panela/100g) por la adición del inóculo, se decidió considerar la concentración de 70,6g de panela/100g como la solución madre más alta para la elaboración de las microdiluciones, puesto que la solubilidad de panela a dicha concentración ya se encuentra en el límite de saturación (2,4 g panela/1g agua equivalente a 70,5g de panela/100 g solución) (86). Además, es importante considerar que la forma farmacéutica es una emulsión del tipo o/w que contiene adicional a la panela, más del 20% entre agua y agentes volátiles, así como un porcentaje aproximado al 20% de hidrocarburos, ceras o polietilenglicoles (38,40), en este sentido, un aumento en la cantidad de panela representaría la disminución de alguno de estos componentes en la formulación.

Los resultados obtenidos evidencian que cuando las condiciones de soluciones acuosas de microorganismos se concentran por adición de un soluto, tal como el azúcar, el crecimiento microbiano resulta principalmente afectado por cambios en la actividad de agua, la cual es indispensable para su desarrollo. Existen diferentes relaciones entre la actividad de agua (a_w) y la capacidad de los microorganismos para crecer, cada microorganismo tiene un requerimiento de actividad de agua debajo del cual no puede desarrollarse. En particular, el *Staphylococcus aureus* requiere de mínimo un a_w de 0,864 equivalente a 185,7g de azúcar/100g de agua (65g azúcar/100g de solución) para su proliferación, por su parte, la *Escherichia coli* y *Pseudomonas spp* precisan de al menos un a_w de 0,95 correspondiente a 78,6g de azúcar/100g de agua (44g azúcar/100g de solución) (87). Esto es concordante con los resultados obtenidos, ya que la máxima concentración de panela probada fue la de 35,3 g de panela/100g de solución, en donde la actividad de agua (a_w) aún se encontraba por encima de la requerida para evitar la proliferación (a_w de 0,864 y 0,95 equivalentes a 65g y 44g azúcar/100g solución) en las cepas evaluadas. Sin embargo, dicha concentración sí genera un estrés bacteriano que reduce en al menos dos unidades logarítmicas (100 UFC) el crecimiento bacteriano respecto al control, por lo tanto, en las etapas de formulación de la crema tópica se decidió seleccionar una cantidad fija de 35g de panela por 100g de la composición para la realización de los ensayos posteriores de la investigación como se detallará más adelante.

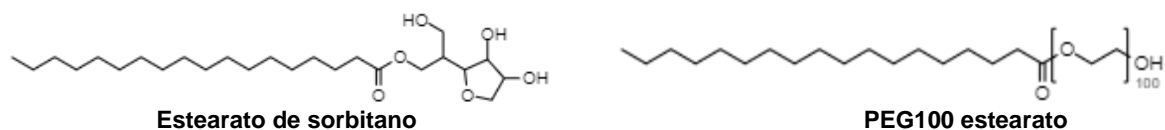
2.4.3 Ensayos preliminares

El objetivo principal de los ensayos preliminares fue evaluar la compatibilidad de los diferentes componentes de la formulación, y establecer con qué emulsificantes se obtenían las emulsiones con mejores propiedades fisicoquímicas, y de estabilidad física. Dichos

emulsificantes serían empleados para la realización de los diseños estadísticos experimentales exploratorio y de optimización de las etapas subsiguientes.

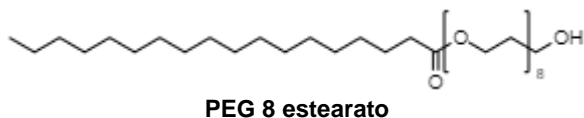
En la emulsión 1 (F1), el sistema emulsificante estaba compuesto por el estearato de sorbitano y el PEG100 estearato. Sus estructuras químicas se ilustran en la Figura 2-2.

Figura 2-2. Estructura química del estearato de sorbitano y PEG 100 estearato. Tomada y modificada de Rowe R, et al (88).



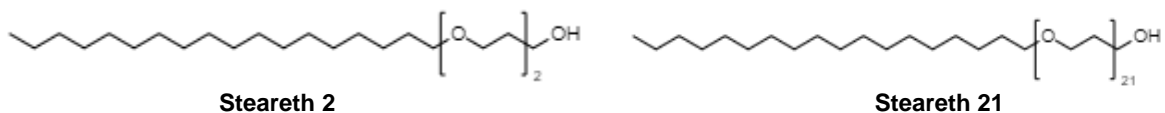
En la emulsión 2 (F2), se utilizó al PEG8 estearato como único emulsificante, cuya estructura se precisa en la Figura 2-3.

Figura 2-3. Estructura química PEG 8 estearato. Tomada y modificada de Rowe R, et al (88).



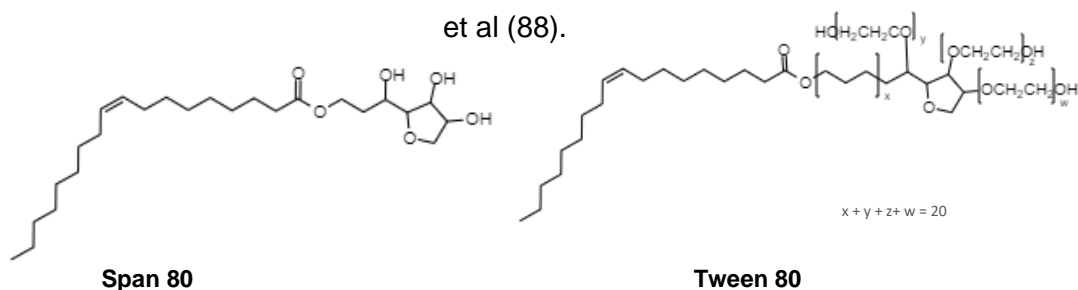
En la emulsión 3 (F3) se emplearon como emulsificantes polioxietilen alquiléteres, tales como el polioxi 2 estearil éter (Steareth 2) y el polioxi 21 estearil éter (Steareth 21). Las fórmulas de estos compuestos se indican en la Figura 2-4.

Figura 2-4. Estructura química Steareth 2 y Steareth 21. Tomada y modificada de Rowe R, et al (88).



Finalmente, en la emulsión 4 (F4) los emulsificantes fueron el monoleato de sorbitano (Span 80) y el polioxietileno 20 sorbitano monoleato (Tween 80) (Figura 2-5).

Figura 2-5. Estructura química Span 80 y Tween 80. Tomada y modificada de Rowe R, et al (88).



De acuerdo con las pruebas realizadas, en ninguna de las emulsiones preliminares se evidenció algún tipo de incompatibilidad entre los diferentes componentes de la formulación. Las principales diferencias radicaron en propiedades como la viscosidad y el tamaño de gota, así como en la estabilidad física tras someterlas a los ciclos de choque térmico.

▪ Características fisicoquímicas

En la Tabla 2-9 se precisan los valores de viscosidad, pH, tamaño de gota $D_{4,3}$ y span de las cuatro emulsiones preparadas en los ensayos preliminares.

Tabla 2-9. Características fisicoquímicas de las emulsiones preliminares.

Emulsión	Viscosidad \pm DS* (cps)	pH \pm DS*	$D_{4,3}$ (μ m)	Span
F1 Estearato de sorbitano/PEG100 estearato	1204 \pm 14	6,54 \pm 0,03	4,18	2,43
F2 PEG8 estearato	3720 \pm 120	6,55 \pm 0,01	5,52	1,39
F3 Steareth 2/ Steareth 21	287 \pm 11	6,55 \pm 0,02	4,94	2,36
F4 Tween 80/Span80	1432 \pm 30	6,39 \pm 0,02	5,81	2,38

DS*: Desviación estándar

-Viscosidad

La viscosidad es una medida de la resistencia de un fluido a la deformación o flujo, la cual está relacionada con la fricción interna del material. Cuantitativamente se obtiene de la relación entre la fuerza de corte o cizallamiento y la velocidad de corte en un flujo estacionario de corte simple (89).

En las emulsiones, la viscosidad frecuentemente se describe o predice en términos de la viscosidad de la fase continua (n_0) y de la cantidad de fase dispersante, como se describe en la Ecuación de Einstein 2-4 (90).

$$n = n_0(1 + 2.5\phi) \quad \text{Ecuación 2-4}$$

*n_0 es la viscosidad del medio
 ϕ es la fracción de volumen de la fase dispersa ($\phi < 1$)*

Además, Sherman incluye el efecto de los emulsificantes en la viscosidad por medio de la ecuación 2-5 (90).

$$n = n_0 \exp(K_S C_E \phi + Y_S) \quad \text{Ecuación 2-5}$$

C_E es la concentración del emulsificante y K_S , Y_S son constantes.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, las emulsiones de PEG8 estearato (F2) y de Tween 80/Span 80 (F4) presentan los mayores valores de viscosidad, seguidas de las emulsiones de estereato de sorbitano con PEG100 estearato (F1) y de Steareth 2 con Steareth 21 (F3).

Estos resultados son concordantes con lo descrito por Sherman en la Ecuación 2-5, en donde la viscosidad de la emulsión aumenta a medida que se incrementa la concentración del emulsificante (C_E). Considerando que la viscosidad del medio continuo (n_0) es el resultado de la viscosidad del agente emulsificante adicionado en la fase dispersante más la viscosidad propia del medio (91), es coherente que la emulsión 2 (F2) que contenía un 3% de PEG8 estearato presentara la mayor viscosidad (3720 ± 120 cP) puesto que, respecto a las otras emulsiones, es la que contiene la concentración más alta de emulsificante. En este mismo sentido, se encuentra que a medida que se disminuye la concentración de los emulsificantes, la viscosidad también se reduce, por lo tanto, la emulsión 4 (F4) con un 2,04% de Tween 80 (1432 ± 30 cP) es la que presenta el segundo valor de viscosidad más alto, seguida de la emulsión (F1) con un 1,96% de PEG100 estearato (1204 ± 14 cP) y de la emulsión (F3) con un 1,89% de Steareth 21 (287 ± 11 cP).

La Ecuación de Einstein es válida cuando la fracción de volumen de la fase dispersa ϕ es $\ll 1$. Bajo estas consideraciones, se asume que no se presentan interacciones entre las gotículas dispersas, de modo que estas no influyen en la dinámica del flujo a su alrededor. Esto se explica a través del número de Peclet, Pe , el cual consiste en la relación entre las tensiones proporcionadas por desplazamientos dinámicos ($n\gamma'$) y difusionales $K_B T/R^3$,

(Ecuación 2-6) (92). Si Pe es $\gg 1$, el movimiento de difusión o browniano se puede despreciar y se puede analizar el proceso de dinámica de fluidos, ya que el tamaño de las gotículas es lo suficientemente grande. Los movimientos moleculares son perceptibles solo para las gotas pequeñas de tamaño nanométrico, y solo se considera la influencia de la dinámica de fluidos, es decir, el comportamiento de una gota bajo la acción de fuerzas del movimiento relativo de la gota y del líquido que la rodea (92).

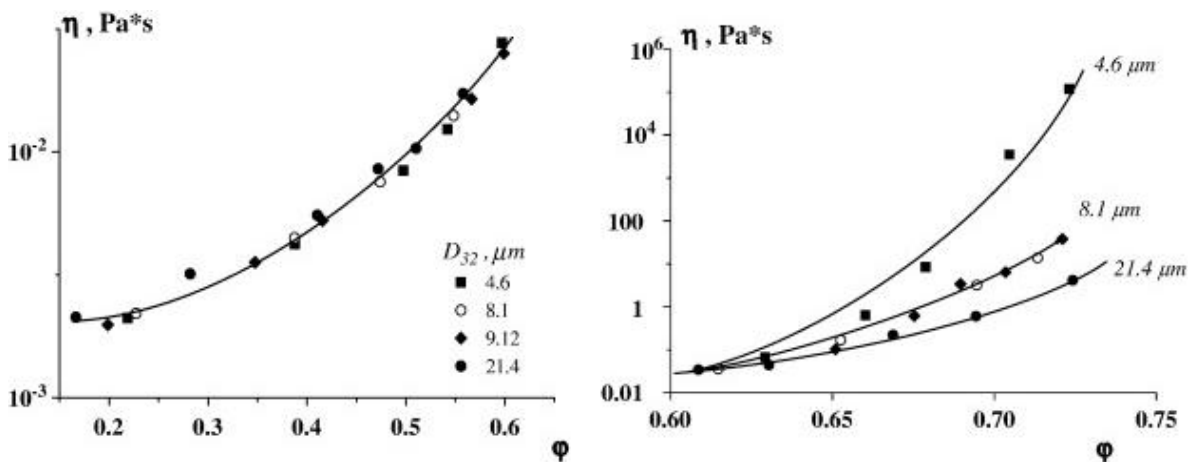
n es la viscosidad
 $\dot{\gamma}$ es la velocidad de corte
 T es la temperatura absoluta
 K_B es la constante de Boltzman
 R es el radio de gota

$$Pe = \frac{(n\dot{\gamma})}{K_B T / R^3}$$

Ecuación 2-6

Con base en lo anterior, se encuentra que las emulsiones preparadas hacen parte de las denominadas emulsiones diluidas ($\phi = 0,2$) y como resultado de ello, el tamaño de gotícula no influye en la reología de las emulsiones. Esto coincide con los valores obtenidos de viscosidad y de tamaño de gota $D_{4,3}$, por cuanto no se evidencia ningún tipo de tendencia o relación clara entre la viscosidad y los diferentes tamaños de gota calculados. No obstante, es oportuno mencionar que si se incrementa la concentración de la fase dispersa particularmente en rangos de $0,6 < \phi < 0,75$, el tamaño de gota influirá en la relación del volumen y área superficial de las gotas, lo cual modificará el flujo de gotas y la viscosidad, de manera que disminuciones en el tamaño de gota generarán incrementos en la viscosidad como se ilustra en la Figura 2-6 (92).

Figura 2-6. Dependencia de la fracción de fase dispersa y tamaños promedio de gota.
Tomado de Derkach SR (92).



Finalmente, la naturaleza química del agente emulsificante también puede afectar o influir en la viscosidad resultante de la emulsión, ya sea por el estado de la película del emulsificante formada en la interfase, o por su relación e interacción con las dos fases de la emulsión (93). Se reporta que el aumento de la viscosidad de las emulsiones con tensioactivos de bajo peso molecular se debe principalmente a la inmovilización de la fase continua por la formación de micelas, en el caso de los tensioactivos de alto peso molecular, el incremento de la viscosidad se explica principalmente por la adsorción de las moléculas del polímero y por la formación de capas interfaciales estructuradas (92). En el presente caso, es posible que un incremento en el número de grupos polioxietileno, carbonilo o sorbitano, conlleve a un incremento de viscosidad o resistencia al flujo debido a la formación de un mayor número de puentes de hidrógeno con la fase acuosa. Sin embargo, es necesario realizar estudios adicionales que permitan concluir con mayor certeza dichas relaciones estructurales.

Los valores de viscosidad no se tomaron en cuenta para la selección del sistema emulsificante, puesto que los resultados obtenidos en el tamaño de gota y en las pruebas de estabilidad física se consideraron de mayor relevancia como predictores de la eficacia y de la estabilidad física a largo plazo del sistema emulsificante.

-pH

El pH fue considerado como una propiedad fisicoquímica importante a evaluar en las emulsiones preparadas, dado que puede influir directa o indirectamente en los diferentes procesos bioquímicos que tienen lugar durante el proceso de cicatrización, tales como la angiogénesis, formación de colágeno, actividad de macrófagos, toxicidad bacteriana y actividad enzimática, por ejemplo, las metaloproteinasas que actúan durante la etapa de remodelación son sensibles a cambios pequeños de pH, por lo anterior, diferentes preparaciones tópicas y vendajes han sido desarrollados para controlar o alterar la superficie de pH de la herida, los cuales incluyen vendajes oclusivos, sustancias como la miel y cremas acidificadas de nitrato (94).

Bajo circunstancias normales, la superficie de la piel presenta un pH ácido de 4 a 6, el cual se modifica acercándose a un valor de 7,4 cuando se presenta una lesión (95). Se ha demostrado que el proceso de cicatrización ocurre más efectivamente a un bajo pH, ya que medios ácidos ayudan a controlar e impedir infecciones microbianas, a facilitar con

mayor rapidez el cierre de la herida, a promover la epitelización, a liberar una mayor cantidad de oxígeno (94), y a incrementar la migración y proliferación de fibroblastos.

Aun así, se reporta que en las heridas crónicas existe un balance fisiológico entre la degradación y regeneración de tejido, de manera que enzimas proteolíticas como catepsina G, elastasa, plasmina y la metaloproteinasa-2 de matriz y gelatinasa A (MMP2) se encuentran en el medio. La mayoría de estas enzimas requieren para su actividad óptima, valores de pH alcalinos de aproximadamente 7, en particular, la MMP2 exhibe un pH óptimo de actividad de 8,0. Por otro lado, se evidencia que en los trasplantes de piel la cicatrización se mejora cuando el valor de pH es superior a 7,4 (95).

Teniendo en cuenta lo previamente descrito, se decidió que el pH de las emulsiones debía encontrarse en valores de pH entre 6 y 8, comoquiera que dicho rango cubre los diferentes valores reportados para promover la curación en las diferentes etapas del proceso de cicatrización. De acuerdo con lo anterior, las emulsiones preparadas son adecuadas para su aplicación tópica en cualquier tipo de lesión cutánea, dado que su pH se encuentra dentro del rango preestablecido. Las emulsiones no evidencian diferencias importantes en sus valores de pH, estas presentan valores entre $6,39 \pm 0,02$ y $6,55 \pm 0,02$.

-Tamaño de gota $D_{4,3}$

El tamaño de gota tiene un efecto directo en diferentes propiedades de la emulsión, tales como la estabilidad física y química, viscosidad, eficacia *in vivo*, entre otras. Las emulsiones destinadas a ser administradas tópicamente usualmente presentan tamaños de gotícula del orden de los micrómetros (96,97), entre más pequeña sea la gota y la distribución de tamaños, la estabilidad física será mejor (97).

La relación entre el tamaño de gota y la estabilidad física de las emulsiones se debe principalmente a la velocidad de cremado o sedimentación descrita por la Ecuación de Stokes 2-7 (98).

R^2 es el tamaño de gota
 $\Delta\rho$ es la diferencia de densidad entre
 la fase interna y externa
 g es la gravedad
 η_o es la viscosidad de la fase
 continúa

$$v_o = \frac{2R^2\Delta\rho g}{9\eta_o}$$

Ecuación 2-7

Según la Ecuación de Stokes, a medida que se disminuye el tamaño de gotícula, la velocidad de sedimentación o cremado disminuirá evitando los diferentes fenómenos que

inestabilizarían físicamente la emulsión. La ecuación de Stokes es aplicable para fracciones de volúmenes $\phi < 0,01$. En emulsiones más concentradas $0,2 > \phi > 0,01$, la velocidad de sedimentación es reducida por debajo de la velocidad de Stokes como se define en la Ecuación 2-8 (98).

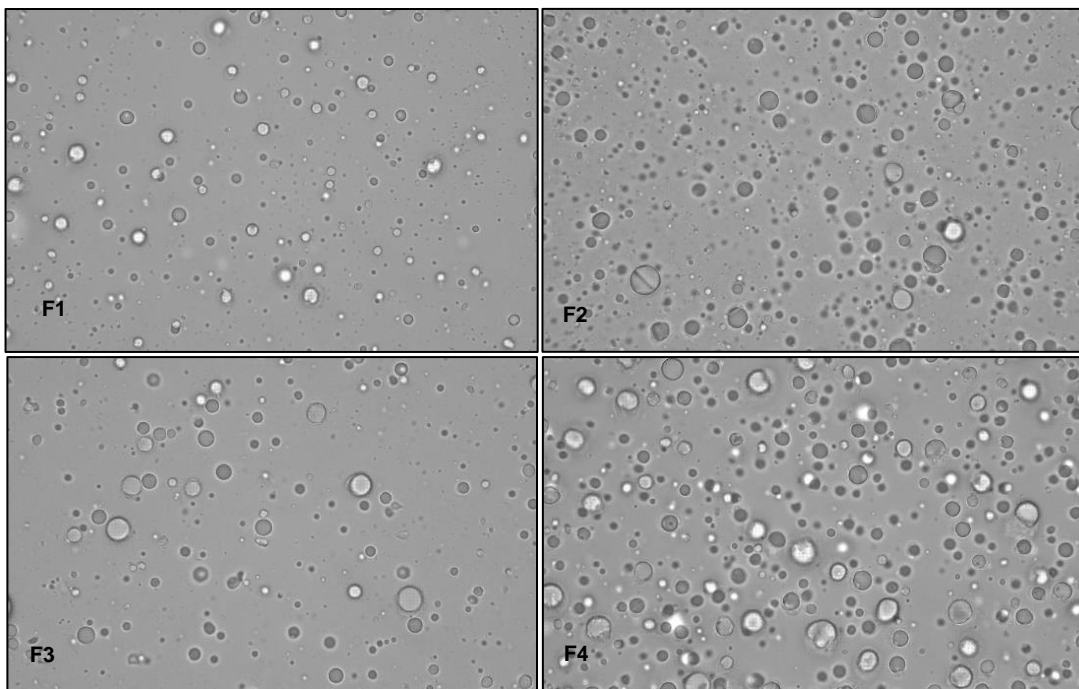
$$v = v_o(1 - 6.55\phi) \quad \text{Ecuación 2-8}$$

Adicionalmente, emulsiones que contienen tamaños de gotícula grandes usualmente tienen una fuerte tendencia a la coalescencia y maduración de Ostwald (96,97).

En la Figura 2-7 se ilustran las microfotografías de las gotas obtenidas con cada sistema emulsificante. La emulsión con estearato de sorbitano y PEG100 estearato (F1) presenta el menor tamaño de gotícula (4,18 μm), seguida de la emulsión de Steareth 2 y 21 (F3) (4,94 μm), PEG 8 estearato (F2) (5,52 μm) y de la emulsión de Span 80 con Tween 80 (F4) (5,81 μm).

Figura 2-7. Micrografías de las formulaciones preparadas en ensayos preliminares (100X)

F1: Estearato de sorbitano y PEG100 estearato; **F2:** PEG8 estearato; **F3:** Steareth 2 y Steareth 21; **F4:** Tween 80 y Span 80.



De acuerdo con los fundamentos previos, las emulsiones que contenían estearato de sorbitano con PEG100 estearato (F1) y de Steareth 2 con Steareth 21 (F3) se seleccionaron para la realización de los diseños estadísticos experimentales, puesto que presentaron los tamaños de gotícula más pequeños, con los cuales posiblemente se obtendría una mejor estabilidad física a largo plazo.

Las diferencias de tamaños presentadas entre los sistemas emulsificantes pueden ser una consecuencia directa de su estructura química, y de su interacción con las dos fases. Se observa que todos los sistemas emulsificantes comprendían una cadena hidrófoba saturada de 18 átomos de carbono, a excepción de la mezcla de Tween 80 con Span 80 en los que la cadena hidrocarbonada C₁₈ presentaba una insaturación *cis* en el carbono 9.

Esto puede ser un factor influyente para que la emulsión F4 de Tween 80 con Span 80, presentará el mayor tamaño de gotícula, ya que la introducción de una insaturación en la cadena hidrófoba causa una disminución del empaquetamiento de las moléculas del tensioactivo en la interfase, en especial cuando el isómero es *cis* (99). En este sentido, es posible que los emulsificantes Tween 80 y Span 80 estéricamente dificultaran la obtención de tamaños de gota más pequeños, similares al resto de diámetros alcanzados con los demás tensioactivos evaluados.

Por otro lado, en la emulsión F2 de PEG8 estearato como único emulsificante, se presentó el segundo tamaño de gota más grande, lo anterior también puede estar relacionado con la naturaleza de la película interfacial formada únicamente por el PEG8 estearato, puesto que los emulsificantes puros generalmente producen películas que no están lo suficientemente compactas, de modo que la utilización de dos o más emulsificantes se considera más apropiada porque se incrementa la interacción y condensación de las moléculas en la película interfacial, lo que sugiere un sinergismo de la mezcla (99).

Teniendo en cuenta las apreciaciones previas, las emulsiones F1 y F3 fueron escogidas para continuar los ensayos preliminares, las diferencias entre estos dos sistemas emulsificantes se analizarán al detalle en los diseños estadísticos de tipo exploratorio y de optimización.

-Span

El span es una medida del índice de dispersión del tamaño de las gotículas de la emulsión (77), el cual influye directamente en la velocidad de coalescencia de las gotas. Entre más

estrecha sea la distribución de los tamaños de gota, más estable es la emulsión puesto que si existe una amplia distribución, las gotas más grandes al ser termodinámicamente más estables y al presentar menor superficie interfacial, tienden a crecer por medio de la fusión con las gotas más pequeñas; si el proceso continúa la emulsión eventualmente se romperá (99).

Por otro lado, una dispersión alta también promueve fenómenos como la maduración de Oswald, dado que el diferencial de la presión interna entre las gotas pequeñas y grandes promueve la partición y transferencia de los lípidos de las gotas pequeñas a las gotas más grandes (100), con las cuales más adelante se ocasionarían posibles procesos de cremado y separación de fases.

De acuerdo con los resultados obtenidos, las emulsiones de estearato de sorbitano con PEG100 estearato (F1), de Steareth 2 y 21 (F3) y de Span 80 con Tween 80 (F4) presentan distribuciones de tamaño de gotícula muy similares. La emulsión de PEG8 estearato (F3) fue la que menor valor de span presentó, sin embargo, esta emulsión no se seleccionó para las etapas de formulación, dado que la utilización de mezclas de emulsificantes se consideró como una mejor alternativa para la estabilización estérica de las emulsiones según las diferentes fuentes consultadas. Además, porque la emulsión de PEG8 estearato también tuvo uno de los tamaños de gota más grande en los sistemas evaluados, con el que posiblemente se propiciarían diferentes fenómenos de inestabilidad, como se mencionó en el apartado anterior.

Estabilidad física

Los ensayos de estabilidad bajo condiciones de estrés permiten predecir la estabilidad física de las emulsiones a largo plazo por medio de la evaluación de los cambios que estas presentan con el tiempo.

Existen diferentes tipos de estos ensayos, en el presente estudio se utilizaron los ciclos de choque térmico, los cuales consisten en someter a las emulsiones a cambios de temperatura para identificar los procesos de inestabilización que pueden ocurrir en el tiempo evaluado (98).

Los principales mecanismos de inestabilidad comprenden fenómenos como la coalescencia, floculación, cremado y maduración de Ostwald, su representación gráfica se ilustra en la Figura 2-8 (100).

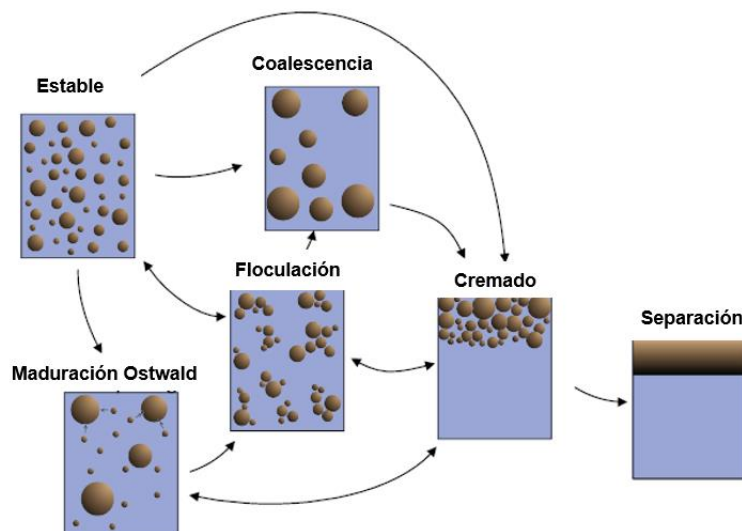
La coalescencia es el proceso mediante el cual dos o más gotas se fusionan en una gota más grande. Esto ocurre cuando las fuerzas de estabilización de la superficie no se repelen lo suficiente para mantener la estabilidad coloidal, de modo que las fuerzas de atracción son mayores a las fuerzas de repulsión, y como consecuencia de ello, las gotas se fusionan. Este proceso es termodinámicamente rápido pues conlleva a la reducción del área superficial del sistema y, por lo tanto, de su energía total, lo cual hace del proceso un fenómeno irreversible a menos que se aplique suficiente energía al sistema para separar nuevamente las gotas.

La floculación es la agregación de las gotas de la emulsión, en el cual las gotas retienen su identidad individual, pero hacen parte de una estructura agregada. Al igual que la coalescencia, se genera porque las fuerzas de repulsión reducidas conducen a un acercamiento de las gotas, ya que el sistema intenta minimizar el área superficial, sin embargo, existe una repulsión eléctrica o estérica que impide la fusión de las gotas. Se considera como un proceso reversible, puesto que se puede modificar por cambios de la fuerza iónica y del pH de la fase continua, o también con la adición de emulsificantes.

El cremado es la migración masiva de las gotas hacia la parte superior, impulsada por la flotabilidad de las gotas de la emulsión en la fase continua. La velocidad de cremado está influenciada por la diferencia de la densidad entre las gotas y la fase continua, el tamaño de las gotas y la viscosidad de la fase continua, eventualmente conduce a una separación completa de fases.

Finalmente, la maduración de Ostwald es un proceso de inestabilidad a largo plazo que implica la transferencia de masa de moléculas de lípidos entre las gotas de la emulsión. Este proceso está impulsado por la presión de Laplace de las gotas, en donde la presión dentro de las gotas de un radio más pequeño es mayor que la presión de las gotas más grandes, lo cual genera un diferencial de presiones que promueve la partición de moléculas de lípidos de las gotas pequeñas a las gotas más grandes (100).

















Figura 2-8. Procesos de inestabilización física de emulsiones. Tomado y modificado de Wilde PJ (100).



El aspecto físico de las emulsiones preliminares recién preparadas y después de los ciclos de calentamiento y enfriamiento aplicados se ilustran en la Tabla 2-10. Según se observa, las formulaciones de estearato de sorbitano con PEG100 estearato (F1), de PEG8 estearato (F2), y de Steareth 2 con Steareth 21 (F3) no evidenciaron cambios en la apariencia, color y uniformidad respecto a su aspecto inicial.

Respecto a la emulsión de Span 80 con Tween 80 (F4), se observa que esta presentó un proceso de separación de fases, debido a lo cual se descartó su uso como sistema emulsificante en la formulación. Este resultado posiblemente fue una consecuencia de la estructura química del Span 80 y Tween 80, dado que son los únicos emulsificantes que contienen una insaturación en su cadena hidrófoba que disminuye el empaquetamiento de las moléculas en la interfase (99), y como resultado de ello, generan el tamaño de gota más grande de todas las emulsiones preparadas. Además, este tamaño superior también pudo incrementar la velocidad de cremado, el acercamiento y coalescencia de las gotas según se describe en la Ecuación de Stokes (Ecuación 2-7). Aunque respecto a los otros emulsificantes, la emulsión de Span 80 con Tween 80 (F4) no presentó diferencias importantes en los valores del span, si presentaba algo de dispersión pues su valor fue mayor a 2, de modo que es posible que dicha dispersión también promoviera la coalescencia de las gotas en las etapas iniciales, y posteriormente la maduración de Ostwald hasta generar la ruptura completa de la emulsión.

Tabla 2-10. Aspecto físico de las emulsiones preliminares recién preparadas y después de la aplicación de los tres ciclos de choque térmico entre 40°C y 4°C.

	Antes de los tres ciclos de choque térmico		Después de tres ciclos de choque térmico	
F1*				
F2*				
F3*				
F4*				

F1*: Estearato de sorbitano y PEG100 estearato; **F2*:** PEG8 estearato; **F3*:** Steareth 2 y Steareth 21; **F4*:** Tween 80 y Span 80

Teniendo en cuenta las anteriores consideraciones relacionadas con la viscosidad, pH, tamaño de gota $D_{4,3}$, span y estabilidad física; las emulsiones de estearato de sorbitano con PEG100 estearato (F1) y de Steareth 2 con Steareth 21 (F3) fueron seleccionadas para continuar los estudios de formulación, puesto que presentaron en conjunto las mejores propiedades fisicoquímicas y de estabilidad física.

2.4.4 Diseños estadísticos experimentales

▪ Diseño estadístico experimental – Exploratorio

En un diseño estadístico experimental exploratorio, los factores o variables independientes bajo estudio (porcentaje de aceite, porcentaje de alcoholes, tipo de emulsificante, porcentaje del emulsificante, velocidad y tiempo de homogenización) son evaluados en un nivel bajo y un nivel alto, y un resultado o variable respuesta/dependiente es observado (viscosidad, tamaño de gota, span, pH) para establecer posibles relaciones de causa y efecto entre los mismos (101).

Los experimentos exploratorios son utilizados cuando se tiene poco conocimiento de las relaciones de causa/efecto, y cuando muchos factores independientes se encuentran bajo estudio, estos permiten establecer qué variables independientes son estadísticamente significativas, las cuales se deberán considerar como objeto de estudio en los ensayos de optimización subsiguientes (101).

En el presente estudio se empleó un diseño estadístico experimental exploratorio (DEE) tipo bloques confundido factorial 2^4 , el cual es utilizado cuando las unidades experimentales son heterogéneas y pueden agruparse dentro de bloques (101). En el diseño se establecieron como factores o variables independientes: el tipo de emulsificante, el porcentaje de emulsificante, el porcentaje de aceite, el porcentaje de alcoholes, la velocidad y el tiempo de homogenización, cada uno de estos a un nivel bajo y a un nivel alto. Como variables respuesta se evaluaron: la viscosidad, el pH, el tamaño de gota $D_{4,3}$ y el span. Complementariamente se evaluó la estabilidad física de las emulsiones con los ciclos de choque térmico descritos en los ensayos preliminares.

En la Tabla 2-11, se presentan los valores de las variables respuesta para cada una de las emulsiones preparadas de acuerdo con el diseño estadístico exploratorio.

Tabla 2-11. Características fisicoquímicas emulsiones diseño estadístico experimental exploratorio de bloques confundido.

Emulsión	Viscosidad \pm DS* (cps)	pH \pm DS*	$D_{4,3}$ (μ m)	Span
1	1667 \pm 84	6,90 \pm 0,04	9,97	2,62
2	20880 \pm 720	6,89 \pm 0,02	4,13	2,33
3	10061 \pm 138	6,92 \pm 0,01	3,57	2,28
4	10843 \pm 272	6,89 \pm 0,05	3,27	1,29

5	6880 ± 111	7,43 ± 0,02	6,62	1,23
6	9120 ± 40	7,03 ± 0,12	6,45	3,65
7	13173 ± 403	7,41 ± 0,01	3,75	1,83
8	7640 ± 72	7,51 ± 0,04	4,25	2,15
9	24213 ± 821	7,25 ± 0,07	1,72	1,45
10	497 ± 8	7,35 ± 0,01	4,20	2,26
11	2716 ± 20	7,34 ± 0,01	1,95	0,86
12	21413 ± 1963	7,40 ± 0,01	3,31	1,32
13	3527 ± 318	7,53 ± 0,01	3,49	1,80
14	10373 ± 306	7,50 ± 0,01	4,31	1,15
15	4549 ± 321	7,51 ± 0,02	3,81	2,70
16	5071 ± 278	7,49 ± 0,02	1,08	0,87

DS* Desviación estándar

Las variables independientes son estadísticamente significativas para la variable respuesta evaluada, cuando el valor p es menor al 0,05 (valor $p < 0,05$).

Asimismo, se encuentra que el efecto de los factores independientes sobre la variable respuesta puede ser positivo o negativo. El efecto es positivo si la variable respuesta tiene un valor mayor cuando la variable independiente se encuentra en el nivel alto (+), por el contrario, si el efecto es negativo, la variable respuesta tendrá valores superiores en el nivel bajo (-) de la variable independiente (77).

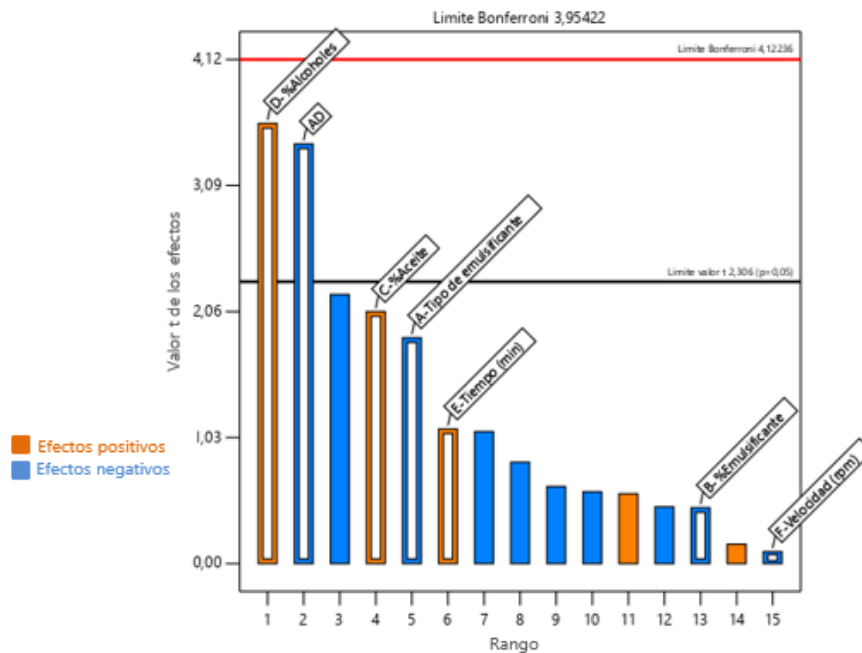
El análisis estadístico de los datos obtenidos con los diseños estadísticos experimentales se presenta en el Anexo B. Para todos los factores evaluados en ambos diseños, el modelo matemático de ajuste que relaciona las variables independientes con la variable respuesta es estadísticamente significativo, y como consecuencia de ello, proporciona una aproximación adecuada al sistema real dentro de los niveles de las variables empleadas para el análisis e interpretación de los datos (101,102). A continuación, se describen al detalle los resultados obtenidos.

-Viscosidad

El efecto de los factores en la viscosidad se ilustra en el gráfico de Pareto de la Figura 2-9. El gráfico de Pareto es un histograma de frecuencia que muestra en orden decreciente el efecto estandarizado de cada factor en la respuesta, los efectos estandarizados son estadísticos t que contrastan la hipótesis nula, en donde se afirma que el efecto de cada factor es cero. La línea negra que atraviesa las columnas indica qué efectos son estadísticamente significativos, es decir, sí las barras cruzan la línea de referencia negra los factores son estadísticamente significativos (102).

Según se observa en la Figura 2-9, el porcentaje de alcoholes tiene un efecto positivo y significativo (valor $p < 0,05$) sobre la viscosidad, es decir, en su nivel alto (2,5%) el valor de la viscosidad incrementa.

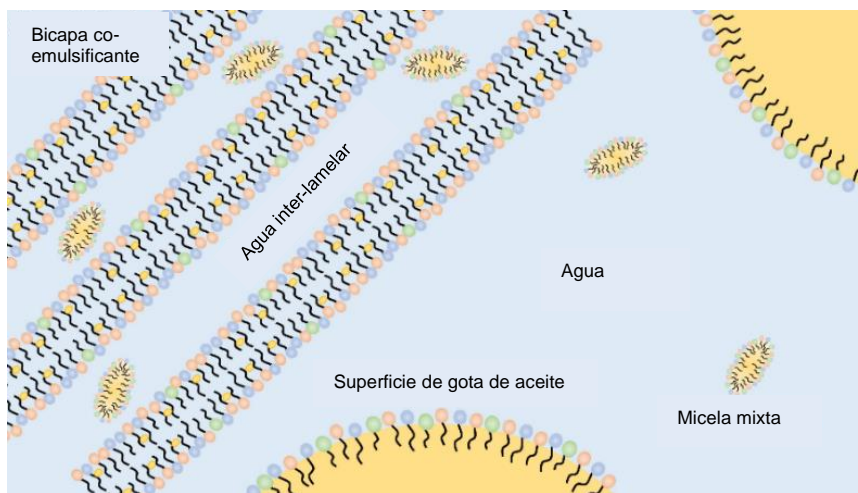
Figura 2-9. Gráfico de Pareto: valor t de los efectos de cada factor sobre la viscosidad (DEE).



El incremento de la viscosidad por la adición de alcoholes grasos se puede explicar por la formación de estructuras de cristal líquido en la fase continua entre los emulsificantes y los alcoholes grasos que actúan como co-emulsificantes (103). Las moléculas anfífilas y los lípidos polares forman agregados moleculares que se autoensamblan como micelas o como cristales líquidos liotrópicos, los cuales solo se forman si la porción hidrófoba de la molécula se encuentra en estado líquido tras el calentamiento por encima de la temperatura de transición gel-líquido cristal (T_c). A medida que la concentración de la molécula anfífila incrementa, el sistema cambia de micelas, a agregados de micelas en forma de varilla y a cristales líquidos liotrópicos, que consisten en una fase transparente ligeramente viscosa que retiene una gran cantidad de agua dentro del resto hidrófilo, estos normalmente presentan cuatro estructuras típicas: hexagonal, lamelar, cúbica y hexagonal inversa (103).

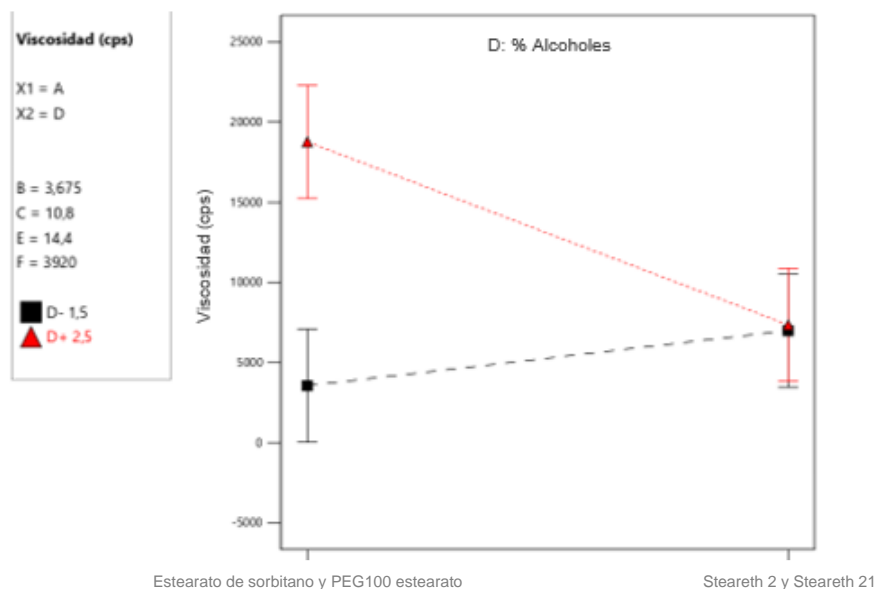
La transición gel-cristal líquido es reversible y el agua contenida en el cristal líquido se libera y se separa en dos fases por debajo de T_c , una de agua y otra de un cristal hidratado de la molécula anfifílica o del lípido polar. Sin embargo, un estado de gel puede permanecer sin liberar agua de la capa intermedia cuando se enfría por debajo de T_c en el caso de algunos compuestos, este estado se llama α -gel. Los alcoholes grasos como el alcohol cetílico y alcohol estearílico, son usualmente empleados como agentes que mejoran la estabilidad, viscosidad y consistencia, esto se debe al efecto de protección física del cristal líquido o de la fase de gel formada en la emulsión. A medida que se incrementa la cantidad de alcoholes grasos en la formulación, la viscosidad incrementa notoriamente por la formación de gotas secundarias en la emulsión que contienen cierta proporción de alcoholes grasos, así como por la formación de cristales líquidos lamelares o α -geles en la fase continua, lo que en conjunto mejora la estabilidad frente al cremado y a la coalescencia de la emulsión (104). La estructura de los cristales líquidos y las gotas secundarias se esquematizan en la Figura 2-10.

Figura 2-10. Cristales líquidos formados por co-emulsificantes y emulsificantes. Tomado y modificado de Ahamadi D, et al (103).



Por otra parte, se encuentra que la interacción entre el porcentaje de alcoholes y el tipo de emulsificante también es estadísticamente significativa para la viscosidad. Su efecto se ilustra en la Figura 2-11, en donde para ambos sistemas emulsificantes el efecto coincide con el análisis previo, en el cual la viscosidad incrementa si el porcentaje de alcoholes aumenta, sin embargo, se evidencia que para el Steareth 2 y Steareth 21, este aumento no es tan marcado como con el estearato de sorbitano y el PEG100 estearato.

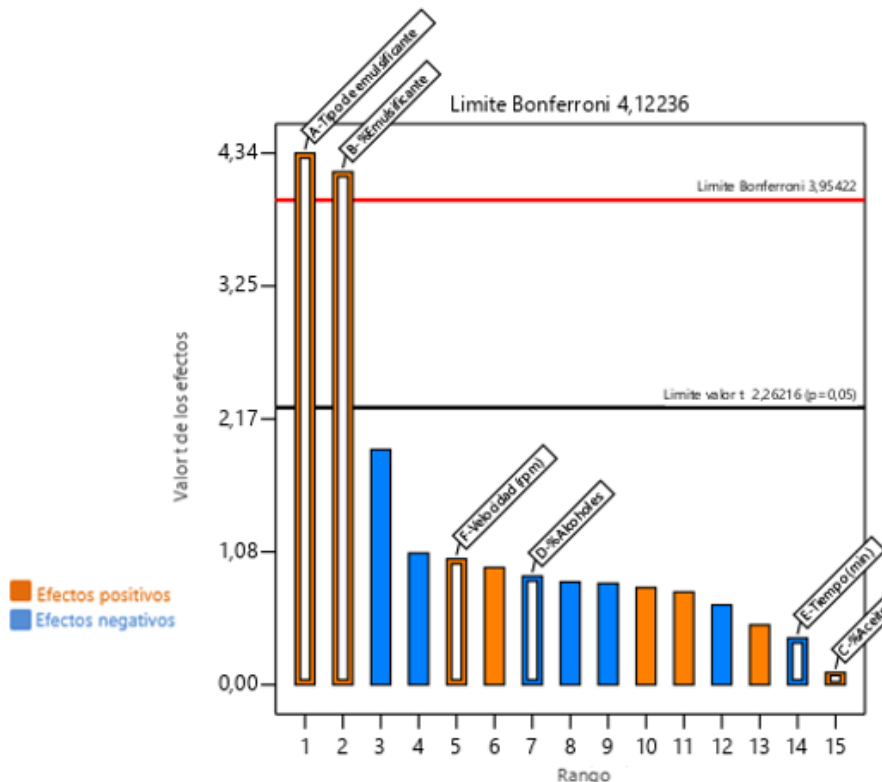
Figura 2-11. Efecto de la interacción del porcentaje de alcoholes y el tipo de emulsificante sobre la viscosidad (DEE).



-pH

En el pH, el tipo de emulsificante y el porcentaje de emulsificante presentan significancia estadística, y un efecto positivo sobre el pH, por lo tanto, en sus niveles altos el valor del pH es superior al del nivel bajo de las variables (Figura 2-12).

En el tipo de emulsificante el nivel alto corresponde a la combinación de Steareth 2 con Steareth 21, por lo tanto, un efecto positivo en esta variable implica que el sistema de Steareth 2 y Steareth 21 proporciona un valor de pH superior al de la mezcla de estearato de sorbitano con PEG100 estearato. Lo anterior puede estar relacionado con el grado de acidez de los grupos químicos de los emulsificantes, dado que el Steareth 2 y el Steareth 21 al ser alcoholes grasos etoxilados presentan un pH más alcalino que la combinación de estearato de sorbitano con el PEG100 estearato, posiblemente por algún tipo de acidez relacionada con los hidrógenos del carbono α de los ésteres de los ácidos grasos del sorbitano y del PEG100, o de los hidrógenos presentes en los grupos hidroxilo del sorbitano (105).

Figura 2-12. Gráfico de Pareto: valor t de los efectos de cada factor sobre el pH (DEE).

Referente al porcentaje de emulsificante, se evidencia que en el nivel alto del emulsificante (5%), el valor del pH de las emulsiones incrementa, posiblemente porque al aumentar la cantidad de emulsificante, el agua de la formulación disminuye y predomina el pH de algunos de los emulsificantes, el cual se encuentra entre 5 y 8 para el Steareth 2 y Steareth 21 (88).

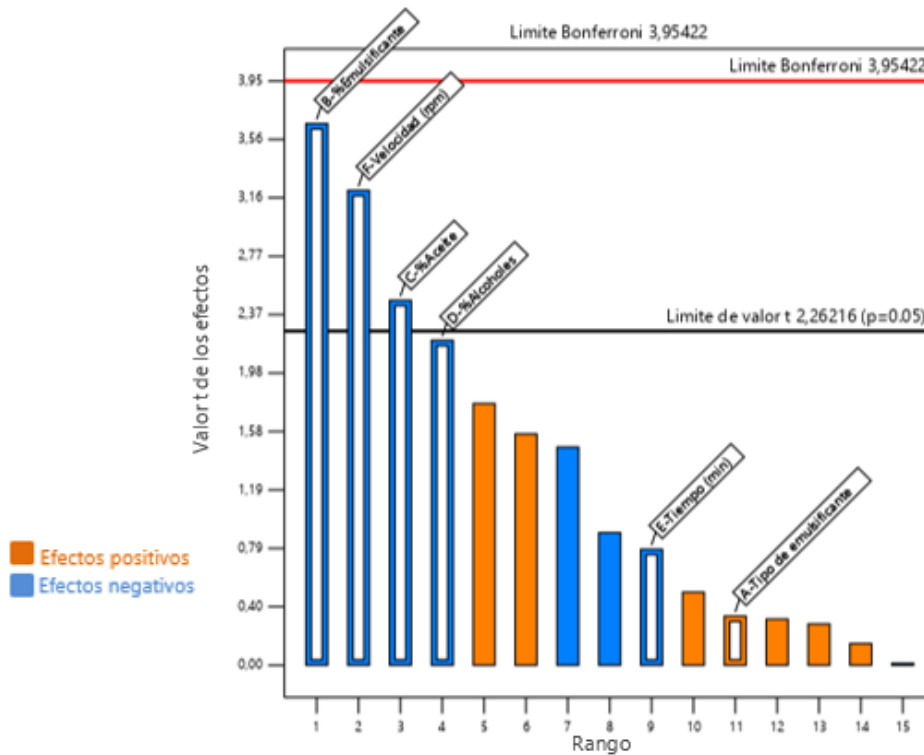
De acuerdo con la Tabla 2-11, los valores de pH de las emulsiones preparadas en el diseño exploratorio presentan valores entre $6,89 \pm 0,05$ a $7,53 \pm 0,01$, por lo tanto, sus pHs se encuentran dentro del rango de 6 a 8 seleccionado previamente, así que independiente de la composición y del proceso de elaboración del diseño exploratorio, las emulsiones son seguras y adecuadas para la aplicación tópica en las heridas.

-Tamaño de gota $D_{4,3}$

Según se observa en el gráfico de Pareto de la Figura 2-13, el porcentaje de emulsificante, el porcentaje de aceite y la velocidad de homogenización son estadísticamente significativos y presentan un efecto negativo sobre el tamaño de gota $D_{4,3}$, por lo cual, en sus niveles bajos el tamaño de gota es mayor.

Como se ha mencionado previamente, entre más pequeña sea la gota y la distribución de tamaños, la estabilidad física será mejor (97), por esta razón, inicialmente se plantea que es más favorable que el porcentaje de emulsificante, la velocidad de homogenización y el porcentaje de aceite se encuentren en sus niveles altos.

Figura 2-13. Gráfico de Pareto: valor t de los efectos de cada factor sobre el tamaño de gota $D_{4,3}$ (DEE).



La relación entre el tamaño de góticula y el porcentaje de emulsificante es un resultado esperado, dado que es necesario que se adsorba una monocapa de emulsificante en las gotas de la emulsión para disminuir la tensión superficial de la interfase (106,107). A bajas concentraciones de emulsificante, la película interfacial de aceite-agua puede no estar suficientemente cubierta, por lo que fenómenos de coalescencia y floculación podrían presentarse generando gotas de mayor tamaño (108)(109). Al adicionar una mayor cantidad de emulsificante, dichos procesos se evitan y con ello, el tamaño de gota se reduce (106,107).

Algunos modelos se han desarrollado, en los cuales las gotas coalescen de forma continua durante la emulsificación hasta que la adsorción superficial del emulsificante llega a un

valor límite Γ , que es característico de cada tipo de emulsificante como se describe en la Ecuación 2-9 (106):

C_S^{IN} es la concentración inicial del surfactante
 θ fracción de volumen de la fase oleosa
 Γ adsorción del surfactante

$$d_{32} = \frac{6\theta}{1-\theta} \frac{\Gamma}{C_S^{IN}}$$

Ecuación 2-9

Teniendo en cuenta la ecuación anterior, el diámetro y la concentración de emulsificante son inversamente proporcionales, de modo que si se incrementa la concentración del emulsificante C_S^{IN} , el diámetro de gota $D_{3,2}$ disminuye, tal y como se evidenció en el presente estudio. Sin embargo, en algunos sistemas después de cierta concentración de emulsificante, el tamaño de gota no dependerá de la concentración sino de las condiciones propias del proceso (106).

En este mismo sentido, se encuentra que la velocidad en su nivel alto de 5000 rpm también proporciona tamaños de gota menores respecto a la velocidad de 3000 rpm. Dicho resultado es concordante considerando que a mayores velocidades de homogenización, la solución tiene mayor energía para reducir el tamaño de gota debido a que se genera un mayor impacto mecánico de la emulsión contra las paredes del homogeneizador por la alta aceleración del fluido, así como una fuerza de corte superior entre el espacio del rotor y el estator (110)(111), lo que en conjunto favorece que los mecanismos de ruptura sean mayores a los de coalescencia (112). El concepto de una cascada de remolinos turbulentos también sustenta los resultados obtenidos, ya que a una mayor velocidad de homogenización o agitación se generan remolinos con fuerzas de corte superiores a las fuerzas cohesivas de las gotas para la fragmentación de estas a tamaños más pequeños (111).

Finalmente, en cuanto al porcentaje de aceite, se evidenció que este tiene un efecto negativo sobre el tamaño de gota, puesto que en su nivel alto (15%) los tamaños de gota son inferiores. Este resultado no coincide con lo reportado en algunos estudios (113,114), en los que se divulga que un incremento en el volumen de la fracción de la fase oleosa ocasiona tamaños de gota más grandes debido a una mayor frecuencia de coalescencia entre las gotas de aceite (114).

Sin embargo, esta tendencia no siempre se presenta por cuanto en algunas emulsiones, un incremento en la concentración de fase oleosa conlleva a un incremento en el área

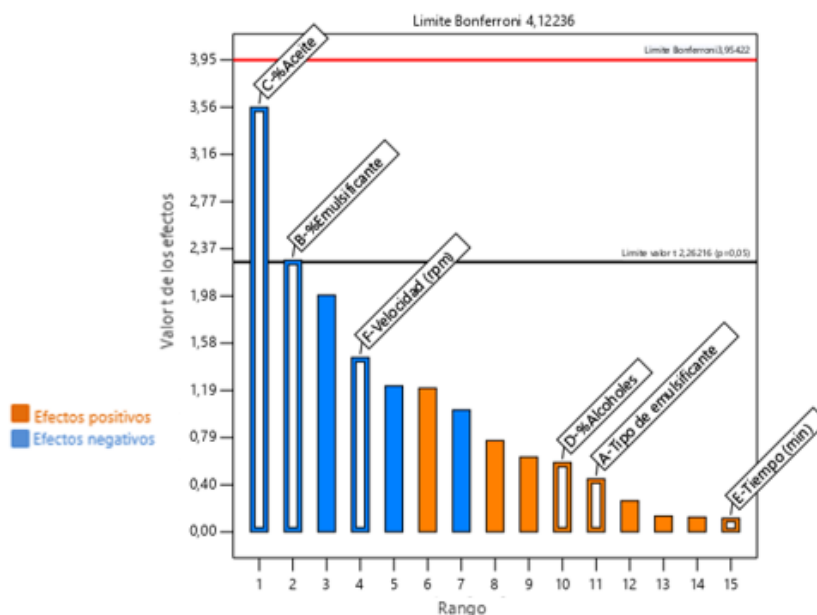
superficial de las gotas, es decir a disminuciones en el tamaño de gota, particularmente a concentraciones de emulsificante altas (115).

De acuerdo con lo anterior, el tamaño de gota se encuentra altamente influenciado por la concentración de emulsificante (114,115), puesto que si se incrementa la cantidad de aceite y la concentración de emulsificante no es suficiente para reducir la tensión interfacial y para formar la monocapa, se presentarán fenómenos de coalescencia y agregación. En el presente caso, es posible que la cantidad de emulsificante añadido a las formulaciones fuese suficiente para cubrir las gotas y formar la película interfacial, y que la influencia de las condiciones operacionales, tales como la velocidad y el tiempo de homogenización, o de los componentes propios de formulación predominaran para la obtención de tamaños de gota inferiores a concentraciones del 15% de aceite.

-Span

El porcentaje de aceite y el porcentaje de emulsificante tienen un efecto negativo y estadísticamente significativo sobre el span, de manera que en sus niveles bajos el span es mayor (Figura 2-14). Como se ha descrito, la emulsión es más estable entre más estrecha sea la distribución de los tamaños de gota (99), así que preliminarmente se considera que el porcentaje de aceite y el porcentaje de emulsificante deberían encontrarse en sus niveles altos.

Figura 2-14. Gráfico de Pareto: valor t de los efectos de cada factor sobre el span (DEE).



Respecto al porcentaje de aceite, se encuentra que el span es menor en el nivel alto. Según lo reportado en la literatura, tras evaluar la correlación del span con la concentración de aceite se encontró que la polidispersidad aumenta con el incremento de la cantidad de aceite a tiempos cortos de homogenización y a bajas concentraciones de emulsificante, sin embargo, cuando la concentración del emulsificante es alta, un incremento de la concentración del aceite puede generar índices de dispersión menores. En este sentido, los resultados obtenidos coinciden con las tendencias observadas si se considera que la concentración del emulsificante adicionada tanto en su nivel bajo como en su nivel alto, cubre totalmente las gotas para que las distribuciones de tamaño se hagan más estrechas a medida que se incrementa la fracción de fase oleosa (115).

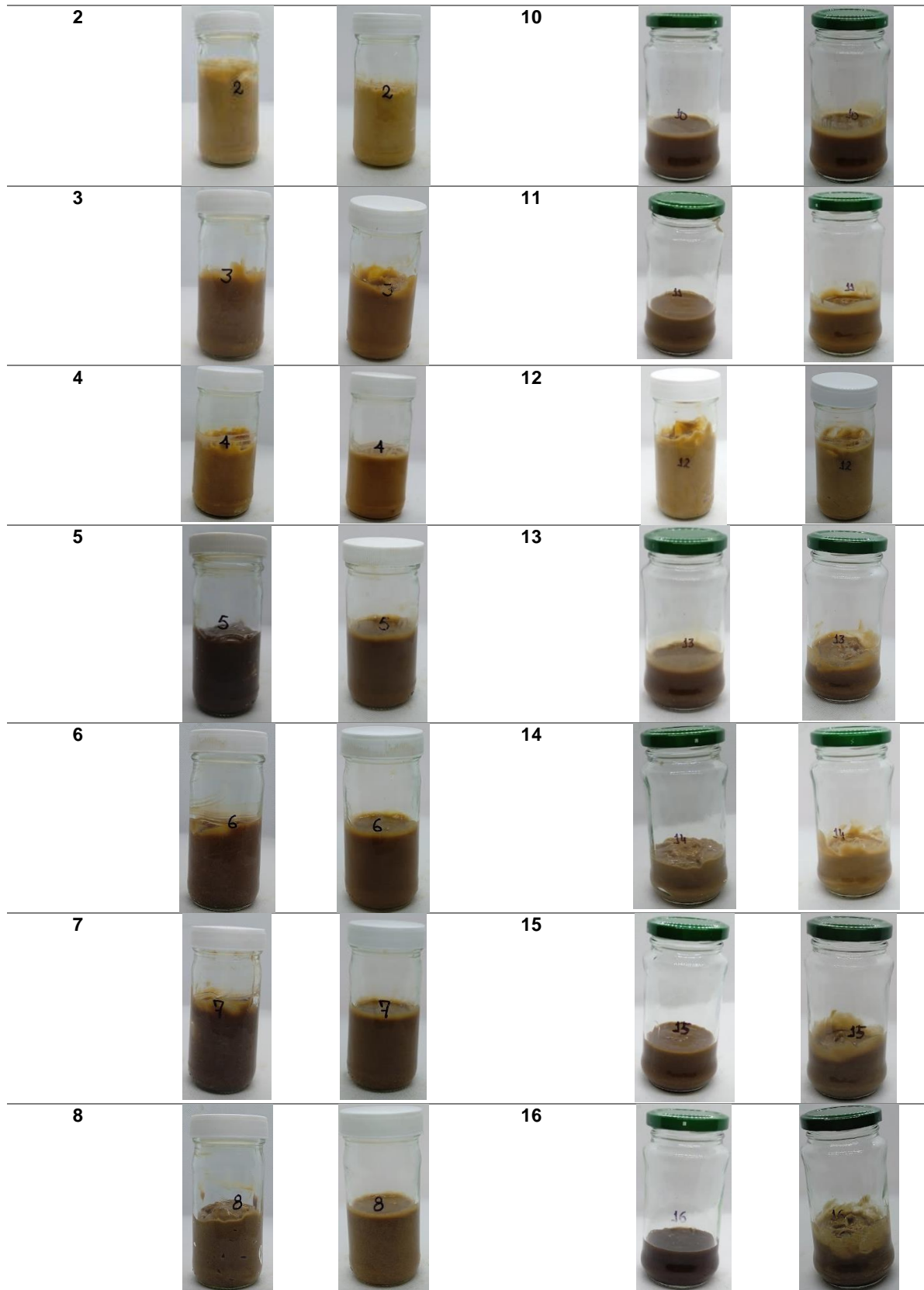
Por otro lado, es esperado que en el nivel alto del porcentaje del emulsificante el span disminuya (116), ya que al igual que sucede con el tamaño de gota, concentraciones más altas de emulsificante cubren áreas superficiales mayores en las gotas de forma más rápida, reduciendo la tensión interfacial y evitando fenómenos de coalescencia en el homogeneizador, así como distribuciones amplias. Se encuentra que en general, tamaños de gota grandes tienden a presentar dispersiones altas, por lo tanto, un aumento en la concentración del emulsificante reduce el tamaño de gota y con ello, el índice de dispersión (115,116).

Estabilidad física

Las emulsiones del diseño experimental exploratorio no evidenciaron cambios en la apariencia y uniformidad respecto a su aspecto inicial tras someterse a los ciclos de choque térmico. El aspecto físico de las emulsiones se demuestra en la Tabla 2-12.

Tabla 2-12. Aspecto físico de las emulsiones del diseño exploratorio antes y después de los ciclos de choque térmico.

Emulsión	Antes de los ciclos térmicos	Después de ciclos térmicos	Emulsión	Antes de los ciclos térmicos	Después de ciclos térmicos
1			9		



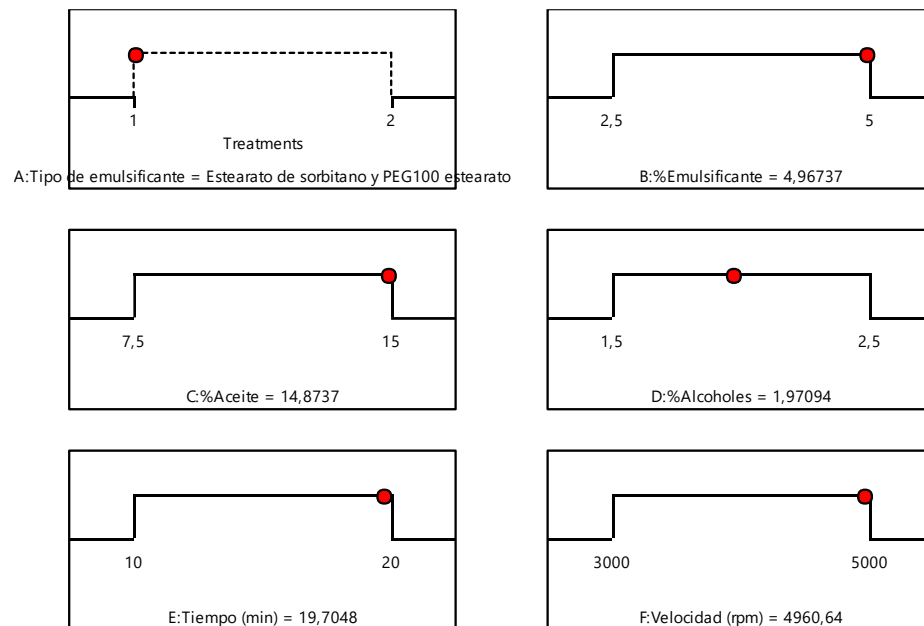
Condiciones para el diseño de optimización

Como se ha mencionado previamente, el tamaño de gota y el span se han considerado como las variables respuesta de mayor relevancia para predecir la estabilidad física a largo plazo de las emulsiones. Teniendo en cuenta lo anterior, para el diseño estadístico de optimización se seleccionaron como variables independientes: el porcentaje de emulsificante, el porcentaje de aceite y la velocidad de homogenización, dado que en el diseño estadístico exploratorio fueron los factores estadísticamente significativos ($p < 0,05$) para el tamaño de gota y el span.

Las variables no significativas como el tipo de emulsificante, el porcentaje de alcoholes y el tiempo de homogenización se analizaron con el software Design Expert 13.0 para identificar en qué nivel el tamaño de gota y el span eran menores.

Según la Figura 2-15, el tipo de emulsificante seleccionado para continuar con el diseño de optimización es el sistema de estearato de sorbitano y el PEG100 estearato, el porcentaje de alcoholes se estableció como el 2% y el tiempo de homogenización en 20 minutos.

Figura 2-15. Niveles de optimización para disminuir el tamaño de gota y span en cada variable independiente con el diseño estadístico exploratorio (DEE).



▪ **Diseño estadístico experimental – Optimización**

En la Tabla 2-13 se presentan los valores obtenidos en las variables respuesta viscosidad, pH, tamaño de gota $D_{4,3}$ y span de las emulsiones preparadas en el diseño estadístico de optimización.

El objetivo del diseño experimental de optimización 2^3 de dos repeticiones y cuatro puntos centrales (DEO) fue establecer las mejores condiciones en términos de los componentes, rangos de concentración y condiciones operacionales para la elaboración de la crema, así como la correlación entre los factores independientes y las variables respuesta evaluadas (101).

Tabla 2-13. Características fisicoquímicas emulsiones diseño estadístico de optimización.

Emulsión	Viscosidad \pm DS* (cps)	pH \pm DS*	$D_{4,3}$ (μ m)	Span
1	11062 \pm 470	7,21 \pm 0,04	10,42	2,5
2	15280 \pm 139	7,13 \pm 0,01	2,81	2,1
3	14333 \pm 114	7,19 \pm 0,02	2,27	1,29
4	16480 \pm 80	7,22 \pm 0,03	3,87	2,21
5	15093 \pm 201	7,16 \pm 0,02	2,44	1,81
6	7302 \pm 88	7,12 \pm 0,03	2,47	1,23
7	18540 \pm 579	7,21 \pm 0,02	2,84	1,37
8	11360 \pm 314	7,23 \pm 0,01	9,51	1,86
9	16080 \pm 288	7,22 \pm 0,08	3,99	2,5
10	15373 \pm 61	7,13 \pm 0,02	2,53	1,85
11	8433 \pm 114	7,11 \pm 0,02	2,24	1,55
12	15360 \pm 80	7,17 \pm 0,03	2,73	2,09
13	14500 \pm 87	7,14 \pm 0,00	1,93	1,37
14	15093 \pm 122	7,20 \pm 0,01	1,76	0,84
15	16307 \pm 289	7,20 \pm 0,03	4,22	1,95
16	16133 \pm 167	7,25 \pm 0,02	3,55	1,39
17	16020 \pm 53	7,20 \pm 0,03	1,42	0,84
18	22480 \pm 288	7,18 \pm 0,01	1,62	0,85
19	22627 \pm 241	7,15 \pm 0,01	1,68	0,89
20	18547 \pm 220	7,25 \pm 0,02	2,81	1,37

DS* Desviación estándar

A continuación, se presenta el análisis de los efectos de los factores: porcentaje de emulsificante, porcentaje de aceite y de la velocidad de homogenización sobre las variables respuesta: viscosidad, pH, tamaño de gota $D_{4,3}$ y span. Los datos estadísticos del análisis de varianza (ANOVA) obtenidos con el diseño estadístico de optimización se incluyen en el Anexo B.

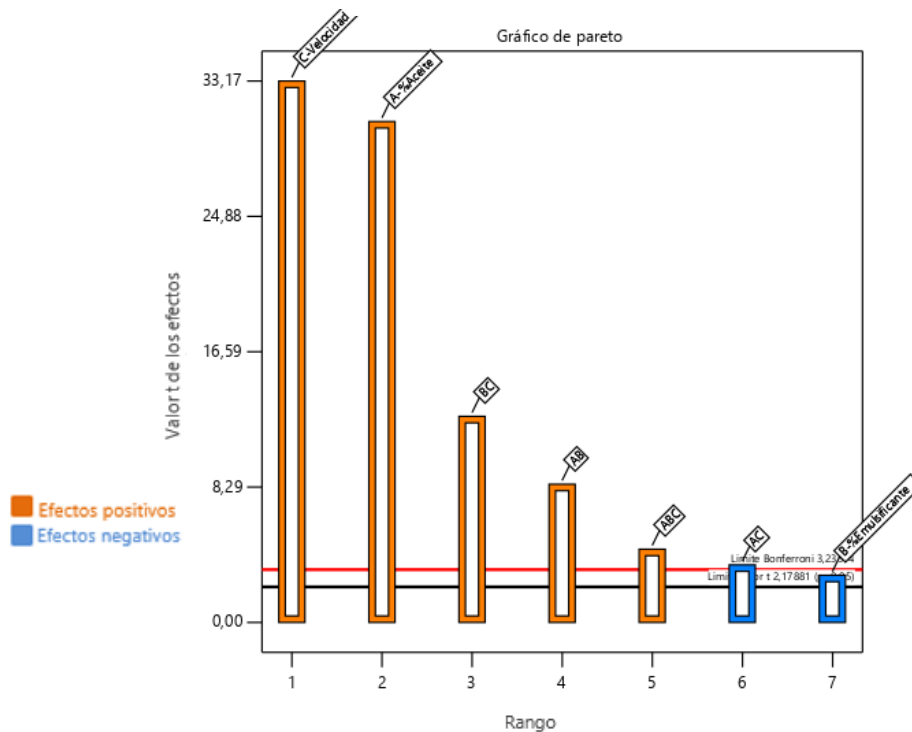
-Viscosidad

Como se ilustra en el gráfico de Pareto (Figura 2-16), el porcentaje de aceite, el porcentaje de emulsificante, la velocidad de homogenización; las interacciones dobles del porcentaje de aceite con el porcentaje de emulsificante, del porcentaje de aceite con la velocidad, del porcentaje de emulsificante con la velocidad; así como la interacción de los tres factores, son fuentes estadísticamente significativas para la viscosidad.

La velocidad de homogenización y el porcentaje de aceite tienen un efecto positivo sobre la viscosidad, por lo cual, en sus niveles altos la viscosidad es mayor. En cuanto al porcentaje de emulsificante, se observa que su efecto es negativo, dado que al aumentar la cantidad de emulsificante la viscosidad disminuye. Sin embargo, todas las posibles interacciones entre los tres factores evaluados son estadísticamente significativas y como consecuencia de ello, no es posible interpretar individualmente cada efecto principal, ya que el efecto de cada factor sobre la respuesta diferirá dependiendo del nivel de los otros factores (117).

En el presente caso, el análisis se realizará considerando las interacciones dobles y la interacción de los tres factores en cada uno de los niveles establecidos.

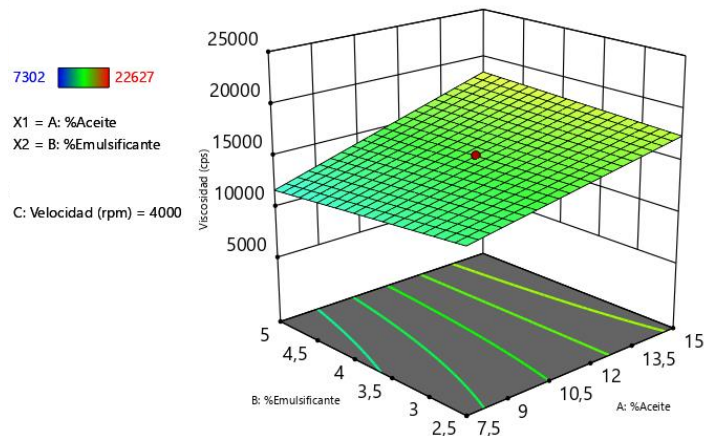
Figura 2-16. Gráfico de Pareto: valor t de los efectos de los factores sobre la viscosidad (DEO).



En la Figura 2-17 se ilustra la descripción gráfica del modelo matemático ajustado de la viscosidad, conocido como gráfico de superficie respuesta. A través de este gráfico es posible evaluar en los niveles estudiados cómo cambia la variable respuesta (viscosidad) para cada factor y con la interacción entre factores (117). En el gráfico de superficie respuesta, los colores azules representan valores bajos de viscosidad (~7302 cP), los colores verdes indican viscosidades intermedias (~14964 cP) y los colores amarillos a rojo son indicativos de valores de viscosidad altos (~22627 cP).

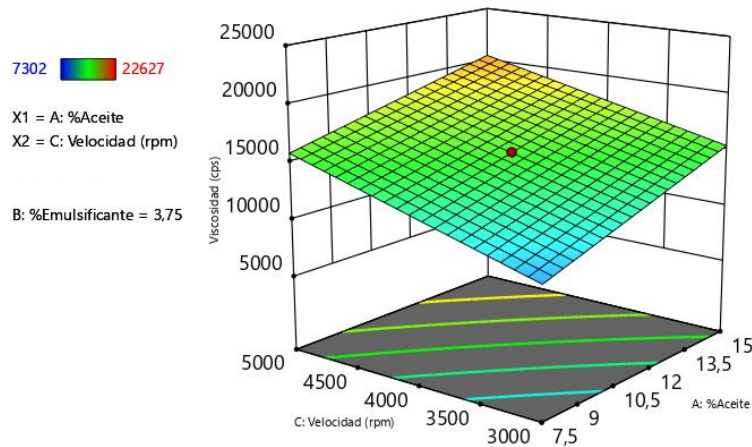
Teniendo en cuenta lo anterior, es posible evidenciar que para la interacción del porcentaje de aceite con el porcentaje de emulsificante (AB), la mayor viscosidad se obtiene cuando el porcentaje de aceite y el porcentaje de emulsificante se encuentran ambos en sus niveles altos, por el contrario, cuando el porcentaje de aceite se encuentra en su nivel bajo (7,5%) y el porcentaje de emulsificante en su nivel alto (5%), la viscosidad es la más baja.

Figura 2-17. Gráfico de superficie respuesta de la influencia del porcentaje de aceite y porcentaje de emulsificante sobre la viscosidad (DEO).



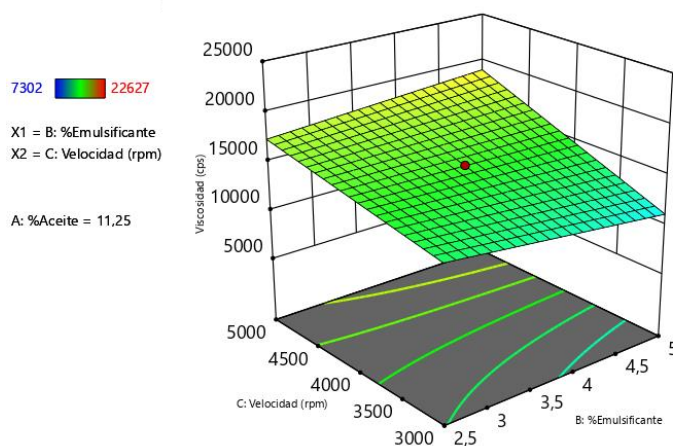
Ahora bien, respecto a la interacción del porcentaje de aceite con la velocidad de homogenización (AC), se evidencia en la Figura 2-18 que las viscosidades más altas se presentan cuando el porcentaje de aceite y la velocidad de homogenización se encuentran en sus niveles altos (15% y 5000 rpm respectivamente), y que la menor viscosidad es obtenida cuando el porcentaje de aceite y la velocidad de homogenización están en sus niveles bajos.

Figura 2-18. Gráfico de superficie respuesta de la influencia del porcentaje de aceite y la velocidad de homogenización (rpm) sobre la viscosidad (DEO).



Con relación a la interacción del porcentaje de emulsificante con la velocidad de homogenización (BC), se identifica en el gráfico de superficie respuesta de la Figura 2-19 que cuando el porcentaje de emulsificante está en su nivel alto del 5% y la velocidad de homogenización en su nivel bajo, los valores de viscosidad son menores (color azul claro), mientras que en los niveles altos de la velocidad de homogenización (5000 rpm) y del porcentaje de emulsificante (5%) la viscosidad es la más alta.

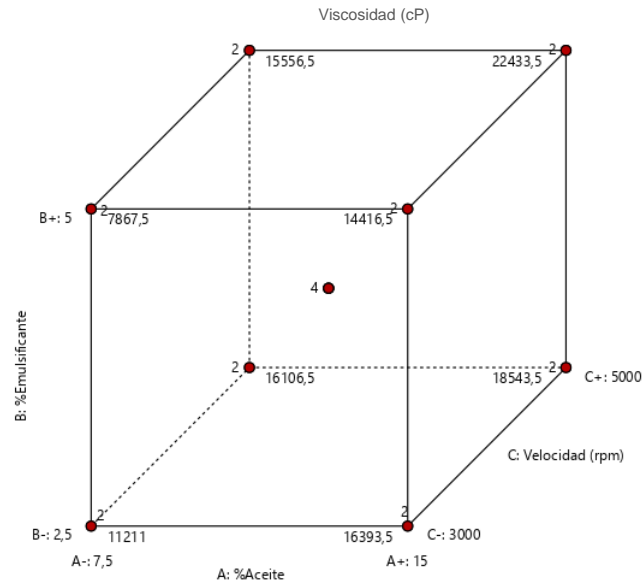
Figura 2-19. Gráfico de superficie respuesta de la influencia del porcentaje de emulsificante y la velocidad de homogenización (rpm) sobre la viscosidad (DEO).



Finalmente, para evaluar la interacción de los tres factores: porcentaje de aceite, porcentaje de emulsificante y velocidad de homogenización (rpm), se analizó el cubo obtenido con el modelo matemático de ajuste de la Figura 2-20, en el cual la mayor

viscosidad (22433,5 cP) se presenta cuando los tres factores están en sus niveles altos, es decir en un 15% para el porcentaje de aceite, en un 5% para el porcentaje de emulsificante y en 5000 rpm para la velocidad de homogenización.

Figura 2-20. Cubo del efecto de los tres factores: porcentaje de aceite, porcentaje de emulsificante y velocidad de homogenización sobre la viscosidad (DEO).



Se observa que, para todas las interacciones evaluadas tanto el porcentaje de aceite como la velocidad de homogenización presentan viscosidades mayores en sus niveles altos. Dichos resultados son concordantes con el efecto positivo observado en el gráfico de Pareto de la Figura 2-16, así como con lo reportando en la literatura, puesto que una mayor velocidad de homogenización genera tamaños de gota e índices de polidispersidad menores, con los cuales la viscosidad aumenta a causa de una disminución en la deformación, por una reducción en la fracción máxima de empaquetamiento debido a las restricciones en la fase de volumen máxima, por un movimiento browniano más fuerte o por un efecto osmótico mayor en tamaños de gota más pequeños (118)(119). En particular, para las emulsiones en donde la fracción del volumen de la fase dispersa es alta, la mayoría de propiedades reológicas se encuentran directamente relacionadas con la razón σ/R , en donde σ es la tensión superficial y R es el radio de la gota en un estado deformado, de manera que es esperado que tamaños de gota menores proporcionen un límite elástico, una viscosidad y un módulo elástico significativamente mayores (120), los cuales son el

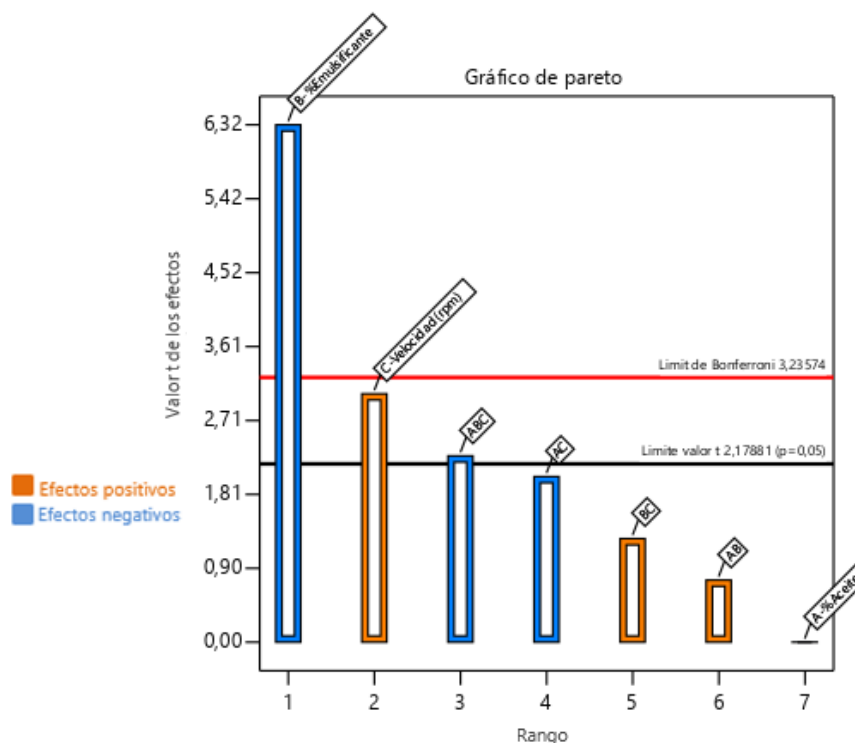
resultado de una mayor velocidad de homogenización. Asimismo, un aumento de la viscosidad por incrementar el porcentaje de aceite también es un resultado esperado, ya que como se había mencionado previamente, la viscosidad frecuentemente se describe o predice en términos de la viscosidad de la fase continua (n_0) y de la cantidad de fase dispersante según la Ecuación de Einstein 2-4 (90). En este sentido, si se incrementa la cantidad de aceite, la fracción del volumen de la fase dispersa aumenta, y con ello, la viscosidad se hace mayor (90)(121).

Con relación al porcentaje de emulsificante, se evidencia que su efecto principal es negativo. No obstante, al evaluar su interacción simultánea con el porcentaje de aceite y la velocidad de homogenización, se encuentra que en su nivel alto la viscosidad es mayor. Este resultado coincide con el análisis anterior de los ensayos preliminares, en donde la viscosidad de la emulsión aumenta a medida que se incrementa la concentración del emulsificante (C_E)(91).

-pH

Acorde con el gráfico de Pareto de la Figura 2-21, la velocidad de homogenización, el porcentaje de emulsificante y la interacción de los tres factores tienen efectos estadísticamente significativos sobre el pH.

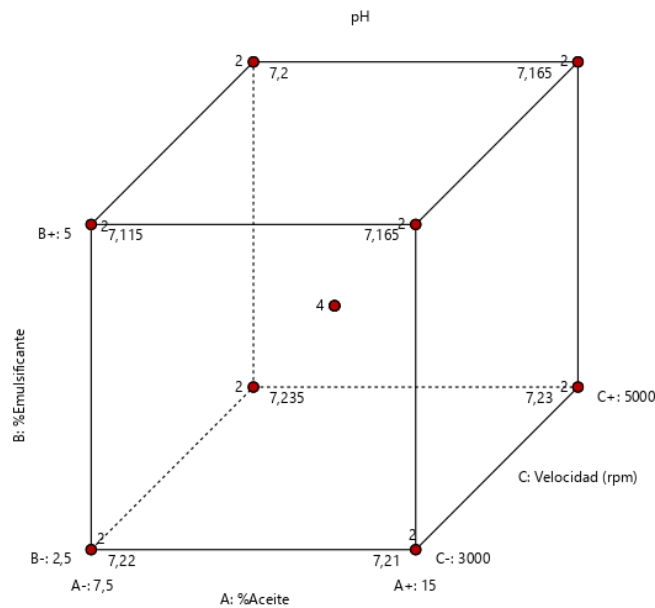
Figura 2-21. Gráfico de Pareto: valor t de los efectos de los factores sobre el pH (DEO).



Se evidencia que el porcentaje de emulsificante presenta un efecto negativo sobre el pH, por lo cual en su nivel más bajo el pH incrementa. En cuanto a la velocidad de homogenización, se observa que su efecto es positivo, de modo que en su nivel alto el pH es superior. Además, la interacción de los tres factores es estadísticamente significativa, debido a lo cual es necesario evaluar el efecto de cada factor teniendo en cuenta los niveles de los otros factores (117).

Según el cubo obtenido con el modelo de ajuste de la Figura 2-22, el menor valor de pH (7,115) se presenta cuando el porcentaje de emulsificante está en su nivel alto (5%) y cuando el porcentaje de aceite y la velocidad de homogenización están en sus niveles bajos (7,5%, 3000 rpm). Por otro lado, el pH más alto (7,235) es obtenido con el porcentaje de aceite y el porcentaje de emulsificante en sus niveles bajos (7,5% y 2,5% respectivamente) y con la velocidad de homogenización en su nivel alto (5000 rpm).

Figura 2-22. Cubo del efecto de los tres factores: porcentaje de aceite, porcentaje de emulsificante y velocidad de homogenización sobre el pH (DEO).



Con relación al efecto negativo del porcentaje de emulsificante sobre el pH, es posible que este se encuentre relacionado con los grupos químicos del sistema emulsificante de estearato de sorbitano con PEG 100 estearato. No se encontraron datos disponibles del pH del estearato de sorbitano, sin embargo, para el PEG100 estearato el pH está entre 5 y 7 (122), cuyo pH es ligeramente ácido respecto al agua. En este sentido, resulta

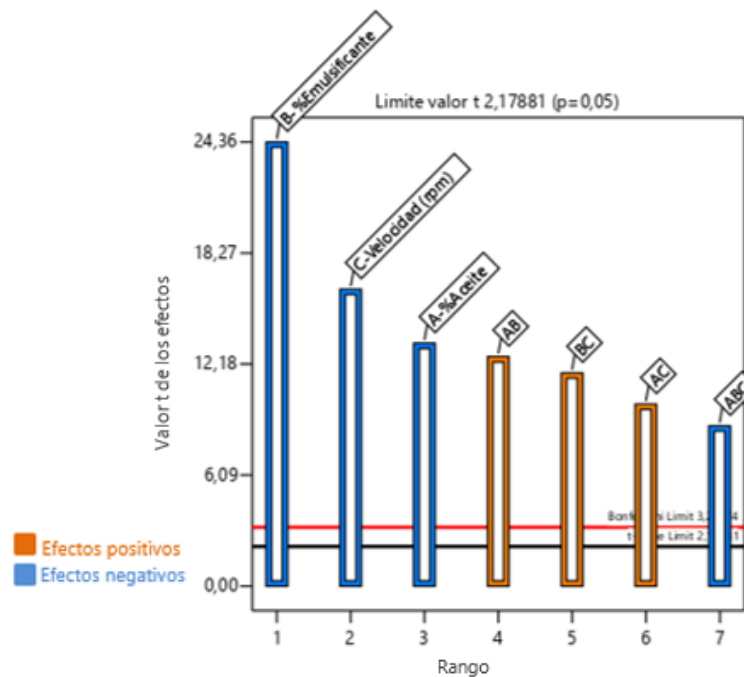
coherente que a medida que se incrementa la cantidad del emulsificante el pH disminuya, puesto que existe una mayor proporción de grupos químicos que desplazan el pH hacia valores más bajos en el sistema emulsificante.

Todas las emulsiones del diseño de optimización tienen pHs dentro del rango preestablecido, comoquiera que estos se encuentran entre $7,11 \pm 0,02$ y $7,25 \pm 0,02$. Por consiguiente, sus pHs son óptimos para la aplicación tópica de heridas independiente de la composición y condiciones operacionales. Se evidencia igualmente que las diferencias de pH no son muy amplias, ya que difieren en solo 0,14 unidades.

-Tamaño de gota $D_{4,3}$

Para el tamaño de gota $D_{4,3}$, el porcentaje de aceite, el porcentaje de emulsificante, la velocidad de homogenización; las interacciones dobles del porcentaje de aceite con el porcentaje de emulsificante, del porcentaje aceite con la velocidad, del porcentaje de emulsificante con la velocidad; así como la interacción de los tres factores, son fuentes estadísticamente significativas (Figura 2-23).

Figura 2-23. Gráfico de Pareto: valor t de los efectos de los factores sobre el tamaño de gota $D_{4,3}$ (DEO).



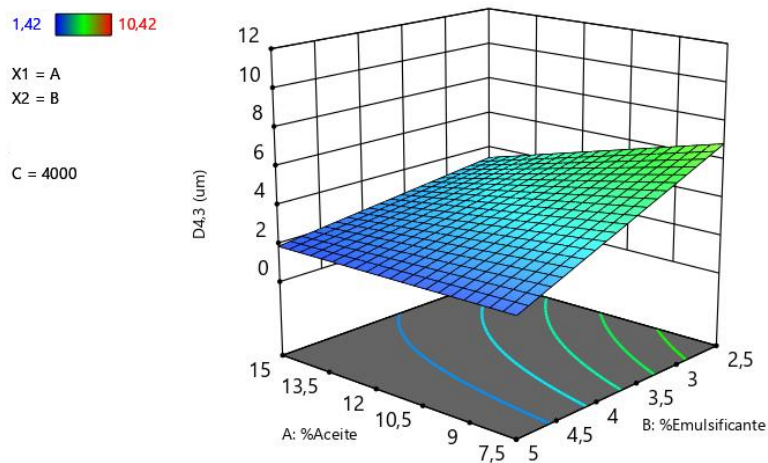
Al igual que en los resultados obtenidos con el diseño estadístico exploratorio, el porcentaje de aceite, el porcentaje de emulsificante y la velocidad de homogenización en sus niveles altos disminuyeron el tamaño de gota, por lo cual preliminarmente sería más conveniente que estos se encontraran en su nivel alto (97).

Sin embargo, es importante considerar que, en el diseño de optimización, las interacciones dobles y la interacción de los tres factores son estadísticamente significativas para el tamaño de gota, de modo que el efecto principal de cada factor sobre la respuesta no podrá realizarse individualmente, pues este cambia en función del nivel de los otros factores (117).

Teniendo en cuenta lo anterior, el análisis considerará en un principio las interacciones dobles y posteriormente la interacción de los tres factores en cada uno de los niveles establecidos, con el objetivo de establecer las condiciones más favorables del tamaño de gota para la estabilidad física a largo plazo.

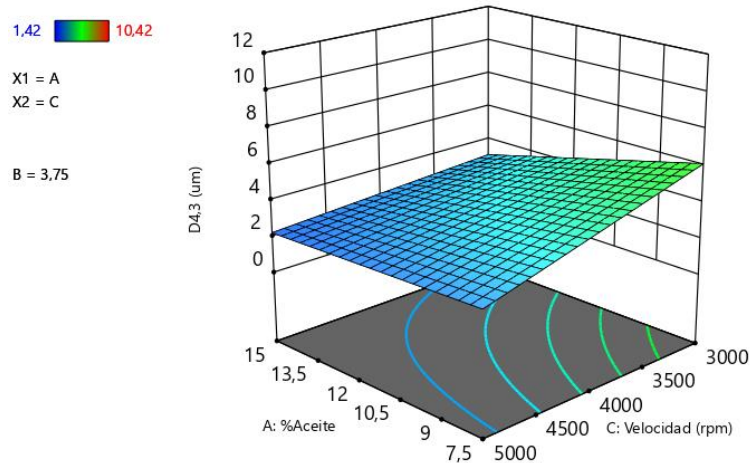
Al evaluar el gráfico de superficie respuesta del porcentaje de aceite con el porcentaje de emulsificante (AB) de la Figura 2-24, se observa que el menor tamaño de gota es obtenido cuando el porcentaje de emulsificante y el porcentaje de aceite están en sus niveles altos (5% de emulsificante y 15% de aceite), es decir, en la coloración de azul más oscura de la gráfica (~1,42 μm).

Figura 2-24. Gráfico de superficie respuesta de la influencia del porcentaje de aceite y del porcentaje de emulsificante sobre el tamaño de gota $D_{4,3}$ (DEO).



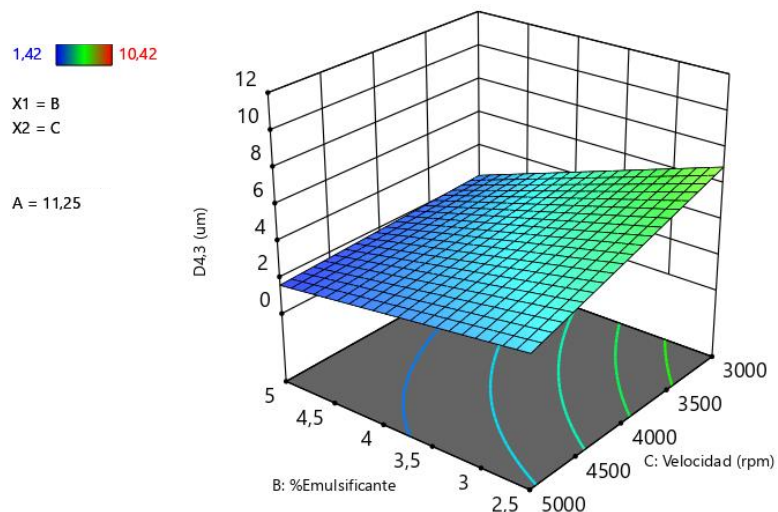
En cuanto a la interacción del porcentaje de aceite con la velocidad de homogenización (AC), de acuerdo con la Figura 2-25 el tamaño de gota más pequeño (color azul oscuro) se alcanza cuando la velocidad de homogenización se encuentra en su nivel más alto de 5000 rpm y con el que el nivel más alto del porcentaje de aceite del 15%.

Figura 2-25. Gráfico de superficie respuesta de la influencia del porcentaje de aceite y la velocidad de homogenización sobre el tamaño de gota $D_{4,3}$.



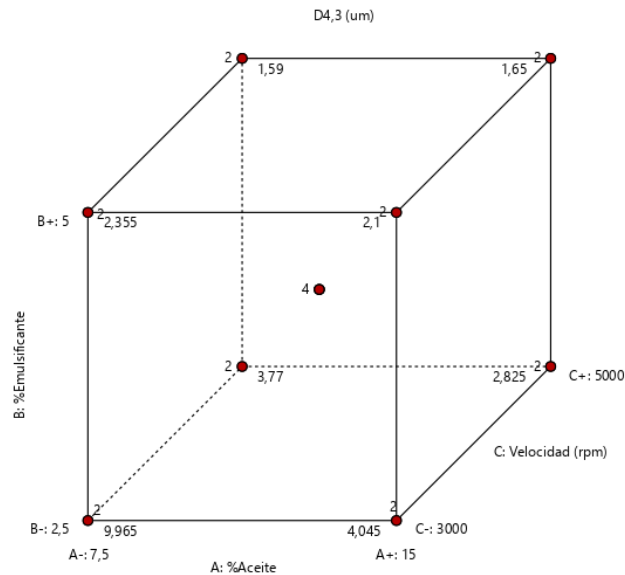
Respecto a la interacción del porcentaje de emulsificante y de la velocidad de homogenización, se evidencia en el gráfico de superficie respuesta de la Figura 2-26, que el menor tamaño de gota se presenta con el nivel alto del porcentaje del emulsificante (5%) y con el nivel alto de la velocidad de homogenización, es decir 5000 rpm.

Figura 2-26. Gráfico de superficie respuesta de la influencia del porcentaje de emulsificante y la velocidad de homogenización sobre el tamaño de gota $D_{4,3}$ (DEO).



Finalmente, para evaluar la interacción de los tres factores y su efecto en el tamaño de gota, se analizó el gráfico del cubo obtenido con el modelo matemático de ajuste de la Figura 2-27, en el cual el menor tamaño de gota ($\sim 1,59 \mu\text{m}$) se obtiene cuando el porcentaje de aceite está en su nivel bajo del 7,5%, el porcentaje de emulsificante en su nivel alto del 5% y la velocidad de homogenización en su nivel alto de 5000 rpm.

Figura 2-27. Cubo del efecto de los tres factores: porcentaje de aceite, porcentaje de emulsificante y velocidad de homogenización sobre el tamaño de gota $D_{4,3}$ (DEO).



Es posible evidenciar que el efecto negativo del porcentaje de emulsificante y de la velocidad de homogenización se conserva en la interacción de los tres factores, puesto que al igual que en el diseño estadístico exploratorio y que en las interacciones dobles AB, AC y BC, los niveles altos del emulsificante y de la velocidad de homogenización conllevan a una disminución en el tamaño de gota, los cuales son resultados concordantes y esperados según el análisis previo realizado en el diseño estadístico exploratorio.

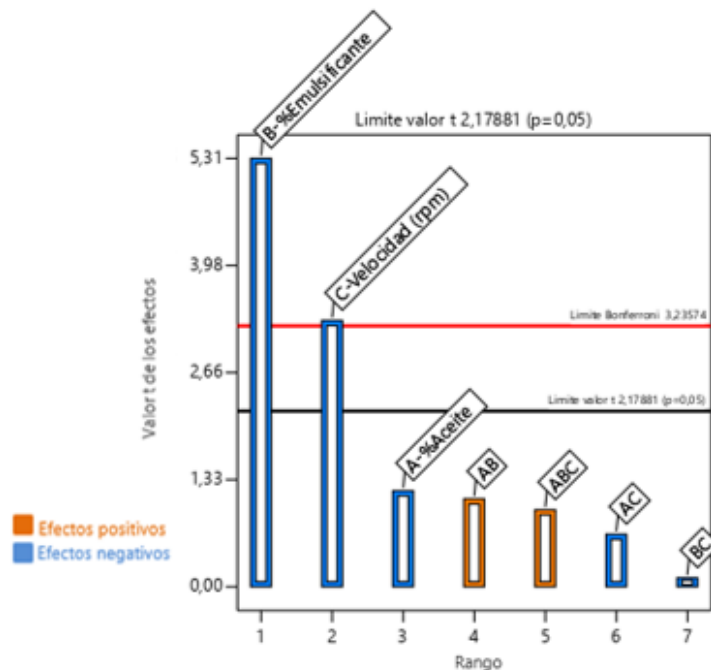
Sin embargo, el efecto positivo del porcentaje de aceite es el opuesto al de los análisis anteriores, dado que en la interacción de los tres factores ABC, es preferible que el porcentaje de aceite se encuentre en su nivel bajo, porque en este se disminuye el tamaño de gota. Este resultado es más concordante con lo reportado en la literatura, puesto que un incremento en el volumen de la fracción de la fase oleosa ocasiona tamaños de gota más grandes debido a una mayor frecuencia de coalescencia entre las gotas de aceite si la cantidad de emulsificante no cubre totalmente la superficie de las gotas (113,114).

Los resultados anteriores evidencian la importancia del efecto de las interacciones entre factores, puesto que como se ha precisado, si la interacción es estadísticamente significativa, el efecto principal de los factores puede cambiar en función del nivel de los demás. Esto se presentó para el porcentaje de aceite en la interacción de los tres factores, en donde el efecto cambió de uno negativo en las interacciones dobles y en el diseño exploratorio, a uno positivo con la interacción de los tres factores.

-Span

Se evidencia en el gráfico de Pareto de la Figura 2-28, que el porcentaje de emulsificante y la velocidad de homogenización tienen significancia estadística y que su efecto es negativo sobre el span, por lo que en sus niveles altos del 5% y de 5000 rpm, el span disminuye. Las interacciones entre factores no presentan un efecto estadísticamente significativo sobre esta variable respuesta, por lo cual solo se considerará el efecto principal del porcentaje de emulsificante y de la velocidad de homogenización para el análisis de los resultados obtenidos.

Figura 2-28. Gráfico de Pareto: valor t de los efectos de los factores sobre el span (DEO).



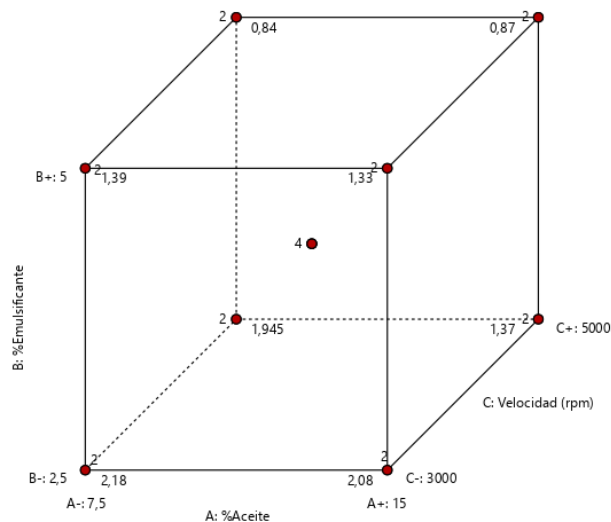
En cuanto al porcentaje de emulsificante, se evidencia que la tendencia es la misma a la que se obtuvo en el diseño estadístico exploratorio, ya que las distribuciones de tamaño

se hacen más estrechas al incrementar la concentración de emulsificante como se discutió con anterioridad (115,116).

Por otro lado, es esperado que con una velocidad de homogenización más alta también se disminuya el valor del span, debido a que se produce un mayor flujo turbulento, con el cual ocurre la ruptura de las gotas a tamaños inferiores. Lo anterior genera que la fracción de gotas pequeñas aumente y que la distribución de tamaños se haga más estrecha, dado que ocurre un desplazamiento general de los diámetros de gota hacia tamaños inferiores (123).

Adicionalmente, se analizó el cubo obtenido con el modelo matemático de ajuste de la Figura 2-29, en el cual el menor span o índice de dispersión (~0,84) se presenta cuando el porcentaje de aceite está en su nivel bajo del 7,5%, el porcentaje de emulsificante en su nivel alto del 5% y la velocidad de homogenización en su nivel alto de 5000 rpm. Dichos resultados coinciden con los mismos niveles obtenidos en el apartado anterior, con los cuales el tamaño de gota $D_{4,3}$ se reduce.

Figura 2-29. Cubo del efecto del porcentaje de aceite, porcentaje de emulsificante y velocidad de homogenización sobre el span (DEO).



Estabilidad física

Las emulsiones del diseño experimental de optimización no evidenciaron cambios en la apariencia y uniformidad respecto a su aspecto inicial una vez sometidas a los ciclos de choque térmico. La apariencia física de las emulsiones se ilustra en la Tabla 2-14.

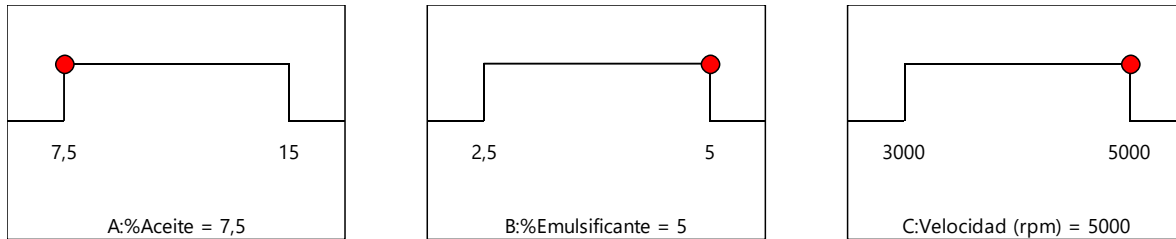
Tabla 2-14. Aspecto físico de las emulsiones del diseño de optimización antes y después de los ciclos de choque térmico.

Emulsión	Antes de los ciclos térmicos	Después de los ciclos térmicos	Emulsión	Antes de los ciclos térmicos	Después de los ciclos térmicos
1			11		
2			12		
3			13		
4			14		
5			15		
6			16		
7			17		
8			18		
9			19		
10			20		

Condiciones óptimas para la formulación según los resultados del diseño estadístico de optimización

De acuerdo con los resultados discutidos previamente, las condiciones óptimas para reducir el tamaño de gota $D_{4,3}$ y el span son: un porcentaje de aceite del 7,5%, un porcentaje de emulsificante del 5% y una la velocidad de homogenización de 5000 rpm. Estos resultados coinciden con el análisis realizado mediante el software Design Expert 13.0, el cual se ilustra en la Figura 2,30.

Figura 2-30. Niveles de optimización para disminuir el tamaño de gota $D_{4,3}$ y span (DEO).



2.4.5 Emulsiones finales de los diseños exploratorio y de optimización

En la Tabla 2-15, se detalla la composición y las condiciones de preparación de las emulsiones finales de los diseños estadísticos experimentales exploratorio y de optimización, las cuales fueron preparadas considerando las condiciones óptimas para disminuir el tamaño de gota y el span, derivadas de los análisis previos de cada diseño.

Tabla 2-15. Formulaciones emulsiones óptimas del diseño estadístico exploratorio y de optimización.

Componentes		Final diseño exploratorio (g/100g)	Final diseño optimización (g/100g)
Fase oleosa	Aceite mineral	15	7,5
	Alcohol cetílico	2	2
	Alcohol estearílico	2	2
	Estearato de sorbitano	1,92	1,57
Fase acuosa	Agua	17,83	25,33
	Propilenglicol	5	5

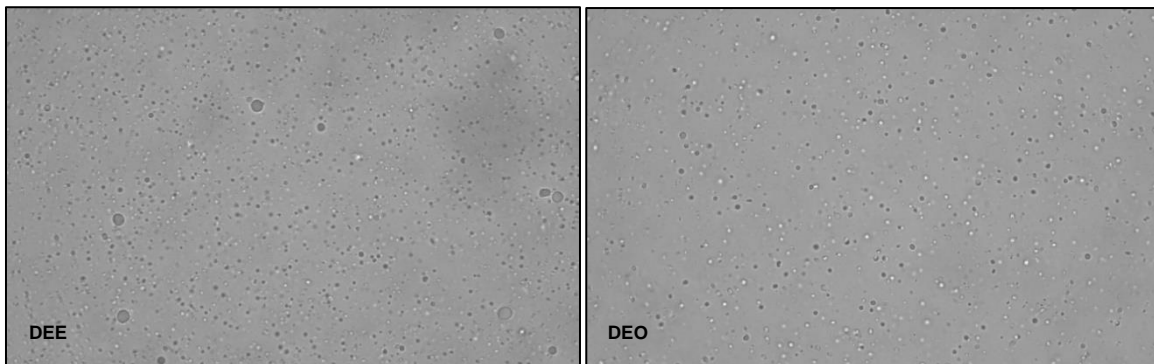
	PEG100 estearato	3,08	3,43
Fase panela	Agua	18	18
	Propilparabeno de sodio	0,02	0,02
	Metilparabeno de sodio	0,15	0,15
	Panela	35	35
Condiciones operacionales			
	Tiempo (min)	14/6	
	Velocidad (rpm)	5000	

Las propiedades de cada emulsión se presentan en la Tabla 2-16. Según se observa en la Figura 2-31 y de acuerdo con los valores reportados en la Tabla 2-16, la emulsión final del diseño de optimización sí presenta un menor tamaño de gota $D_{4,3}$ y una distribución más estrecha que la emulsión final del diseño exploratorio, por lo cual es posible concluir que los factores independientes se optimizaron con el diseño final implementado.

Tabla 2-16. Valores de variables respuesta de las emulsiones finales de cada diseño.

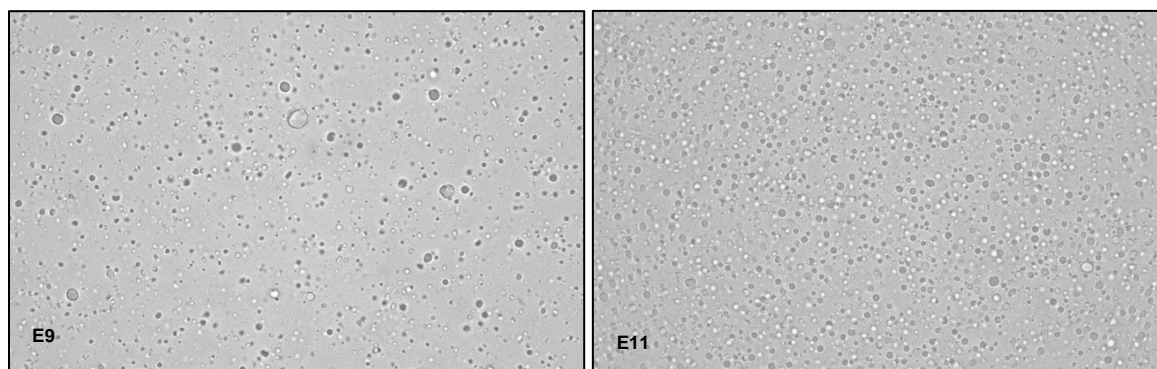
	Emulsión final diseño exploratorio	Emulsión final diseño de optimización
Viscosidad	22260 ± 164 cP	15587 ± 628 cP
pH	7,14 ± 0,08	7,07 ± 0,02
Tamaño de gota $D_{4,3}$	1,85 μm	1,56 μm
Span	0,98	0,90

Figura 2-31. Micrografías de las formulaciones finales del diseño estadístico exploratorio y de optimización (100X) **DEE:** Diseño estadístico exploratorio; **DEO:** Diseño estadístico de optimización.



Además, los valores del tamaño de gota $D_{4,3}$ y del span de la formulación del diseño de optimización también fueron inferiores a los de las emulsiones desarrolladas con el sistema de estearato de sorbitano y PEG100 estearato del diseño estadístico exploratorio, ya que en este, las emulsiones con tamaños de gota y span más pequeños fueron la emulsión 9 con un $D_{4,3}$ de 1,72 μm y un span de 1,45, y la emulsión 11 con un $D_{4,3}$ de 1,95 μm y un span de 0,86; cuyos valores son superiores a los de la emulsión final del diseño de optimización. Las micrografías de las emulsiones 9 y 11 se visualizan en la Figura 2-32.

Figura 2-32. Micrografías de las emulsiones de estearato de sorbitano y PEG100 estearato con los tamaños de gota $D_{4,3}$ y span más pequeños del diseño estadístico exploratorio **E9:** Emulsión 9 DEE; **E11:** Emulsión 11 DEE.



Con relación a las emulsiones del diseño de optimización, se observa que el valor de la formulación final es casi el mismo al de las emulsiones 14 y 17, dado que estas dos son réplicas de la emulsión final del diseño de optimización elaboradas bajo las mismas condiciones, las cuales presentan tamaños de gota $D_{4,3}$ de 1,76 μm y 1,42 μm ($\bar{x} = 1,59 \mu\text{m}$), y un span de 0,84. Dichos valores coinciden con el tamaño de gota $D_{4,3}$ de 1,56 μm y con el span de 0,9 de la emulsión final del diseño de optimización, en donde el $D_{4,3}$ y el span son los más pequeños de todas las emulsiones desarrolladas.

De acuerdo con lo discutido anteriormente, la emulsión final derivada del diseño estadístico de optimización fue seleccionada como la emulsión óptima para continuar con los ensayos del presente estudio. La composición cualicuantitativa y las condiciones de preparación se ilustran en la Tabla 2-17.

Tabla 2-17. Composición cualicuantitativa y condiciones de preparación de la formulación final óptima.

Componentes		Final diseño optimización (g/100g)
Fase oleosa	Aceite mineral	7,5
	Alcohol cetílico	2
	Alcohol estearílico	2
	Estearato de sorbitano	1,57
Fase acuosa	Agua	25,33
	Propilenglicol	5
	PEG 100 estearato	3,43
Fase panela	Agua	18
	Propilparabeno de sodio	0,02
	Metilparabeno de sodio	0,15
	Panela	35
Condiciones de preparación		
Tiempo de homogenización	20 minutos	
Velocidad de homogenización	5000 rpm	

2.4.6 Caracterización de la formulación final

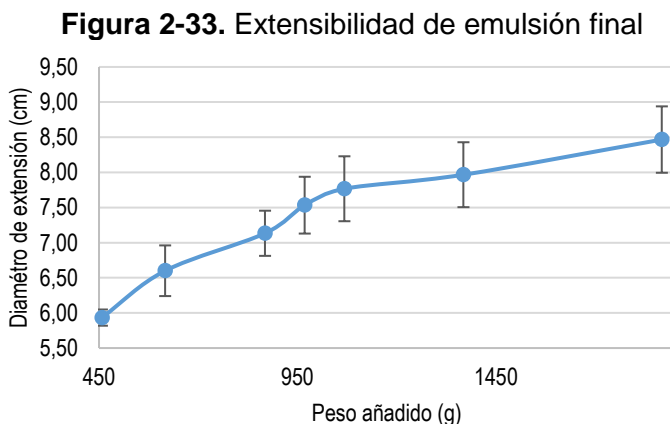
Las formas farmacéuticas percutáneas deben presentar características organolépticas y reológicas idóneas para su administración tópica, tales como una extensibilidad y textura adecuadas, una sensación agradable para usar y una adherencia sobre al área deseada en el tiempo oportuno (124). Es por ello, que una de las principales características a considerar en las preparaciones tópicas, es su perfil reológico, pues este tiene repercusión en la facilidad de la aplicación, en la extensibilidad del preparado sobre la piel, en la adherencia y en el tiempo de permanencia de la formulación sobre el lugar de aplicación para lograr que ejerza su acción farmacológica, los cuales contribuyen a la aceptación final del producto por parte de los pacientes (125). En este sentido, la emulsión final fue caracterizada por medio de propiedades como la extensibilidad, adherencia y perfil reológico, cuyos resultados se presentan a continuación.

- **Extensibilidad:**

La extensibilidad es un parámetro que indica la facilidad de aplicación del producto (77,126), definida como el área ocupada por una cantidad determinada de muestra al someterse a una presión estándar entre dos placas de vidrio (124).

En la Figura 2-33 se evidencia que la extensibilidad de la emulsión final se encuentra entre 6 cm y 8,5 cm de diámetro, equivalentes a áreas de 28,2 cm² y 56,7 cm² tras la adición de pesos crecientes de 450g a 1850g. Su extensibilidad es superior a la de ungüentos cicatrizantes reportados en la literatura, en los cuales las áreas de extensión oscilan en un rango de 5,84 a 6,76 cm² con la adición de un peso de 292g. En el presente caso, es esperado que la emulsión tenga una mayor extensibilidad que los ungüentos referidos, toda vez que las emulsiones contienen una cantidad superior de agua que incrementa el área o el diámetro de extensión debido a la disminución de la consistencia y oleosidad en la formulación (126).

La emulsión final es fácil de aplicar y presenta una buena extensibilidad. Estudios previos establecen que un producto cicatrizante tipo ungüento debe tener mínimo 17 cm² de extensibilidad al adicionar un peso de 292g (126), por lo tanto, la emulsión final cumple con dicho límite, dado que su área de extensión es de 21,5 cm² tras realizar la extrapolación de la curva con los datos experimentales de la Figura 2-33.



▪ Adherencia:

La adherencia de los productos a la piel es un fenómeno interfacial complejo que se encuentra directamente relacionado con la interacción de los componentes de la formulación y la superficie de la piel (127). Las propiedades fisicoquímicas de la superficie son esenciales tan pronto como una sustancia se pone en contacto con la piel, pues estas determinan la adhesión de partículas o la facilidad de esparcimiento de un producto sobre la piel. Estas propiedades se calculan principalmente con medidas del ángulo de contacto, a partir del cual se obtienen parámetros como la energía superficial libre o la tensión superficial crítica (128).

La aplicación de materias primas o productos tópicos puede modificar en gran medida la energía libre de la superficie. Una emulsión interactúa fuertemente con los componentes de la superficie (bicapas lipídicas, corneocitos, sebo) y también penetra en el estrato córneo; dichas interacciones dependen de la naturaleza y composición de la emulsión, por lo cual, es necesario realizar un trabajo amplio y metodológico para comprender y caracterizar adecuadamente las interacciones, así como la forma en que la composición de la emulsión induce modificaciones fisicoquímicas en la piel (128).

Como primera aproximación de la adherencia de la emulsión, se realizó un ensayo en el que 2g de emulsión fueron adicionados entre dos placas metálicas. De acuerdo con los resultados obtenidos, un peso de 377 ± 11 g es requerido para lograr la separación de las dos placas metálicas.

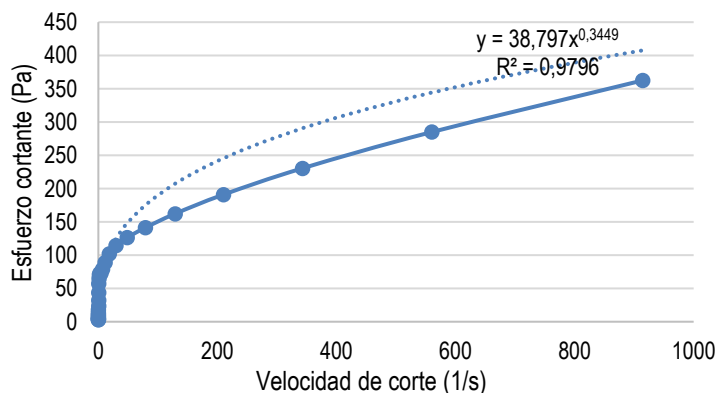
▪ Perfil reológico

La reología es la ciencia que estudia la deformación y flujo de la materia. Las medidas reológicas permiten entender los efectos de variación de la velocidad de deformación y el esfuerzo cortante en los procesos de manufactura, los efectos de los componentes de la emulsión en la estabilidad y en el tiempo de vida útil, y la forma en que el producto final responde a una fuerza aplicada cuando es dispensado y aplicado en la piel (129).

Viscosidad:

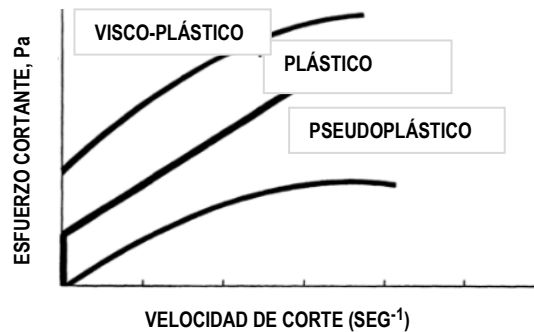
En la Figura 2-34, se evidencia que a medida que incrementa el esfuerzo de corte, la velocidad de corte también aumenta, sin embargo, la relación no es directamente proporcional y como consecuencia de ello, la emulsión es un material no newtoniano, en donde la viscosidad varía como una función de la velocidad de deformación (129).

Figura 2-34. Esfuerzo cortante (Pa) vs velocidad de corte (1/s).



Los perfiles típicos de los esfuerzos cortantes/velocidades de corte para fluidos no newtonianos, se ilustran en la Figura 2-35. Según se observa, el comportamiento de la emulsión corresponde preliminarmente a un fluido no newtoniano de tipo visco-plástico o pseudoplástico, dependiendo de su punto de corte en el eje del esfuerzo cortante.

Figura 2-35. Perfiles de esfuerzo cortante/velocidad de corte para fluidos no newtonianos. Tomado y modificado de Miner P (129).



La ecuación de potencia 2-10, describe la relación entre la velocidad de corte, el esfuerzo de corte y la viscosidad (129).

τ es el esfuerzo cortante (Pa)

$$\tau = KD^n$$

Ecuación 2-10

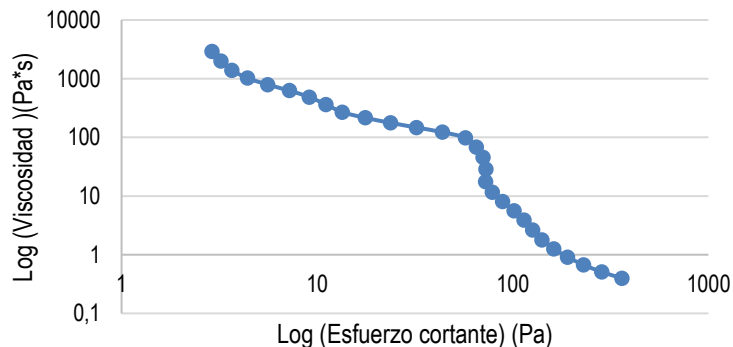
D es la velocidad de corte (Pa*s)

K y n son constantes de material

$n = 1/N$

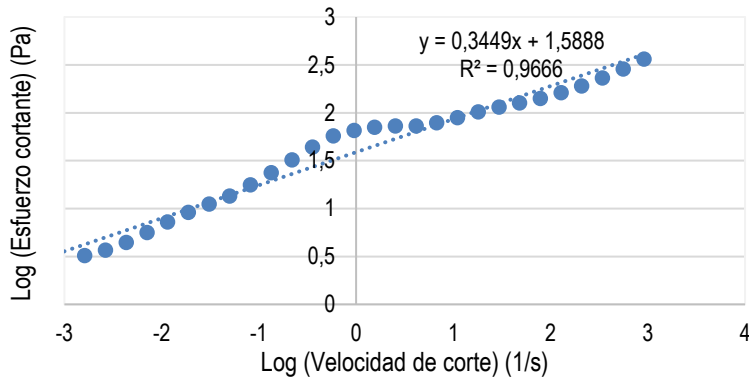
Para la emulsión final, la ecuación de potencia es $\tau = 38,797D^{0,3449}$. De acuerdo con lo anterior, n es 0,3449, y de la relación $n=1/N$ se obtiene que N es $\sim 2,9$. Si N es > 1 existe un adelgazamiento por cizallamiento, lo cual indica que la viscosidad disminuye bajo un esfuerzo cortante (129), tal y como se presenta en la emulsión acorde con la Figura 2-36.

Figura 2-36. Log (viscosidad) (Pa*s) vs Log (esfuerzo cortante) (Pa).



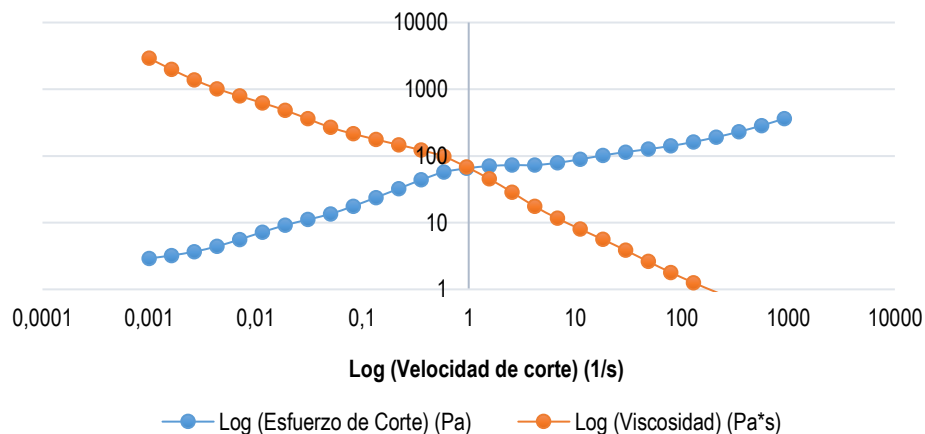
Adicionalmente, tras graficar los datos en escala logarítmica, se observa en la Figura 2-37 que se requiere de una fuerza mínima para que la emulsión empiece a moverse o deformarse, es decir, de un límite elástico.

Figura 2-37. Log (esfuerzo cortante) (Pa) vs Log (velocidad de corte) (1/s).



En este sentido, la emulsión es un material visco-plástico, puesto que presenta un comportamiento de adelgazamiento por cizallamiento, así como un punto de corte en el eje del esfuerzo cortante, los cuales se consideran como parámetros indicativos de los materiales visco-plásticos (129). La relación entre la viscosidad, el esfuerzo cortante y la velocidad de corte de la emulsión se presentan en la Figura 2-38.

Figura 2-38. Log (esfuerzo cortante) y del Log (viscosidad) (Pa*s) vs Log (velocidad de corte) (1/s).



Oscilación o amplitud

Se realizaron medidas oscilatorias de reología dinámica para evaluar las propiedades viscoelásticas de la emulsión (130). Un material elástico almacena y devuelve toda la energía que se le aplica, por el contrario, en materiales viscosos la energía suministrada

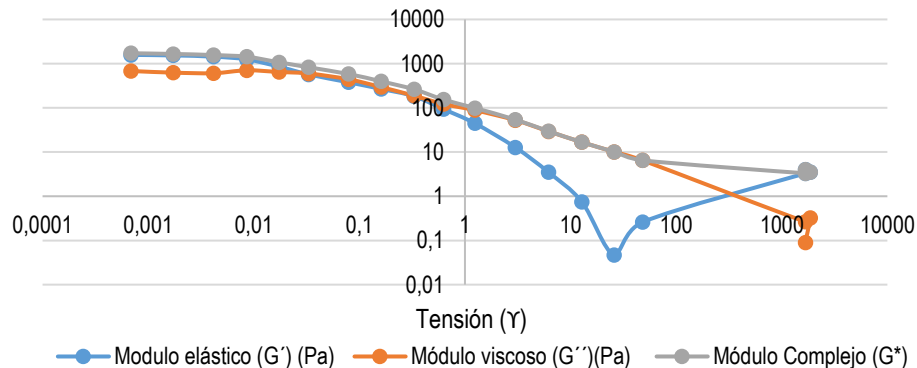
se absorbe y se pierde completamente. En la mayoría de los casos, fluidos reales presentan ambas propiedades y como consecuencia de ello, el comportamiento es viscoelástico (129). Mediante la variación de la amplitud u oscilación, se obtiene el módulo de almacenamiento o elástico (G'), el módulo de pérdida o viscoso (G'') y el módulo complejo (G^*). El módulo de almacenamiento G' es una medida de la energía almacenada elásticamente en el sistema, mientras que el módulo de pérdida G'' es una medida de la energía disipada como flujo viscoso, la suma de estos dos módulos proporciona el módulo complejo G^* (131).

En las mediciones realizadas, se obtienen los parámetros viscosos como función de la amplitud de tensión con el objeto de identificar las regiones lineales viscoelásticas. Los parámetros reológicos mencionados anteriormente permanecen constantes independiente de la amplitud, sin embargo, por encima de un valor crítico, estos cambian a medida que se incrementa la amplitud de tensión. En amplitudes por debajo del valor crítico, la estructura de la emulsión no es perturbada, una vez se esté por encima del valor crítico, la emulsión comienza a fluir y la deformación ya no es sinusoidal (130,131).

De acuerdo con la Figura 2-39, la región lineal viscoelástica se encuentra en valores de tensión aproximados de 0,001 y 0,01 en la escala logarítmica, por lo tanto, las mediciones viscoelásticas como función de la frecuencia se realizarán en esta región de amplitud de la tensión, ya que el sistema no presenta una perturbación apreciable de la estructura.

La prueba de oscilación o amplitud es empleada de forma exploratoria, pues el comportamiento viscoelástico de la emulsión se analiza al detalle con el ensayo de frecuencia, como se describirá a continuación (130,131).

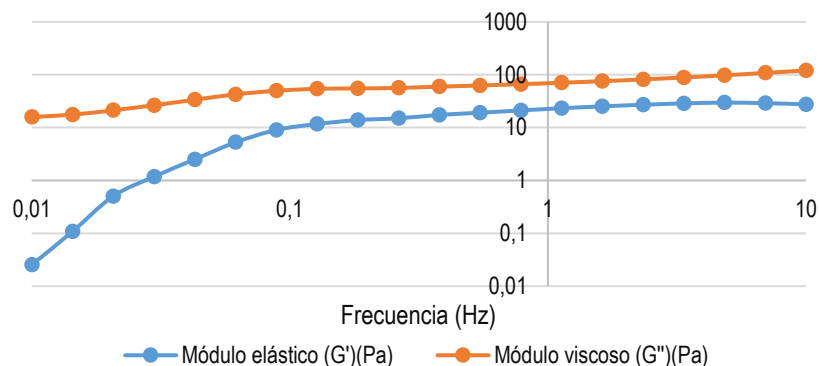
Figura 2-39. Parámetros viscoelásticos de la emulsión en prueba oscilatoria



Frecuencia

Después de determinar la máxima amplitud de la región lineal viscoelástica, la dependencia con la frecuencia es estudiada. La Figura 2-40 presenta los módulos de almacenamiento (G') y pérdida (G'') de la emulsión, según se observa, la emulsión tiene un estado semisólido, puesto que el módulo de pérdida o viscoso (G'') siempre es mayor que el módulo de almacenamiento o elástico (G') (132). La mayoría de las emulsiones evidencian el mismo comportamiento de la emulsión desarrollada, en el cual el módulo de almacenamiento (G') es inferior al módulo de pérdida (G'') (119). Además, es común que en las emulsiones los módulos sean cercanos y paralelos para todo el rango de frecuencia, cuyo comportamiento también se evidenció en este estudio (133).

Figura 2-40. Parámetros viscoelásticos de la emulsión en prueba de frecuencia.



De acuerdo con los resultados anteriores, la emulsión final es un fluido no newtoniano de tipo visco-plástico, dado que su viscosidad varía en función del esfuerzo cortante presentando un adelgazamiento por cizallamiento y un punto de corte en el eje del esfuerzo cortante. Al evaluar las propiedades viscoelásticas de la emulsión, se evidencia que en la curva de frecuencia predomina el módulo de pérdida por sobre el módulo de almacenamiento, por lo cual, la emulsión es más líquida que sólida y, por consiguiente, presenta un estado semisólido.

2.4.7 Estudio de estabilidad a corto y mediano plazo

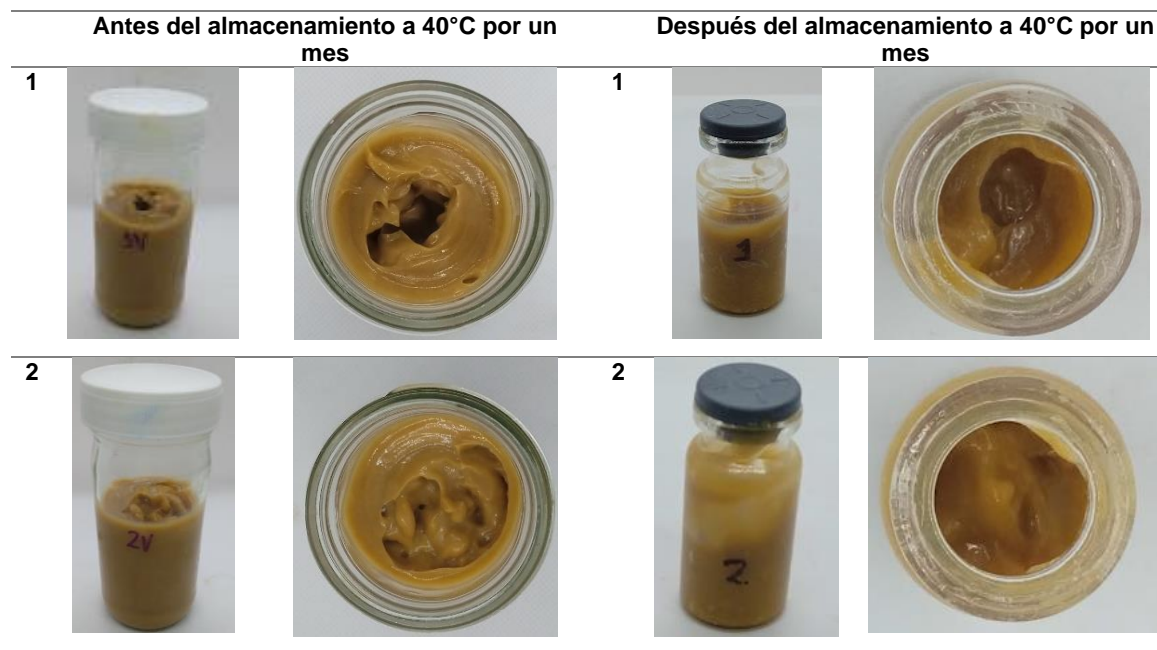
Los estudios de estabilidad acelerados o a corto plazo aumentan la tasa de degradación química o cambio físico de una sustancia o producto farmacológico mediante el uso de condiciones de almacenamiento exageradas. Los datos se pueden utilizar para evaluar los efectos a largo plazo en condiciones no aceleradas, así como el efecto que se produce

fuera de las condiciones de almacenamiento de la etiqueta (134), en el presente caso, el estudio de estabilidad acelerada consistió en someter a la emulsión a 40°C durante un mes.

En el estudio a mediano plazo, las emulsiones se sometieron a 30°C ± 2°C y 65% ± 5% de humedad relativa (HR) durante tres meses. Aunque el producto se debió almacenar a 40°C ± 2°C/75% HR ± 5% HR durante seis meses, y a 30°C ± 2°C /65%HR ± 5%HR durante seis meses (134), las pruebas realizadas se utilizaron como un punto de partida para evaluar la estabilidad física de las emulsiones en la etapa de formulación.

De acuerdo con los resultados obtenidos, en ninguna de las tres réplicas de la emulsión final se evidenció algún tipo de inestabilidad física durante el almacenamiento por un mes a 40°C y durante el almacenamiento por tres meses a 30°C ± 2°C y 65% ± 5% de humedad relativa, como se observa en la Tabla 2-18 y en la Tabla 2-19 respectivamente.

Tabla 2-18. Aspecto físico de las réplicas de la emulsión final recién preparadas y después de almacenarse a 40°C durante un mes.



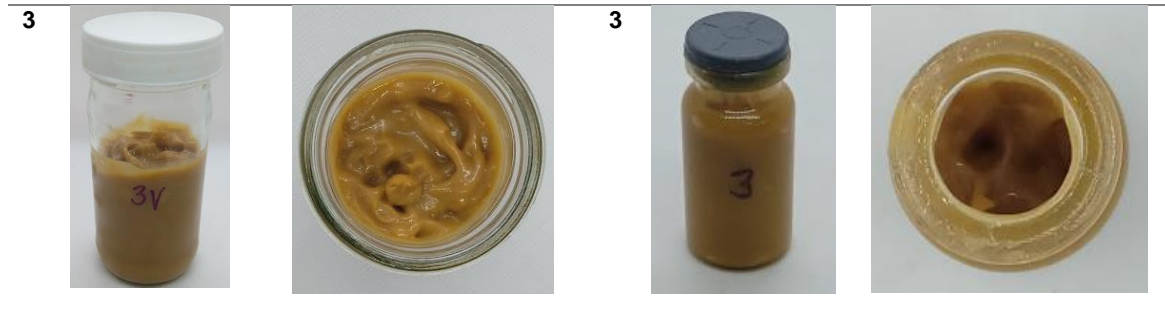


Tabla 2-19. Aspecto físico de las réplicas de la emulsión final recién preparadas y después de almacenarse a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ / $65\% \text{HR} \pm 5\% \text{HR}$ durante tres meses.

Antes del almacenamiento a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ / $65\% \text{HR} \pm 5\% \text{HR}$ por tres meses		Después del almacenamiento a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ / $65\% \text{HR} \pm 5\% \text{HR}$ por tres meses		
1				
2				
3				

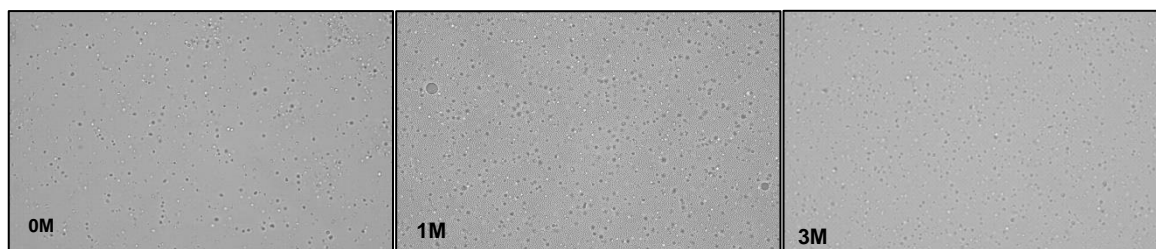
Las emulsiones también fueron evaluadas mediante el tamaño de gota $D_{4,3}$ y el span antes y después del almacenamiento a 40°C y $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ / $65\% \text{HR} \pm 5\% \text{HR}$, con el objeto de identificar algún cambio respecto a los valores iniciales. Los resultados obtenidos se

precisan en la Tabla 2-20 y las micrografías de las emulsiones se ilustran en la Figura 2-41.

Tabla 2-20. Tamaños de gota $D_{4,3}$ y span promedio de las réplicas de la emulsión final.

	Tiempo (0 meses)	40°C (1 mes)	30°C ± 2°C /65%HR ± 5%HR (3 meses)
Tamaño de gota $D_{4,3}$	1,45 μM ± 0,05 μM	1,97 μM ± 0,09 μM	1,46 μM ± 0,06 μM
Span	0,76 ± 0,04	0,78 ± 0,06	0,70 ± 0,02

Figura 2-41. Micrografías de la emulsión final antes y después de estudios de estabilidad a corto y mediano plazo. **0M:** Emulsión recién preparada, **1M:** Emulsión almacenada a 40°C por un mes, **3M:** Emulsión almacenada a 30°C ± 2°C /65%HR ± 5%HR por tres meses.



Respecto al estudio de estabilidad a corto plazo, se evidencia que, tras el almacenamiento de las emulsiones a 40°C durante un mes, ambos parámetros incrementaron con relación a sus valores iniciales. Lo anterior se relaciona con el aumento de la velocidad de coalescencia entre las gotas por un incremento de la temperatura, dado que temperaturas altas ocasionan una disminución de la viscosidad de la emulsión y un aumento del movimiento browniano de las gotas (135), con los cuales existe mayor probabilidad de que las velocidades de cremado o sedimentación se aceleren ocasionando fenómenos de coalescencia o floculación.

Referente al estudio de estabilidad a mediano plazo, se encuentra que las emulsiones almacenadas a 30°C ± 2°C /65%HR ± 5%HR por tres meses, no evidenciaron cambios importantes en sus tamaños de gota, por cuanto sus valores solo aumentaron en 0,01 μm ; en el caso del span, se demostró que bajo estas condiciones su valor disminuyó, lo cual es indicativo de una mayor estabilidad como se ha discutido con anterioridad.

Con base en lo anterior, es posible concluir que las emulsiones fueron estables físicamente durante el tiempo y bajo las condiciones de almacenamiento establecidas. Los resultados obtenidos no permiten inferir acerca de lo esto significaría en términos de vida útil del producto, dado que no se emplearon condiciones a escala industrial (77), ni pruebas para evaluar la estabilidad química de marcadores analíticos en la formulación a lo largo de los estudios.

2.5 Conclusiones

Se caracterizaron algunas propiedades fisicoquímicas de la panela, tales como el contenido de humedad, pH y perfil de azúcares. De acuerdo con los resultados obtenidos, las muestras de panela analizadas cumplen con los estándares requeridos de la Norma Técnica Colombiana NTC 1311, dado que contienen menos del 5% de humedad, máximo un 93% de azúcares totales como la sacarosa, y mínimo un 5% en los azúcares reductores glucosa y fructosa.

Mediante la realización de un ensayo de sensibilidad bacteriana se determinó que la concentración de panela a adicionar en la crema tópica desarrollada sería de 35g por 100g de la formulación. Dicha concentración reduce en al menos dos unidades logarítmicas las unidades formadoras de colonia (UFC) de las cepas evaluadas respecto al control de crecimiento.

Por medio de un diseño estadístico experimental exploratorio de bloques confundido se evaluó la influencia de los componentes de la formulación (porcentaje de aceite, porcentaje de alcoholes grasos, tipo de emulsificante, porcentaje de emulsificante) y de las condiciones de elaboración de las emulsiones (velocidad y tiempo de homogenización) en propiedades como la viscosidad, pH, tamaño de gota $D_{4,3}$ y span (variables respuesta). Se evidenció que el porcentaje de emulsificante, el porcentaje de aceite y la velocidad de homogenización, fueron los factores estadísticamente significativos para el tamaño de gota $D_{4,3}$ y el span como principales predictores de la estabilidad física a largo plazo, por lo cual se consideraron como las variables independientes para el desarrollo del diseño estadístico de optimización subsiguiente. El tipo de emulsificante seleccionado fue el

sistema de estearato de sorbitano con PEG100 estearato, el porcentaje de alcoholes se estableció como el 2% y el tiempo de homogenización en 20 minutos.

Con el diseño experimental de optimización 2^3 de dos repeticiones y cuatro puntos centrales se determinaron las mejores condiciones de los componentes, rangos de concentración y condiciones operacionales para la elaboración de la crema. De acuerdo con los resultados obtenidos, la emulsión final comprende 7,5% de aceite mineral, 2% de cada uno de los alcoholes grasos, 5% del emulsificante estearato de sorbitano con PEG100 estearato. La emulsión se prepara a una velocidad de homogenización de 5000 rpm y durante 20 minutos.

La emulsión desarrollada presenta una extensibilidad y adherencia adecuadas, es un fluido no newtoniano de tipo visco-plástico, en el que predomina el módulo de pérdida por sobre el módulo de almacenamiento. La emulsión demostró ser estable físicamente durante los ensayos de estabilidad física de corto y mediano plazo desarrollados.

3. Evaluación de la actividad cicatrizante

Para evaluar la actividad cicatrizante de la formulación final desarrollada, se realizó un diseño experimental con un modelo de herida por escisión en piel de rata, mediante el cual se determinó y comparó el cambio progresivo del área de contracción en heridas sin tratar y en heridas a las cuales se les aplicó la crema de panela, el vehículo del producto desarrollado sin la panela, o una crema de caléndula como control positivo.

Una vez finalizado el estudio, se evaluó por histopatología los tejidos de las heridas tratadas con la crema de panela, vehículo y control positivo, así como de las heridas a las que no se les aplicó ningún tratamiento (control negativo).

3.1 Materiales

Cloruro de sodio 0.9% (OORPAH, Lote 75205136, Colombia), ketamina (Imalgene® 1000), xilacina (Seton® 2%), crema de caléndula (Natural Freshly® 11% de extracto de flores de caléndula), panela pulverizada (Doña panela, Lotes: 071010 y 120522, Colombia), aceite mineral blanco (Ciacomeq S.A.S, Lote S385, Colombia), alcohol cetílico (Proquímicas JG, Lote 141115, Colombia), alcohol estearílico (Proquímicas JG, Lote 896584, Colombia), propilenglicol (Grado USP, ICN Biomedicals, Inc, Lote 3041B, EEUU), metilparabeno sódico (Disproalquímicos S.A., Lote 20120415, Colombia), propilparabeno sódico (Ciacomeq S.A.S, Lote 20200520, Colombia), Lipopeg 100-S (Vantage, Lote 378468, EEUU), Liposorb™ S (Vantage, Lote 16222052020, Lote L78ZB3, EEUU), formalina (10% en solución tamponada), fosfato de potasio monobásico (Merck, Lote AM0655773518, Alemania), cloruro de potasio (Chemi, Lote 160331-511, E.U), cloruro de sodio (J.T Baker, Lote t10c54, E.U), fosfato de sodio dibásico (Chemi, Lote 160331-512, E.U), hematoxilina, eosina.

3.2 Métodos

El presente trabajo fue avalado por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias, por medio del Acta 05 del 02 de mayo de 2022 (Anexo D). Los experimentos se realizaron siguiendo los principios éticos en el manejo de los animales de laboratorio.

3.2.1 Evaluación actividad cicatrizante en modelo de herida por escisión en piel de rata

Se emplearon 18 ratas Wistar macho, de 7 a 9 semanas de edad y con un peso inicial de 203 a 265g. Los animales fueron mantenidos en jaulas de acero inoxidable individualmente sobre piso enmallado con acceso libre a agua y alimento, bajo condiciones controladas de humedad y temperatura en el bioterio del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia.

- **Creación de las heridas de espesor total**

Las heridas de espesor total se realizaron con base en los protocolos establecidos por el grupo de investigación en “Principios Bioactivos en Plantas Medicinales” del Departamento de Farmacia de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia.

Los animales se anestesiaron vía intraperitoneal con una mezcla de ketamina (100 mg/Kg) y xilacina (15 mg/Kg) en solución salina estéril USP. Posteriormente, el dorso de los animales fue rasurado con máquina de afeitar eléctrica delimitando el área de escisión. Se generaron dos heridas por animal, contralaterales y paralelas con remoción completa de la epidermis y dermis mediante cuchillas quirúrgicas. Cada herida realizada tenía un área aproximada de 1 cm² y una profundidad de 2 mm (18).

Figura 3-1. Fotografía generación heridas por escisión.



▪ **Diseño experimental modelo herida por escisión**

Los animales fueron divididos en tres grupos experimentales de seis individuos (Figura 3-2). Cada subgrupo fue tratado con la crema de panela desarrollada, el vehículo del producto desarrollado sin panela o la crema de caléndula (patrón) durante 12 días, de acuerdo con la siguiente distribución:

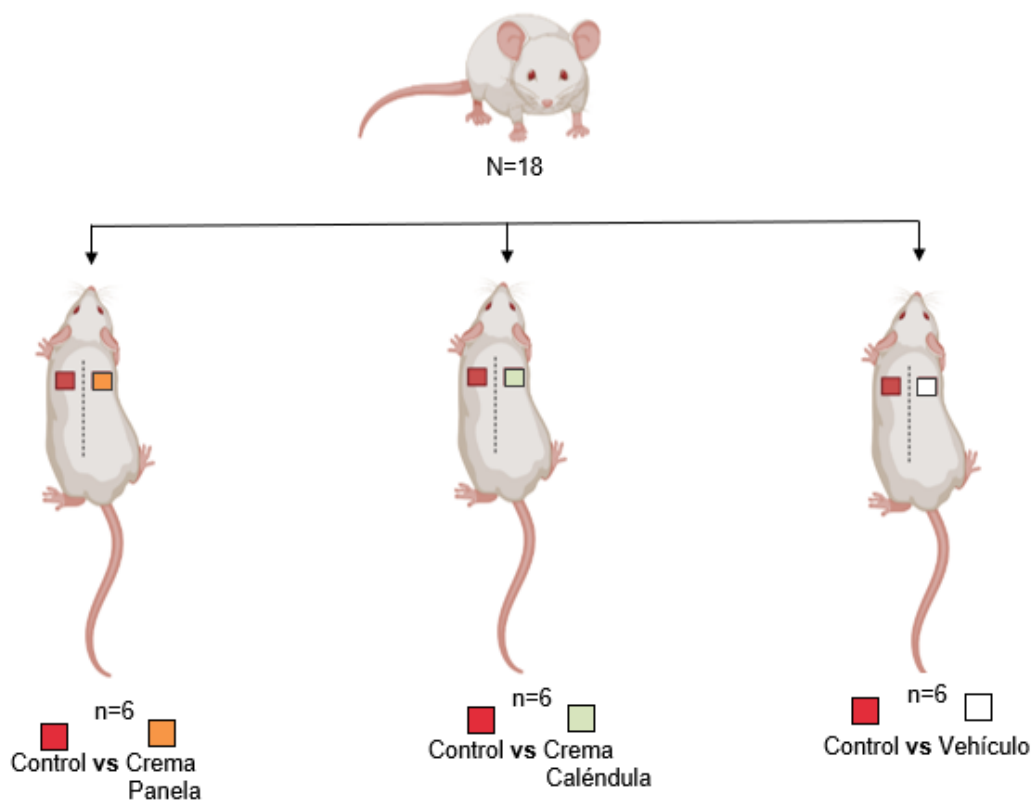
Subgrupo 1: Herida sin tratamiento (control negativo) vs herida tratada con crema de panela desarrollada.

Subgrupo 2: Herida sin tratamiento (control negativo) vs herida tratada con crema de caléndula Natural Freshly® (control positivo).

Subgrupo 3: Herida sin tratamiento (control negativo) vs herida tratada con vehículo.

En cada herida se adicionaron 100mg/sitio de cada una de las preparaciones (35 mg de panela/sitio; 11 mg del extracto de flores de caléndula/sitio; 100mg vehículo/sitio).

Figura 3-2. Diseño experimental: Distribución de las unidades experimentales.



- **Composición tratamientos aplicados:**

La crema de panela aplicada en las heridas de escisión total comprende por cada 100g de la formulación, 35g de panela. La composición cualicuantitativa y condiciones de preparación se encuentran descritas en el capítulo 2 del presente documento.

La crema de caléndula (Natural Freshly®) se seleccionó como patrón o control positivo, dado que es una preparación farmacéutica de plantas medicinales con actividad antiinflamatoria y cicatrizante aprobada por el INVIMA, con registro sanitario PFM2013-0002211. La crema de caléndula ha sido utilizada como patrón positivo en los estudios previos de cicatrización del Grupo de Investigación en “Principios Bioactivos en Plantas Medicinales”. Cada 100 g de formulación contienen 11000mg de extracto de flores de caléndula (*Calendula officinalis*).

Vehículo: El vehículo de la crema panela fue considerado como tercer tratamiento para evaluar la influencia de los excipientes de la formulación en el proceso de cicatrización sin la presencia de panela en el mismo. El vehículo comprende 7,5g de aceite mineral, 2g de alcohol cetílico, 2g de alcohol estearílico, 5g de emulsificante (estearato de sorbitano y PEG100 estearato), 5g de propilenglicol, 0,02 de propilparabeno sódico, 0,15 de metilparabeno sódico y agua en cantidad suficiente para completar 100g de formulación.

- **Evaluación de la contracción de las heridas**

Diariamente por 12 días se aplicaron 100 mg de las formulaciones en la herida derecha de los animales siguiendo el esquema de la Figura 3-2. Los animales fueron observados y monitoreados evaluando el cambio progresivo en el área de la herida por medio de fotografías tomadas después del día 3, 6, 9 y 12 de la aplicación del tratamiento, es decir, en los días 4, 7, 10 y 13 del estudio. El área fue calculada en cm² utilizando el programa Image J®.

Después de los días 3, 6, 9 y 12 de la aplicación del tratamiento, se estableció el porcentaje de contracción, el cual se obtuvo según la Ecuación 3-1 (18).

$$\% \text{Contracción} = \frac{\text{Área de la herida en tiempo 0} - \text{Área medida en tiempo } t}{\text{Área medida en el tiempo 0}} * 100 \quad \text{Ecuación 3-1}$$

Los datos del porcentaje de contracción de las heridas fueron analizados estadísticamente mediante un ANOVA de dos vías de medidas repetidas, seguido de una prueba t por pares con el método de corrección de pruebas múltiples de Bonferroni para realizar comparaciones entre los tratamientos y los días. Para la aplicación de las pruebas estadísticas realizadas, los siguientes supuestos se deben cumplir: no se presentan valores atípicos significativos, la varianza entre grupos es igual (esfericidad) y la distribución de los datos es aproximadamente normal (normalidad).

3.2.2 Evaluación histopatológica

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical al finalizar los 12 días de tratamiento. Posteriormente, en dos animales por cada subgrupo se realizaron cortes histológicos de espesor total en las heridas tratadas con la crema de panela, el vehículo y el control positivo. De manera similar se procedió con las heridas a las que no se les aplicó ningún tratamiento.

Las muestras fueron fijadas en una solución de formalina al 10% en PBS (pH 7,4 a 4°C durante 24 h) y teñidas con hematoxilina-eosina para evaluar mediante microscopía óptica en un microscopio óptico Nikon, modelo YTHS, Japón; la presencia de acantosis, atrofia, paraqueratosis, hipergranulosis, edema intracelular, pústulas subcorneales, hemorragia intraepitelial, hemorragia en la luz y úlceras en la epidermis. También se evaluó la pérdida de anexos, presencia de tejido de granulación, hemorragia subepitelial, infiltrado linfoplasmocitario difuso y nodular, infiltrado de neutrófilos, presencia de histiocitos, células gigantes, neutrófilos asociados a células gigantes y hemorragia en la dermis. En la hipodermis y tejido subcutáneo se determinó la presencia de neovascularización, de infiltrado difuso linfoplasmocitario, células mastocitos, células gigantes y hemorragia.

3.3 Resultados y discusión

3.3.1 Evaluación de la actividad cicatrizante en modelo de herida por escisión en piel de rata

Los datos se organizaron en cuatro grupos, en los cuales se evaluó si existían diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de contracción entre cada tratamiento y su

control negativo, evaluando a su vez la influencia del paso de los días y de la interacción entre los días y los tratamientos. Los grupos evaluados fueron los siguientes:

- Crema de panela (CP) vs control negativo de la crema de panela (CPC).
- Crema de caléndula (CC) vs control negativo de la crema de caléndula (CCC).
- Vehículo: crema sin panela (CSP) vs control negativo del vehículo (CSPC).
- Crema de panela (CP) vs crema de caléndula (CC) vs vehículo (CSP).

La generación de heridas “espejo” en cada animal tiene la ventaja de proveer un sitio de control en una posición anatómica similar al sitio experimental con relación a la localización y orientación (18). En el presente caso, la herida del costado derecho correspondía al tratamiento con la crema de panela, la crema de caléndula o el vehículo; y la herida del costado izquierdo a sus controles negativos, puesto que no se aplicaba ningún producto.

En todos los grupos evaluados, no se presentaron valores atípicos y los datos cumplían con los criterios de normalidad y esfericidad, por lo cual es posible aplicar el ANOVA de dos vías de medidas repetidas y la prueba t por pares con el método de corrección de pruebas múltiples de Bonferroni. Los resultados obtenidos para cada grupo se detallan a continuación.

- Crema de panela (CP) vs control negativo de la crema de panela (CPC)

El porcentaje de contracción promedio de las heridas de la crema de panela y de su control negativo se detallan en la Tabla 3-1.

Tabla 3-1. Porcentaje de contracción de heridas con la crema de panela (CP) y su control negativo (CPC).

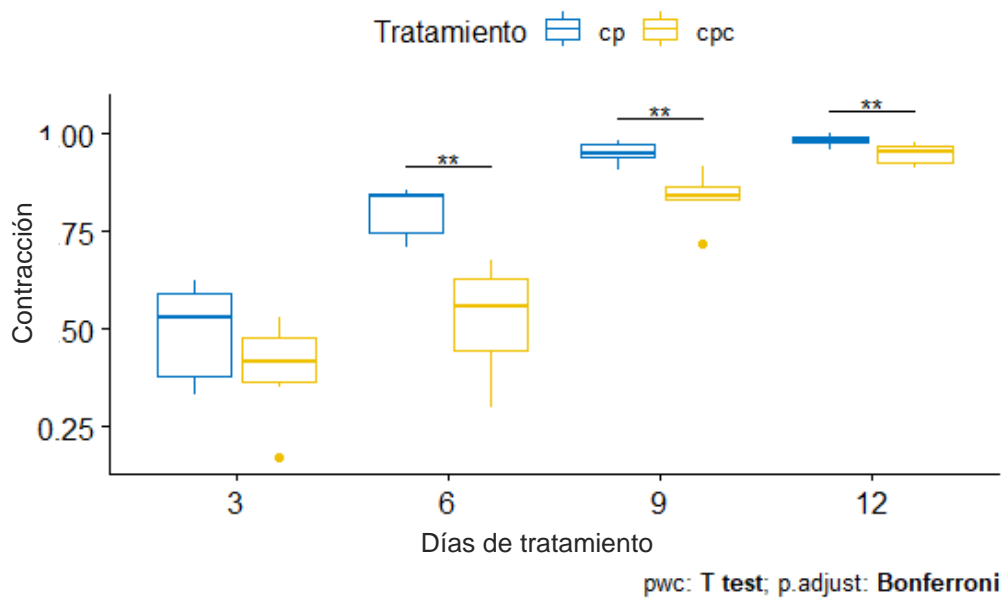
Tratamiento	Día 3	Día 6	Día 9	Día 12
	Porcentaje de contracción (%)	Porcentaje de contracción (%)	Porcentaje de contracción (%)	Porcentaje de contracción (%)
CP	49,2 ± 13,0	80,1 ± 7,0*	95,0 ± 2,8*	98,2 ± 1,5*
CPC	39,6 ± 12,8	52,6 ± 14,4	83,6 ± 6,6	94,7 ± 2,7

n=6 animales por tratamiento; *p<0,05 frente al control negativo CPC

Tras realizar el ANOVA correspondiente (Anexo C), se obtiene que el paso de los días, la aplicación de la crema de panela y la interacción de los días con los tratamientos son fuentes estadísticamente significativas para el porcentaje de contracción de las heridas realizadas ($p < 0,05$).

En la Figura 3-3, se ilustran los resultados obtenidos con la prueba t por pares del método de corrección de pruebas múltiples de Bonferroni. Según se observa, en todos los días la contracción siempre es mayor en las heridas a las que se les aplicó la crema de panela, presentándose una diferencia estadísticamente significativa respecto a las heridas sin tratar en los días 6, 9 y 12 ($p < 0,05$). Solo en el día 3, la diferencia de contracción no fue estadísticamente significativa entre la crema de panela y su control negativo.

Figura 3-3. Diagrama de cajas de la contracción de las heridas tratadas con crema de panela (CP) y su control negativo (CPC).



Ahora bien, con relación a los días, se obtuvo que a medida que pasa el tiempo, la contracción aumenta de forma estadísticamente significativa tanto para las heridas tratadas con la crema de panela, como para las heridas del control negativo (Figura 3-3).

Al realizar la comparación entre los días, únicamente el cambio en el porcentaje de contracción entre el día 3 y el día 6 no fue estadísticamente significativo para las heridas a las que no se les aplicó la crema de panela (control negativo). En el resto de los días, la contracción es superior y presenta significancia estadística tanto para la crema de panela, como para su control negativo con el transcurso del tiempo (Anexo C).

- Crema de caléndula (CC) vs control negativo de la crema de caléndula (CCC)

En Tabla 3-2 se presenta el promedio del porcentaje de contracción de las heridas tratadas con la crema de caléndula y las lesiones del control negativo.

Tabla 3-2. Porcentaje de contracción de heridas con la crema de caléndula (CC) y con su control negativo (CCC).

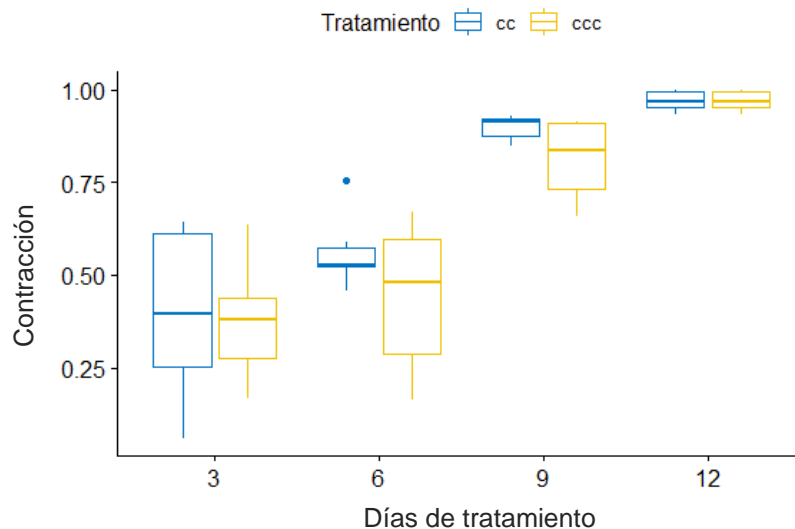
Tratamiento	Día 3	Día 6	Día 9	Día 12
	Porcentaje de contracción (%)	Porcentaje de contracción (%)	Porcentaje de contracción (%)	Porcentaje de contracción (%)
CC	39,6 ± 24,2	56,3 ± 10,3	89,9 ± 3,4	96,9 ± 2,7
CCC	37,7 ± 16,38	44,1 ± 20,7	81,2 ± 11,1	93,7 ± 2,0

n=6 animales por tratamiento

De acuerdo con los resultados obtenidos del análisis estadístico, únicamente los días tuvieron un efecto estadísticamente significativo en el porcentaje de contracción (Anexo C), dado que la diferencia de contracción entre las heridas tratadas con la crema de caléndula y su control negativo no fue estadísticamente significativa, pues como se observa en la Figura 3-4, las medianas de contracción entre las heridas tratadas con crema de caléndula y las lesiones de control negativo son muy cercanas.

Al comparar la contracción entre los días, se evidencia que hay un efecto estadísticamente significativo con el paso del tiempo, excepto para la contracción entre los días 3 y 6 (Anexo C).

Figura 3-4. Diagrama de cajas de la contracción de las heridas tratadas con crema de caléndula (CC) y su control negativo (CCC).



- Vehículo (CSP) vs control negativo del vehículo (CSPC)

En la Tabla 3-3 se especifica el porcentaje de contracción promedio de las heridas a las que se les aplicó el vehículo y las heridas de su control negativo.

Tabla 3-3. Porcentaje de contracción de heridas del vehículo (CSP) y su control negativo (CSPC).

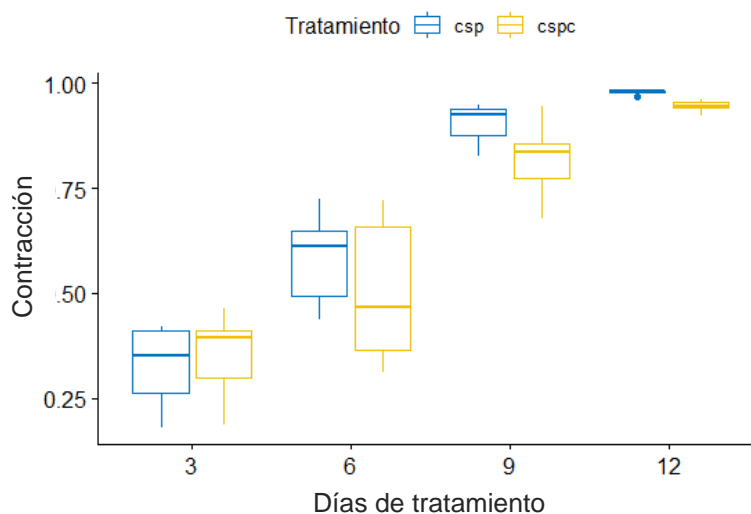
Tratamiento	Día 3	Día 6	Día 9	Día 12
	Porcentaje de contracción (%)	Porcentaje de contracción (%)	Porcentaje de contracción (%)	Porcentaje de contracción (%)
CSP	32,7 ± 10,0	58,3 ± 11,3	90,4 ± 5,0	97,9 ± 0,6
CSPC	35,4 ± 10,4	50,3 ± 17,7	81,8 ± 9,3	94,5 ± 1,3

n=6 animales por tratamiento

Conforme al ANOVA realizado (Anexo C), solo el paso de los días tiene un efecto estadísticamente significativo en el porcentaje de contracción, dado que no se presentan diferencias estadísticamente significativas entre el porcentaje de contracción de las heridas tratadas con el vehículo y las heridas de su control negativo.

Lo anterior puede contrastarse en la Figura 3-5, donde se hace evidente que la contracción aumenta de manera estadísticamente significativa solo por el paso de los días, ya que los cuartiles de contracción no difieren notoriamente entre las heridas tratadas con el vehículo y las heridas del control negativo. Además, mediante la prueba t por pares del método de corrección de pruebas múltiples de Bonferroni, se identificó que en todos los días las diferencias en los porcentajes de contracción presentan significancia estadística.

Figura 3-5. Diagrama de cajas de la contracción de las heridas tratadas con el vehículo (CSP) y su control negativo (CSPC).



- Crema de panela (CP) vs crema de caléndula (CC) vs vehículo (CSP).

Por último, se realizó la comparación del porcentaje de contracción entre la crema de panela, la crema de caléndula y el vehículo de la crema desarrollada sin la panela. Los porcentajes de contracción promedio de cada tratamiento se detallan en la Tabla 3-4.

Tabla 3-4. Porcentajes de contracción con la aplicación de la crema de panela (CP), crema de caléndula (CC) y vehículo (CSP).

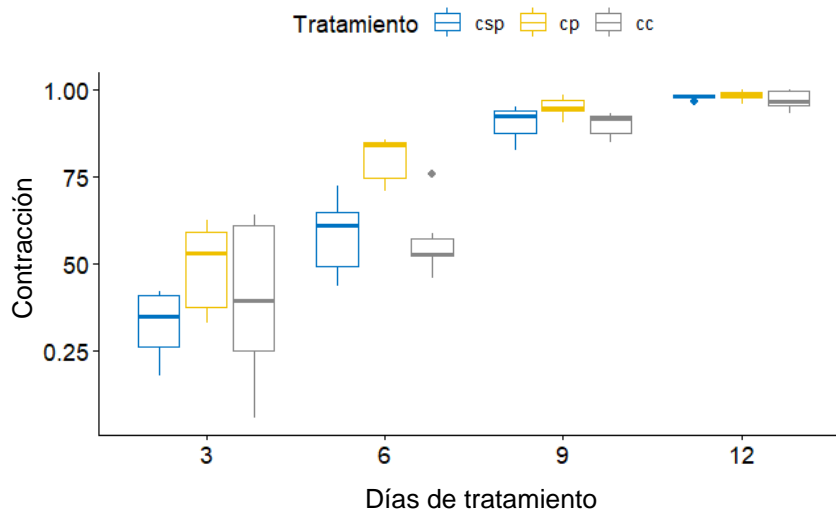
Tratamiento	Día 3	Día 6	Día 9	Día 12
	Porcentaje de contracción (%)	Porcentaje de contracción (%)	Porcentaje de contracción (%)	Porcentaje de contracción (%)
CP	49,2 ± 13,0*	80,1 ± 7,0*	95,0 ± 2,8*	98,2 ± 1,5*
CC	39,6 ± 24,2	56,3 ± 10,3	89,9 ± 3,4	96,9 ± 2,7
CSP	32,7 ± 10,0	58,3 ± 11,3	90,4 ± 5,0	97,9 ± 0,6

n=6 animales por tratamiento *p<0,05 frente a la crema de caléndula CC y el vehículo CSP

Una vez realizado el ANOVA, se evidencia que existen diferencias estadísticamente significativas entre los tres tratamientos y entre los días (Anexo C).

En la comparación entre tratamientos realizada, el porcentaje de contracción difiere de forma estadísticamente significativa entre el vehículo y la crema de panela; y entre la crema de panela y la crema de caléndula, con una mayor contracción en las heridas tratadas con la crema de panela, respecto a las lesiones del vehículo o de la crema de caléndula (Figura 3-6). A su vez, se obtiene que en todos los días existen diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de contracción, con mayores reducciones de las lesiones a medida que transcurre el tiempo.

Figura 3-6. Diagrama de cajas de la contracción de las heridas tratadas con el vehículo (CSP), la crema de panela (CP) y la crema de caléndula (CC).



Teniendo en cuenta los análisis previos, se encuentra que los días de tratamiento fueron un factor significativo en la reducción del área de todas las heridas evaluadas, dado que en los tres tratamientos y en sus controles negativos, la diferencia en la contracción siempre fue estadísticamente significativa con el paso de los días. Dicho resultado es esperado, considerando que la cicatrización de heridas es un proceso biológico para restaurar la estructura del tejido lesionado, en el cual se activan inmediatamente procesos complejos de migración, proliferación, de interacción y diferenciación celular, de síntesis de componentes de la matriz y de señalización, los cuales se llevan a cabo en un tiempo aproximado de 12 a 14 días con el cierre completo de la lesión en modelos animales como las ratas (136).

Referente a los tratamientos, se encuentra que la aplicación de la crema de panela en las heridas siempre evidencia valores mayores y bien diferenciados en la contracción de las lesiones respecto al vehículo y la crema de caléndula.


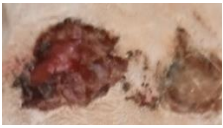
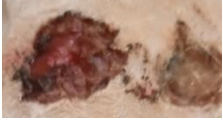



























La crema de panela y el vehículo presentan diferencias estadísticamente significativas en la contracción de las lesiones, obteniéndose una mayor reducción de área con la crema de panela. Lo anterior evidencia que la panela es la responsable de la actividad cicatrizante, toda vez que los componentes del vehículo no demostraron un cambio significativo en la reducción de las heridas respecto a aquellas a las cuales no se les aplicó el vehículo (control negativo del vehículo). En la literatura no se encontraron estudios de cicatrización realizados con la panela en modelos de herida por escisión en piel de rata, sin embargo, existen reportes relacionados con la sacarosa, en los cuales el azúcar disminuye el tiempo de cicatrización en las lesiones de piel de ratas con una epitelización fuerte y rápida a partir del día 4, presentándose un cierre total de la herida entre los días 8 y 14, así como con una maduración de la dermis grado III, la cual es indicativa de un mayor número de fibroblastos y colágeno (137); dichos resultados son consistentes con lo obtenido, ya que hasta después del día 3, la crema de panela demostró reducir el área de la herida, con un cierre casi completo en el día 12. Por otro lado, diversos estudios realizados en pacientes divulgan que la sacarosa estimula la formación de tejido de granulación y que la cicatrización comienza antes que el grupo control (26).

En el presente estudio, la crema de caléndula no demostró una diferencia significativa en la reducción del área respecto a su control negativo. Las flores de la *Calendula officinalis* han sido utilizadas medicinalmente para la cicatrización de heridas debido a las

propiedades antiinflamatorias de sus componentes, en particular, de los triterpenos como los ésteres de faradiol y taraxasterol (138). La caléndula también incrementa la síntesis de tejido conectivo (colágeno), inhibe enzimas proteolíticas, y presenta actividad antioxidante y antimicrobiana atribuida a compuestos fitoquímicos como los carotenoides y flavonoides (139). Aunque el uso de preparados a base de flores de caléndula tiene una larga tradición, los datos sobre la eficacia y los compuestos efectivos son heterogéneos y aún son objeto de debate, los datos clínicos respaldan varias propiedades, sin embargo, dicha evidencia es débil y justifica una mayor investigación mediante ensayos clínicos más rigurosos (140). En el presente estudio, la aplicación de la crema de caléndula no demostró reducciones en el área de las lesiones, por lo que en investigaciones posteriores sería recomendable emplear un control positivo con mayor soporte y evidencia.

En la Tabla 3-5, se presenta el registro fotográfico de las heridas tratadas con la crema de panela, la crema de caléndula, el vehículo (herida derecha), y sus respectivos controles negativos (herida izquierda). En el seguimiento realizado, las heridas se mantuvieron limpias, y no presentaron signos visibles de procesos infecciosos o zonas necróticas, ni exudados.

Tabla 3-5. Seguimiento fotográfico del área de las heridas

Día 0		Día 3		Día 6		Día 9		Día 12	
Crema de panela									
CPC	CP	CPC	CP	CPC	CP	CPC	CP	CPC	CP
									
Crema de caléndula									
CCC	CC	CCC	CC	CCC	CC	CCC	CC	CCC	CC
									
Vehículo									
CSPC	CSP	CSPC	CSP	CSPC	CSP	CSPC	CSP	CSPC	CSP
									

CP: crema de panela; **CPC:** control negativo de la crema de panela; **CC:** crema de caléndula; **CCC:** control negativo de la crema de caléndula; **CSP:** vehículo control; **CSPC:** control negativo del vehículo

Como se observa, el área se reduce notoriamente en las heridas a las cuales se les aplicó la crema de panela (CP). Las fotografías de la crema de caléndula y del vehículo evidencian que no existe una diferencia notable entre el área de las heridas tratadas con la crema de caléndula (CC) o el vehículo (CSP) y las lesiones de sus respectivos controles negativos (CCC; CSPC). Todos los grupos evaluados demostraron una reducción importante en el área de las heridas con el transcurso del tiempo.

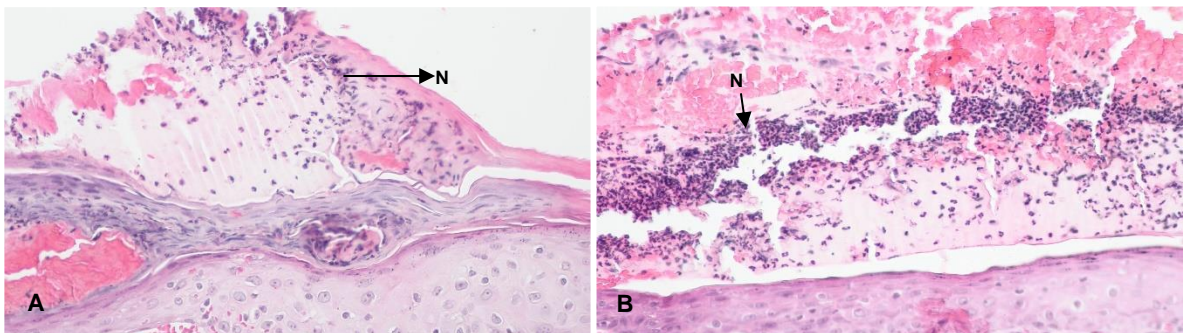
3.3.2 Estudio histopatológico

En el estudio realizado se evaluó cualitativamente la apariencia histológica de los tejidos cicatrizales tomados de los grupos experimentales después del día 12 de tratamiento.

En la epidermis se encuentra que no se presentan diferencias grandes en la parequitosis, hipergranulosis, edema intracelular y hemorragia intraepitelial de los tejidos analizados. La acantosis es variable y leve en los tejidos a los cuales se les aplicó la crema de panela, la crema de caléndula o el vehículo, sin embargo, no se presenta acantosis en los controles negativos, por lo cual existe una reacción del epitelio para regenerarse en las muestras de los tratamientos.

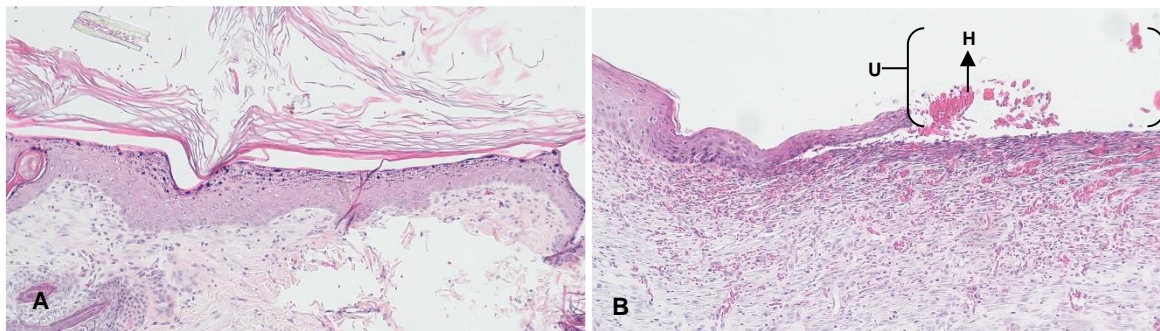
Se observan pústulas subcorneales leves en una muestra del vehículo, y severas en un tejido del control negativo, lo cual es indicativo de una reacción inflamatoria, ya que en las pústulas se presenta un infiltrado de neutrófilos y eosinófilos ocasionales por la presencia de factores quimiotácticos en la epidermis superior (141)(Figura 3-7).

Figura 3-7. Vista microscópica de tejido de cicatrización después de los 12 días. **A:** Pústula subcorneal con neutrófilos (**N**) en vehículo (20x) **B:** Pústula subcorneal severa con neutrófilos (**N**) en control negativo (20x).



En los tejidos tratados con la crema de panela, la crema de caléndula e inclusive con el vehículo se indujo re-epitelización, sin embargo, en el control negativo de la cicatrización natural, la re-epitelización no se presenta completamente, pues se observa una úlcera externa con evidente hemorragia en la luz para los dos controles negativos evaluados (Figura 3-8).

Figura 3-8. Vista microscópica de tejido de cicatrización después de los 12 días. **A:** Epitelio normal en control negativo (10x) **B:** Epitelio con úlcera (**U**) y hemorragia a la luz (**H**) (10x).



Con relación a la dermis, se evidenció que en todas las muestras existe tejido de granulación y pérdida de anexos. En una de las muestras del vehículo y en los dos controles negativos se presentan hemorragias subepiteliales (Figura 3-9).

Figura 3-9. Vista microscópica de tejido de cicatrización después de los 12 días. **A:** Tejido de granulación en crema de panela (4x) **B:** Tejido de granulación en crema de caléndula con adelgazamiento leve de la epidermis (**AE**) (4x) **C:** Tejido de granulación en vehículo y hemorragia subepitelial (**H**) (4x) **D:** Tejido de granulación en control negativo y hemorragia subepitelial (**H**) (4x).

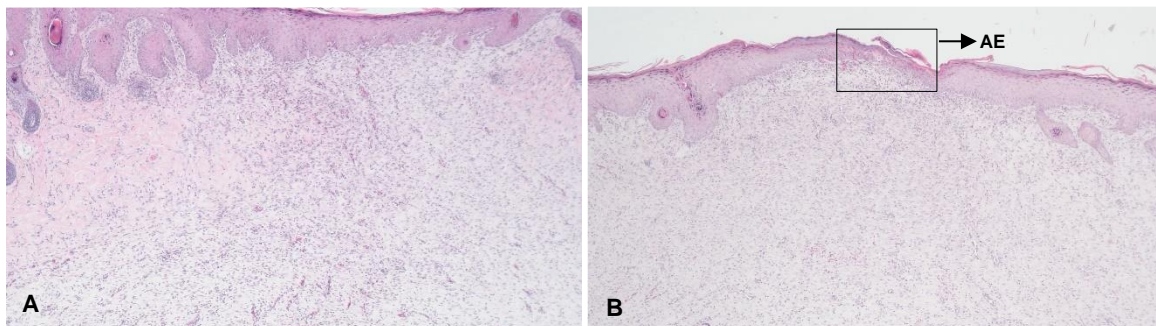
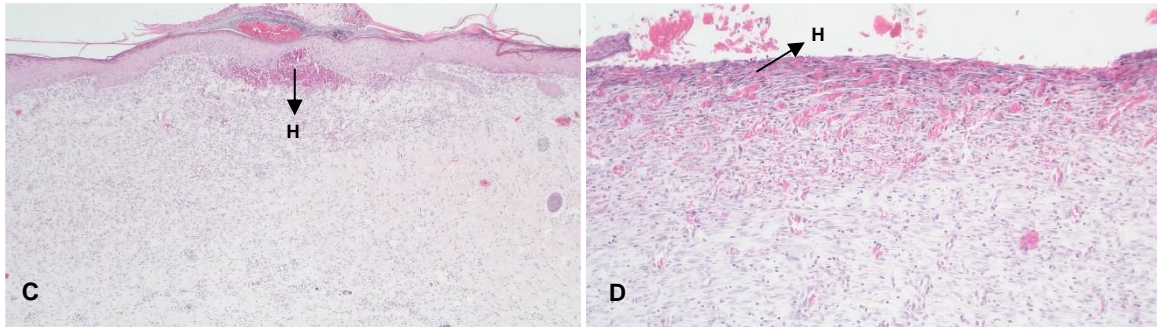
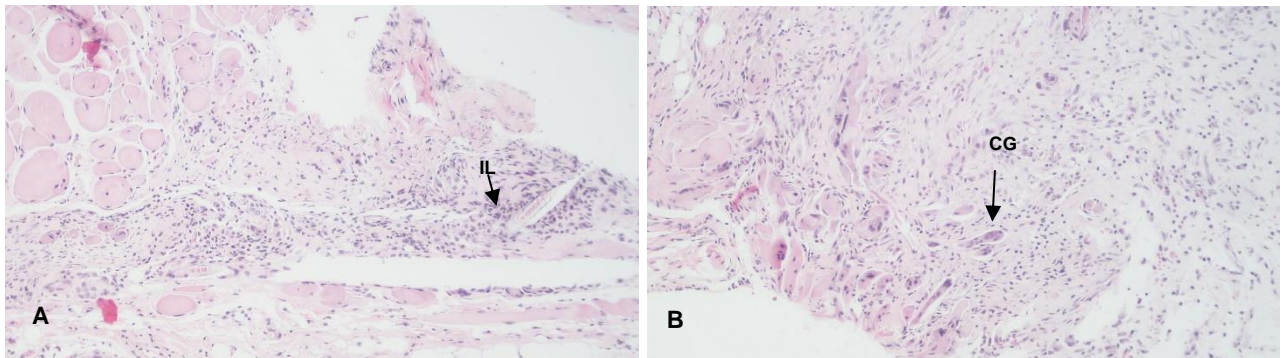


Figura 3-9. Vista microscópica de tejido de cicatrización después de los 12 días. **A:** Tejido de granulación en crema de panela (4x) **B:** Tejido de granulación en crema de caléndula con adelgazamiento leve de la epidermis (**AE**) (4x) **C:** Tejido de granulación en vehículo y hemorragia subepitelial (**H**) (4x) **D:** Tejido de granulación en control negativo y hemorragia subepitelial (**H**) (4x).



En los tejidos de la crema de caléndula se identifica un infiltrado linfoplasmocitario difuso de linfocitos y células plasmáticas, así como células gigantes multinucleadas presentes en diversas afecciones inflamatorias o en reacciones a cuerpo extraño (142) (Figura 3-10).

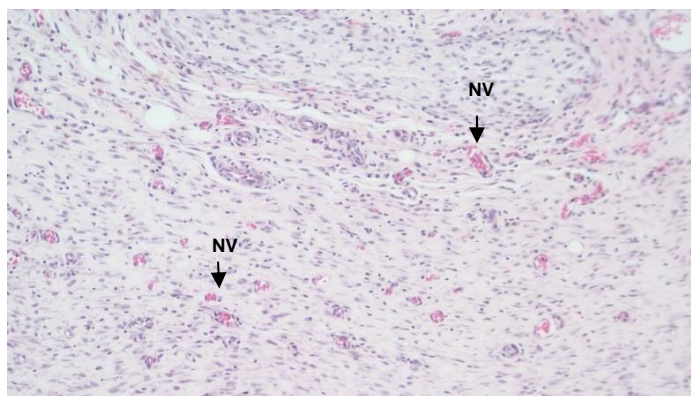
Figura 3-10. Vista microscópica de tejido de cicatrización después de los 12 días. **A:** Infiltrado linfoplasmocitario (**IL**) difuso en crema de caléndula (10x) **B:** Células gigantes (**CG**) en crema de caléndula (10x).



Los cortes histológicos de la crema de panela presentan una neovascularización moderada con un mayor número de vasos sanguíneos que el vehículo y control negativo (Figura 3-11). Este es un resultado favorable, ya que el crecimiento de nuevos capilares favorece la formación de tejido de granulación, oxigenación, transporte de micronutrientes en los

tejidos en crecimiento y eliminación de productos de desecho catabólicos para el cierre y cicatrización de las heridas (143).

Figura 3-11. Vista microscópica de tejido de cicatrización de crema de panela después de los 12 días con neovascularización moderada (**NV**)(10x).



En general las lesiones epiteliales de todos los tejidos fueron variables y leves, a excepción de los tejidos cicatrizales de los controles negativos, en los cuales se evidenció la presencia de pústulas subcorneales, neutrófilos, úlceras y hemorragias. De forma preliminar, se encuentra que la aplicación de la crema de panela estimuló la formación de tejido de granulación y de procesos de neovascularización, sin la presencia de hemorragias subepiteliales y pústulas subcorneales en los tejidos evaluados, no obstante, se considera que es necesario incluir un mayor número de muestras histológicas de los grupos tratados durante las diferentes etapas del proceso de cicatrización para la obtención de resultados más robustos y concluyentes.

3.4 Conclusiones

Mediante la realización de los ensayos *in vivo* de cicatrización, se evidenció que la aplicación de la crema de panela en las lesiones genera una diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de contracción respecto a las heridas no tratadas en los días 6, 9 y 12 del tratamiento, proporcionando una mayor reducción en el área de las lesiones realizadas.

Las heridas tratadas con la crema de caléndula y el vehículo no evidenciaron cambios estadísticamente significativos en el porcentaje de contracción frente a las lesiones de sus controles negativos.

Los días siempre fueron un factor estadísticamente significativo en el porcentaje de contracción de las heridas tratadas y de control negativo, dado que los individuos activan inmediatamente y de forma espontánea procesos biológicos para restaurar la estructura de los tejidos lesionados en un tiempo aproximado de 12 a 14 días.

Se realizó la comparación del porcentaje de contracción entre las heridas tratadas con la crema de panela, el vehículo y una crema de caléndula empleada como control positivo. A partir de los resultados obtenidos, la aplicación de la crema de panela en las heridas siempre evidencia valores mayores y bien diferenciados en la contracción de las lesiones respecto al vehículo, por lo tanto, la panela es la responsable de la actividad cicatrizante en la formulación, toda vez que el vehículo no demostró diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de contracción con relación a su control negativo.

Mediante la evaluación histológica de los tejidos, se encontró que la aplicación de la crema de panela estimuló la formación de tejido de granulación y de procesos de neovascularización, sin la presencia de hemorragias subepiteliales y pústulas subcorneales en los tejidos analizados.

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

Mediante el desarrollo de diseños estadísticos experimentales se determinó la influencia del tipo de emulsificante, del porcentaje de emulsificante, del porcentaje de alcoholes grasos, del porcentaje de aceite, de la velocidad y tiempo de homogenización en características como la viscosidad, pH, tamaño de gota y span.

Los diseños estadísticos experimentales implementados permitieron optimizar los niveles de concentración de los componentes y de las condiciones operacionales evaluadas, dado que la formulación final derivada del análisis del diseño estadístico de optimización fue la que obtuvo el menor tamaño de gota $D_{4,3}$ y la distribución más estrecha de todas las emulsiones preparadas.

La emulsión final comprende 7,5% de aceite mineral, 2% de cada uno de los alcoholes grasos, 5% del emulsificante estearato de sorbitano con PEG100 estearato, y se prepara a una velocidad de homogenización de 5000 rpm durante 20 minutos.

Los ensayos de cicatrización de herida por escisión en piel de rata permitieron comprobar si la aplicación de la crema de panela presentaba una diferencia estadísticamente significativa, en comparación al porcentaje de contracción de las heridas del control negativo (cicatrización natural). Según lo obtenido, la aplicación de la crema de panela en las lesiones genera una diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de contracción respecto a las heridas no tratadas en los días 6, 9 y 12 del tratamiento, presentando una mayor reducción en el área de las lesiones evaluadas.

Mediante estudios de histopatología se evidenció que la aplicación de la crema de panela estimuló la formación de tejido de granulación y de procesos de neovascularización, sin la presencia de hemorragias subepiteliales y pústulas subcorneales en los tejidos evaluados

El presente trabajo de investigación permitió desarrollar a escala laboratorio, una formulación de crema tópica a partir de panela. Dicha formulación demostró actividad cicatrizante, dado que redujo de manera significativa el porcentaje de contracción de las lesiones en un modelo *in vivo* de herida por escisión en piel de rata.

4.2 Recomendaciones

Se sugiere la determinación del contenido de los azúcares de la panela en la formulación final mediante el desarrollo de una metodología analítica validada que permita su cuantificación y trazabilidad en los estudios de estabilidad de corto y mediano plazo implementados.

Es recomendable evaluar diferentes concentraciones de panela en los ensayos de cicatrización *in vivo* con el objetivo de identificar el rango de concentraciones óptimo para el cierre de las lesiones generadas.

Se propone realizar los estudios histológicos con un mayor número de muestras y en diferentes puntos de tiempo para identificar el efecto de la panela en las diferentes etapas del proceso de cicatrización.

Se sugiere realizar la transferencia tecnológica del proceso de elaboración de la crema de panela con la industria farmacéutica, para que su desarrollo a escala industrial pueda influir positivamente en el bienestar de los pacientes, así como en aspectos económicos, sociales y culturales de las industrias locales paneleras y del sector farmacéutico.

A. Anexo: Validación de la metodología analítica para la cuantificación de sacarosa, glucosa y fructosa en panela

Para cuantificar los principales marcadores analíticos en la panela, se realizaron las determinaciones de las características de desempeño: selectividad, linealidad, precisión, exactitud, límites de cuantificación y detección, siguiendo las directrices establecidas por la conferencia Internacional de armonización (ICH) guía Q2 (R1). Se empleó el procedimiento de adición de estándar sobre la panela para la elaboración de las curvas de calibración del método, dado que no fue posible obtener una matriz de la panela sin los analitos (sacarosa, glucosa y fructosa).

1. Condiciones cromatográficas:

Se utilizó un cromatógrafo Thermo Dionex Ultimate 3000 (*Sunnyvale, CA*) equipado con un detector de índice de refracción (IR), una columna WaterSugar Pak 300 (300 mm x 7,8 mm, 9 μ m), temperatura isocrática de 80°C. Como fase móvil se utilizó agua desionizada, la velocidad de flujo se mantuvo constante a 0,5 mL/min, el volumen de inyección fue de 20 μ L y el tiempo de análisis fue de 15 minutos. Cada solución fue filtrada previo al análisis, a través de una membrana de 0,45 μ m.

2. Soluciones de trabajo:

Solución madre mezcla: Se pesó y transfirió exactamente 1g del estándar de sacarosa, 0,1g de fructosa y 0,1g de glucosa a un balón aforado de 10ml. Posteriormente se agregaron 10ml de agua purificada obteniéndose concentraciones de 100 mg/ml de sacarosa, 10 mg/ml de fructosa y 10 mg/ml de glucosa (SM).

Soluciones de estándares:

A partir de la solución madre (SM) se realizaron diluciones para obtener 5 niveles de concentración con el sistema y método. El rango de concentraciones se encontró entre 2 – 20 mg/ml para la sacarosa y de 0,2 – 2 mg/ml para la fructosa y glucosa.

Solución madre panela:

Se pesó y transfirió exactamente 0,2g de panela a un balón aforado de 10ml. Posteriormente se agregaron 10ml de agua purificada obteniéndose una concentración de 20 mg/ml de panela (SMP).

Solución panela adicionada a soluciones de estándares:

Para las curvas de calibración del método, a partir de la solución madre panela (SMP) se realizaron diluciones para obtener una concentración de 2 mg/ml de panela en cada uno de los niveles de concentración de los estándares de sacarosa, glucosa y fructosa.

3. Características de desempeño:**Selectividad:**

La selectividad se evaluó a través de la comparación de las pendientes entre las curvas del sistema y método por medio del estadístico t Student. Si las curvas son paralelas dentro de la incertidumbre experimental, se demuestra que el método es selectivo, ya que el efecto de la matriz sobre la respuesta instrumental es producido únicamente por la presencia del analito en la misma.

El estadístico t experimental fue calculado según la ecuación:

$$t_{exp} = \frac{|bs - bm|}{sp \sqrt{\frac{1}{\sum (cis - \hat{c}s)^2} + \frac{1}{\sum (cim - \hat{c}m)^2}}} \quad \text{Ecuación A-1}$$

bs: Pendiente curva sistema

bm: Pendiente curva método

sp: Desviación estándar agrupada de la regresión del sistema y método

cis: Concentración de estándar usada en el sistema

Ĉs: Promedio de las concentraciones usada en el sistema

cim: Concentración de estándar usada en el método

Ĉm: Promedio de las concentraciones usada en el método

Linealidad

Para las curvas del sistema y método, partiendo de tres SM se prepararon soluciones por triplicado de 2, 6, 10, 15 y 20 mg/mL de sacarosa y de 0,2, 0,6, 1, 1,5 y 2 mg/ml de glucosa y fructosa. Adicionalmente, cada una de las soluciones del método presentaban una concentración de 2 mg/ml de panela.

El análisis de la pendiente e intercepto se realizó por medio del estadístico t de Student, y la regresión fue evaluada a través del análisis de varianza (ANOVA). Tanto para el estadístico t Student como para el ANOVA, la probabilidad seleccionada fue del 95%.

Precisión

La evaluación de la precisión fue llevada a cabo a tres niveles de concentración: 2, 10, 20 mg/ml de sacarosa y 0,2, 1,0, 2,0 mg/ml de glucosa y fructosa para el sistema y método.

En el caso de la *repetibilidad* (niveles intradías) se prepararon por triplicado cada uno de los niveles de concentración, con el mismo analista, equipo y día. La repetibilidad se evaluó con la prueba de Cochran (probabilidad del 95%) y en términos del coeficiente de variación promedio ponderado (RSDp), el cual tiene como criterio de aceptación un RSDp ≤ 5%.

Para la *precisión intermedia* (niveles interdía) se prepararon por triplicado cada uno de los niveles de concentración, con un analista y en tres días diferentes. Esta se evaluó mediante un análisis de varianza (ANOVA), asumiendo un nivel de confianza del 95%.

Exactitud

Se prepararon por triplicado soluciones de concentración 2, 10 y 20 mg/mL de sacarosa y de 0,2, 1,0 y 2,0 mg/mL de glucosa y fructosa, estas se evaluaron en agua purificada y en una solución de panela de 2mg/ml. Adicionalmente se preparó una solución de panela de 2mg/ml en agua.

La exactitud se expresa como el porcentaje de recuperación calculado de acuerdo con la Ecuación A-2. El análisis correspondiente se realizó por medio del estadístico t Student, asumiendo un nivel de confianza del 95%.

$$\%R = \frac{\text{Área Sln Estándar en Sln de Panela} - \text{Área Sln Estándar en agua}}{\text{Área Sln de Panela}} * 100$$

Ecuación A-2

Límites de detección y cuantificación:

En la determinación de los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) se prepararon nueve curvas de calibración del método y el sistema, en el rango de 2 a 20 mg/ml de sacarosa y de 0,2 – 2 mg/ml de glucosa y fructosa. El límite de detección (Ecuación A-3) y el límite de cuantificación (Ecuación A-4) fueron calculados con base en la desviación estándar de los interceptos de las líneas de regresión (S_a) y de la pendiente (b) de la curva de calibración del método y sistema respectivamente

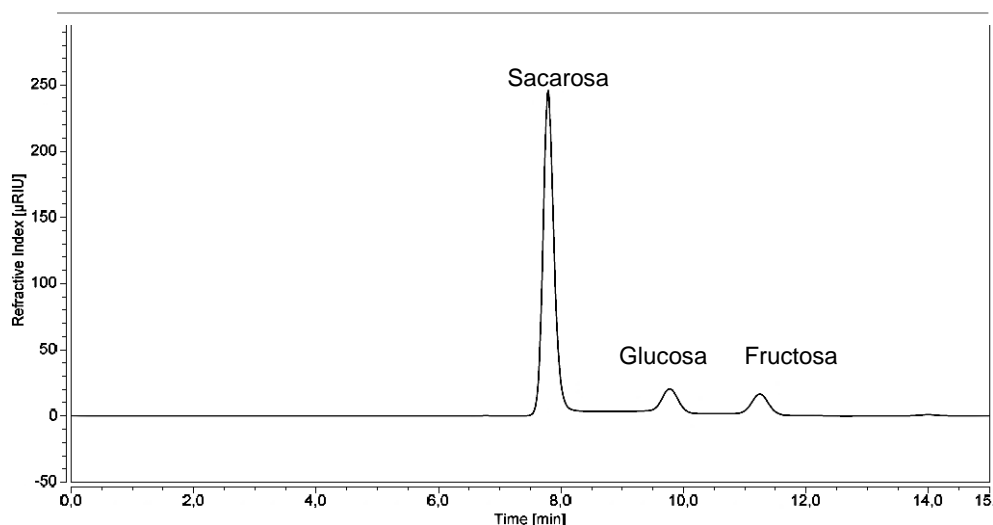
$$LOD = \frac{3b}{S_a} \quad \text{Ecuación A-3}$$

$$LOQ = \frac{10b}{S_a} \quad \text{Ecuación A-4}$$

Resultados

El tiempo de retención para los estándares de los azúcares utilizados fue de 7,788 minutos para la sacarosa, de 9,773 minutos para la glucosa y de 11,247 minutos para la fructosa, el perfil cromatográfico se ilustra en la Figura A-1.

Figura A-1. Perfil cromatográfico de estándares de sacarosa 10 mg/ml, glucosa 1 mg/ml y fructosa 1 mg/ml.



Selectividad

Como se observa en las Tablas A-1, A-2 y A-3. La metodología es selectiva para la sacarosa, glucosa y fructosa, ya que no existe diferencia significativa entre las pendientes de las curvas del sistema y método ($t_{exp} < t_{tab}$). Por lo tanto, el efecto de la panela sobre la respuesta instrumental (área) es producido únicamente por los analitos, sin ningún interferente adicional a los azúcares evaluados.

- **Selectividad sacarosa**

Tabla A-1. Parámetros estadísticos t student para la evaluación de la selectividad de sacarosa en el sistema y método

Parámetro		Hipótesis Nula (Ho)	S ² regresión	Sp	t _{exp}	t _{tab(26; 0,05)}
Sistema	Pendiente (bs)	bs = bm	3214,2756	56,5154	0,0206	2,0555
Método	Pendiente (bm)		3173,7081			

- **Selectividad glucosa**

Tabla A-2. Parámetros estadísticos t student para la evaluación de la selectividad de glucosa en el sistema y método

Parámetro		Hipótesis Nula (Ho)	S ² regresión	Sp	t _{exp}	t _{tab(26; 0,05)}
Sistema	Pendiente (bs)	bs = bm	35,7769	6,0126	0,0356	2,0555
Método	Pendiente (bm)		36,5250			

- **Selectividad fructosa**

Tabla A-3. Parámetros estadísticos t student para la evaluación de la selectividad de fructosa en el sistema y método

Parámetro		Hipótesis Nula (Ho)	S ² regresión	Sp	t _{exp}	t _{tab(26; 0,05)}
Sistema	Pendiente (bs)	bs = bm	34,6132	5,9212	0,0433	2,0555
Método	Pendiente (bm)		35,5090			

Linealidad

De acuerdo con los datos obtenidos a través del estadístico t Student, se concluye que existe correlación entre las concentraciones de todos los azúcares y el área medida ($t_{exp} > t_{tab}$) para el sistema y el método. A su vez, las pendientes son estadísticamente diferentes de cero pues de manera análoga, el t_{exp} es mayor al t_{tab} .

Por otro lado, el intercepto no es diferente de cero en las curvas del sistema para los tres azúcares debido a que el t_{exp} es menor al t_{tab} . Sin embargo, en las curvas de calibración del método, únicamente la sacarosa presenta un intercepto distinto de cero ($t_{exp} < t_{tab}$), lo cual puede ser atribuido al procedimiento de adición estándar, en donde aunque no se añade estándar de sacarosa a la matriz (panela), la matriz por si sola presenta una respuesta instrumental en el área, dado que no es posible obtenerla sin el analito, por lo tanto, es coherente que el intercepto sea diferente de cero pues la concentración de sacarosa en la matriz (panela) se encuentra entre el 80 y 90%.

En el análisis de varianza para evaluar la regresión y dispersión de los datos entre las réplicas para los diferentes niveles de concentración, se obtuvo que, respecto a la regresión, esta es significativa pues el $F_o > F_{tab}$. De manera complementaria, no existe un desvío significativo de la linealidad ya que el $F_o < F_{tab}$.

- **Linealidad sacarosa**

Figura A-2. Curva de calibración sacarosa (Sistema)

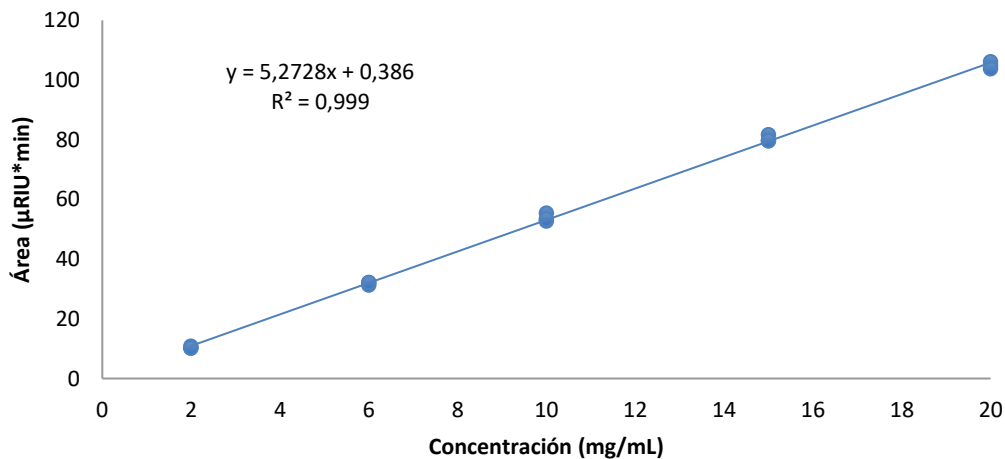


Figura A-3. Curva de calibración sacarosa (Método)

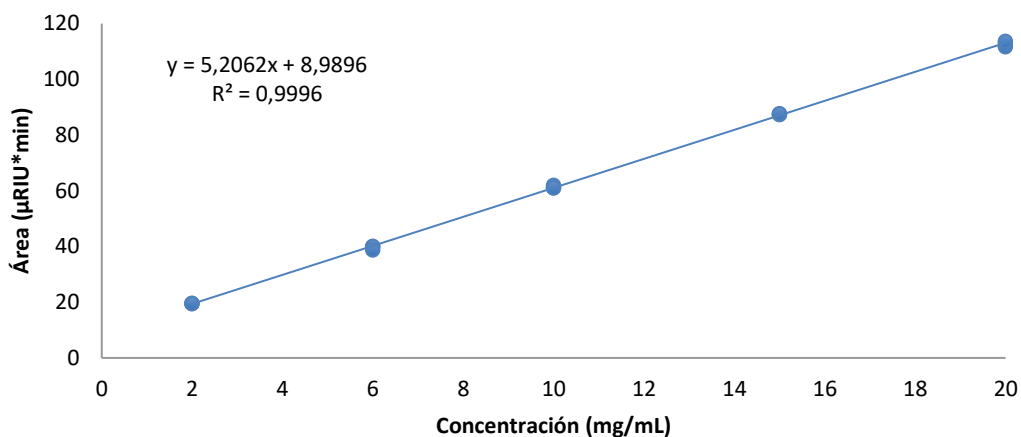


Tabla A-4. Parámetros estadísticos t student para la evaluación de la linealidad de sacarosa en el sistema y método

	Parámetro		Hipótesis Nula (Ho)	t _{exp}	t _{tab(13; 0,05)}
Sistema	Intercepto (a)	0,3859	a = 0	0,6762	2,1604
	Pendiente (b)	5,2728	b = 0	114,2519	2,1604
	Correlación (r)	0,9990	No hay correlación	205,9705	2,1604
Método	Intercepto (a)	8,9896	a = 0	26,3396	2,1604
	Pendiente (b)	5,2062	b = 0	188,6859	2,1604
	Correlación (r)	0,9996	No hay correlación	340,1584	2,1604

Tabla A-5. Parámetros estadísticos ANOVA para la evaluación de la linealidad de sacarosa en el sistema y método

	Parámetro	Grados de libertad (gl)	Suma de Cuadrados (SC)	Cuadrado Medio (CM)	Fo	Ftab
Sistema	Regresión	1	16948,1096	16948,1096	13053,4891	4,667
	Falta de Ajuste	3	7,0217	2,3406	2,3745	3,708
	Error residual	13	16,8787	1,2984		
	Error puro	10	9,8570	0,9857		
	Error total	14	16964,9883			
Método	Regresión	1	16523,0040	16523,0040	35602,3734	4,667
	Falta de Ajuste	3	2,3932	0,7977	2,1915	3,708
	Error residual	13	6,0333	0,4641		
	Error puro	10	3,6401	0,3640		
	Error total	14	16529,0373			

▪ **Linealidad glucosa**

Figura A-4. Curva de calibración glucosa (Sistema)

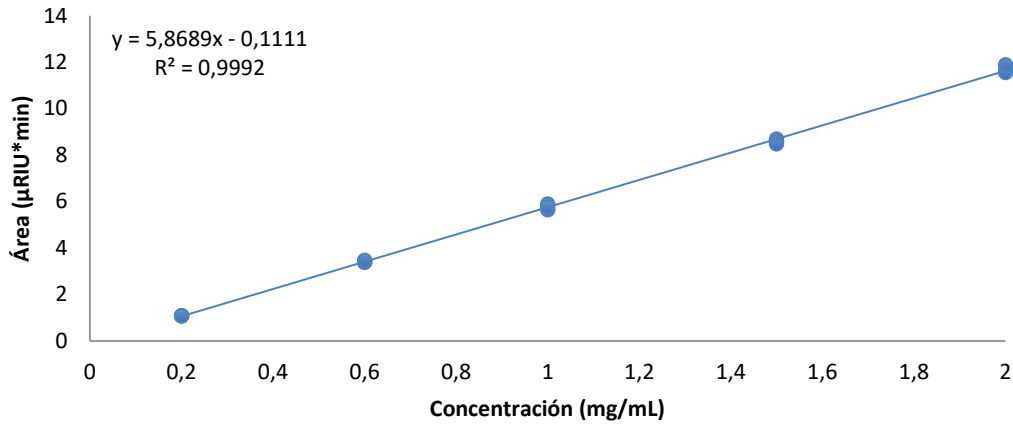


Figura A-5. Curva de calibración glucosa (Método)

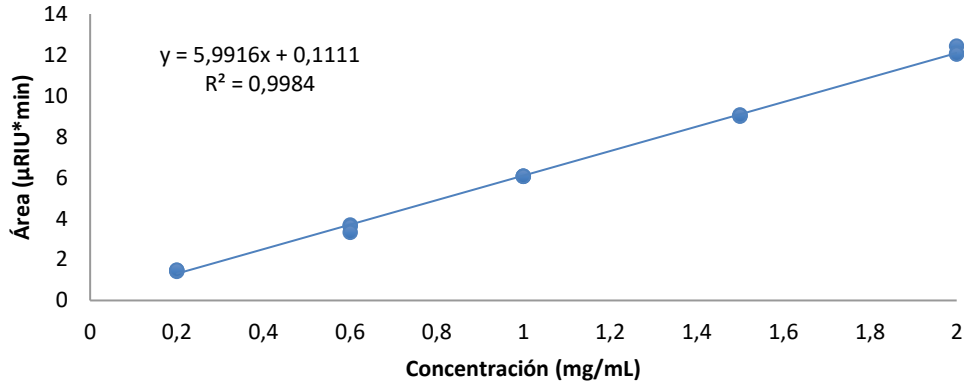


Tabla A-6. Parámetros estadísticos t student para la evaluación de la linealidad de la glucosa en el sistema y método

	Parámetro	Hipótesis Nula (Ho)	t_{exp}	$t_{tab}(13; 0,05)$
Sistema	Intercepto (a)	$a = 0$	-1,9717	2,1604
	Pendiente (b)	$b = 0$	128,8292	2,1604
	Correlación (r)	No hay correlación	232,2503	2,1604
Método	Intercepto (a)	$a = 0$	1,34	2,1604
	Pendiente (b)	$b = 0$	89,43	2,1604
	Correlación (r)	No hay correlación	161,2236	2,1604

Tabla A-7. Parámetros estadísticos ANOVA para la evaluación de la linealidad de glucosa en el sistema y método

	Parámetro	Grados de libertad (gl)	Suma de Cuadrados (SC)	Cuadrado Medio (CM)	Fo	Ftab
Sistema	Regresión	1	209,9712	209,9712	16596,9864	4,667
	Falta de Ajuste	3	0,0511	0,0170	1,5039	3,708
	Error residual	13	0,1645	0,0127		
	Error puro	10	0,1133	0,0113		
	Error total	14	210,1357			
Método	Regresión	1	218,8445	218,8445	7997,8628	4,667
	Falta de Ajuste	3	0,1804	0,0601	3,4289	3,708
	Error residual	13	0,3557	0,0274		
	Error puro	10	0,1753	0,0175		
	Error total	14	219,2002			

▪ **Linealidad fructosa**

Figura A-6. Curva de calibración fructosa (Sistema)

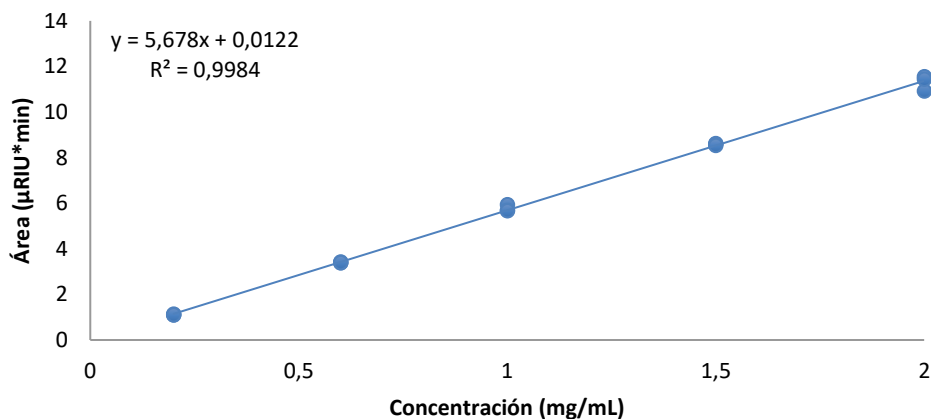


Figura A-7. Curva de calibración fructosa (Método)

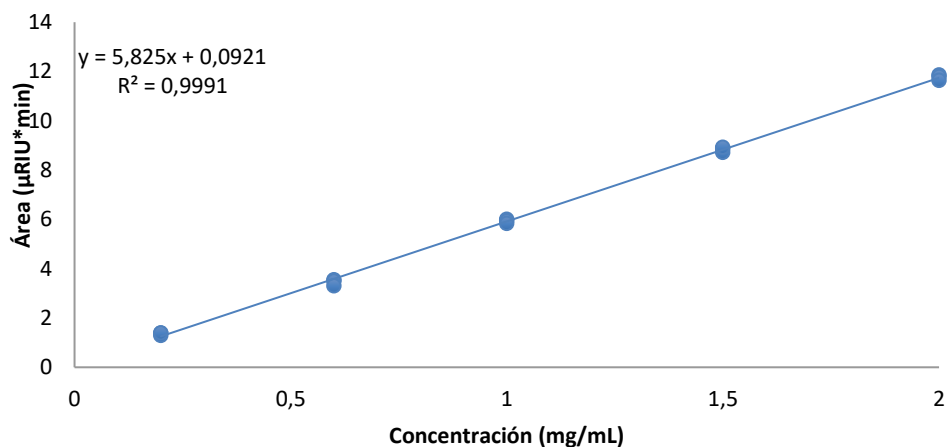


Tabla A-8. Parámetros estadísticos t student para la evaluación de la linealidad de fructosa en el sistema y método

	Parámetro		Hipótesis Nula (Ho)	t _{exp}	t _{tab} (13; 0,05)
Sistema	Intercepto (a)	0,0122	a = 0	0,1540	2,1604
	Pendiente (b)	5,6780	b = 0	88,8008	2,1604
	Correlación (r)	0,9984	No hay correlación	160,0879	2,1604
Método	Intercepto (a)	0,0921	a = 0	1,5214	2,1604
	Pendiente (b)	5,8250	b = 0	119,0237	2,1604
	Correlación (r)	0,9991	No hay correlación	214,5731	2,1604

Tabla A-9. Parámetros estadísticos ANOVA para la evaluación de la linealidad de fructosa en el sistema y método

	Parámetro	Grados de libertad (gl)	Suma de Cuadrados (SC)	Cuadrado Medio (CM)	F _o	F _{tab}
Sistema	Regresión	1	196,5342	196,5342	7885,5834	4,667
	Falta de Ajuste	3	0,0414	0,0138	0,4882	3,708
	Error residual	13	0,3240	0,0249		
	Error puro	10	0,2826	0,0283		
	Error total	14	196,8583			
Método	Regresión	1	206,8393	206,8393	14166,6491	4,667
	Falta de Ajuste	3	0,0850	0,0283	2,7029	3,708
	Error residual	13	0,1898	0,0146		
	Error puro	10	0,1048	0,0105		
	Error total	14	207,0291			

Precisión

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, respecto a la repetibilidad se observa que no hay diferencia significativa entre las varianzas de los niveles de concentración evaluados, puesto que el $G_{exp} < G_{tab}$. Adicionalmente, el RSDp en todos casos fue inferior al 5% cumpliendo con los requisitos establecidos.

Con relación a la precisión intermedia, se determinó a través del análisis de varianza que ninguna de las fuentes de variación (día y réplica) afectan la precisión del sistema y método pues el F_o fue inferior al F_{tab} para los tres analitos.

▪ **Precisión sacarosa**

Tabla A-10. Parámetros estadísticos Test de Cochran para la evaluación de la repetibilidad de sacarosa en el sistema y método

	RSDp	G _{exp}	G _{tab}	H ₀
Sistema	2,3971	0,5677	0,8709	No hay diferencia significativa entre varianzas
Método	0,7815	0,7540	0,8709	

Tabla A-11. Parámetros estadísticos ANOVA para la evaluación de la repetibilidad de sacarosa en el sistema y método

	Parámetro	Grados de libertad (gl)	Suma de Cuadrados (SC)	Cuadrado Medio (CM)	Fo	Ft
Sistema	Días	2	23,1993	11,5997	0,0065	3,443
	Réplicas	2	3,9478	1,9739	0,0011	3,443
	Error	22	39096,1288	1777,0968		
	Error total	26	39123,2760			
Método	Días	2	27,4891	13,7445	0,0078	3,443
	Réplicas	2	0,1624	0,0812	4,6609E-05	3,443
	Error	22	38334,9786	1742,4990		
	Error total	26	38362,6301			

▪ **Precisión glucosa**

Tabla A-12. Parámetros estadísticos Test de Cochran para la evaluación de la repetibilidad de glucosa en el sistema y método

	RSDp	G _{exp}	G _{tab}	H ₀
Sistema	1,5604	0,6296	0,8709	No hay diferencia significativa entre varianzas
Método	2,5498	0,7713	0,8709	

Tabla A-13. Parámetros estadísticos ANOVA para la evaluación de la repetibilidad de glucosa en el sistema y método

	Parámetro	Grados de libertad (gl)	Suma de Cuadrados (SC)	Cuadrado Medio (CM)	Fo	Ft
Sistema	Días	2	0,8388	0,4194	0,0197	3,443
	Réplicas	2	0,0331	0,0165	0,0007	3,443
	Error	22	468,5007	21,2955		
	Error total	26	469,3726			
Método	Días	2	3,1305	1,5652	0,0750	3,443
	Réplicas	2	0,1179	0,0590	0,0028	3,443
	Error	22	458,9125	20,8597		
	Error total	26	462,1609			

- **Precisión fructosa**

Tabla A-14. Parámetros estadísticos Test de Cochran para la evaluación de la repetibilidad de fructosa en el sistema y método

	RSDp	G_{exp}	G_{tab}	H₀
Sistema	2,4906	0,8393	0,8709	No hay diferencia significativa entre varianzas
Método	2,7219	0,5515	0,8709	

Tabla A-15. Parámetros estadísticos ANOVA para la evaluación de la repetibilidad de fructosa en el sistema y método

	Parámetro	Grados de libertad (gl)	Suma de Cuadrados (SC)	Cuadrado Medio (CM)	F_o	F_t
Sistema	Días	2	1,1755	0,5878	0,0291	3,443
	Réplicas	2	0,3543	0,1771	0,0088	3,443
	Error	22	444,8251	20,2193		
	Error total	26	446,3549			
Método	Días	2	2,7772	1,3886	0,0680	3,443
	Réplicas	2	0,5518	0,2759	0,0135	3,443
	Error	22	448,9411	20,4064		
	Error total	26	452,2701			

Exactitud

La recuperación media de la metodología analítica se encuentra dentro de los límites estipulados para el método de HPLC-IR (95-105%). Adicionalmente, tras realizar el análisis del estadístico t student se concluye que la recuperación no es significativamente diferente del 100%, puesto que para los analitos evaluados el t_{exp} es inferior al t_{tab} .

- **Exactitud sacarosa**

Tabla A-16. Parámetros estadísticos t student para la evaluación de la exactitud de la metodología analítica para la sacarosa.

Parámetro	Hipótesis Nula (H₀)	t_{exp}	t_{tab}(9; 0,05)
%R promedio	98,2927		
S²	5,3047	2,2238	2,3060
C.V	2,3432		

▪ **Exactitud glucosa**

Tabla A-17. Parámetros estadísticos t student para la evaluación de la exactitud de la metodología analítica para la glucosa.

Parámetro	Hipótesis Nula (Ho)	t _{exp}	t _{tab(9; 0,05)}
%R promedio	98,1186		
S ²	5,7842	2,3027	2,3060
C.V	2,4511		

▪ **Exactitud fructosa**

Tabla A-18. Parámetros estadísticos t student para la evaluación de la exactitud de la metodología para la fructosa.

Parámetro	Hipótesis Nula (Ho)	t _{exp}	t _{tab(9; 0,05)}
%R promedio	98,0344		
S ²	6,6054	2,2944	2,3060
C.V	2,6216		

Límites de detección y cuantificación

Los límites de detección y cuantificación para los tres azúcares se precisan en las Tablas A-19, A-20 y A-21.

▪ **Límites de detección y cuantificación sacarosa**

Tabla A-19. Parámetros estadísticos para la determinación de límites de cuantificación y detección de sacarosa en el sistema y método

	Parámetros	LOQ (mg/ml)	LOD (mg/ml)
Sistema	Sa	0,7881	1,4946
	b	5,2728	0,4932
Método	Sa	0,8421	1,6176
	b	5,2062	0,5338

- **Límites de detección y cuantificación glucosa**

Tabla A-20. Parámetros estadísticos para la determinación de límites de cuantificación y detección de glucosa en el sistema y método

	Parámetros		LOQ (mg/ml)	LOD (mg/ml)
Sistema	Sa	0,0643	0,1095	0,0361
	b	5,8689		
Método	Sa	0,1167	0,1948	0,0643
	b	5,9916		

- **Límites de detección y cuantificación fructosa**

Tabla A-21. Parámetros estadísticos para la determinación de límites de cuantificación y detección de fructosa en el sistema y método

	Parámetros		LOQ (mg/ml)	LOD (mg/ml)
Sistema	Sa	0,0780	0,1374	0,0453
	b	5,6780		
Método	Sa	0,1263	0,2168	0,0716
	b	5,8249		

B. Anexo: Datos estadísticos de los diseños estadísticos experimentales exploratorio y de optimización

Para evaluar el efecto de los factores: porcentaje de aceite, porcentaje de alcoholes grasos, porcentaje de emulsificante, tipo de emulsificante, velocidad y tiempo de homogenización, en las variables respuesta: viscosidad, pH, tamaño de gota $D_{4,3}$ y span, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia del 95%. Los resultados del valor p y de los coeficientes de regresión del modelo matemático se indican a continuación para cada uno de los diseños estadísticos experimentales.

▪ Diseño estadístico experimental exploratorio

-Viscosidad

Tabla B-1. ANOVA de los factores y su efecto sobre la viscosidad DEE.

Fuente	Suma de Cuadrados	gl*	Cuadrado Medio	Valor F	Valor p	Ecuación	
Modelo	6,332E+08	7	9,045E+07	4,83	0,0208**	Intercepto	+9539,04
A-Tipo de emulsificante	6,383E+07	1	6,383E+07	3,41	0,1021	A	-1997,37
B-%Emulsificante	3,905E+06	1	3,905E+06	0,2085	0,6601	B	-494,04
C-%Aceite	7,955E+07	1	7,955E+07	4,25	0,0732	C	+2229,71
D-%Alcoholes	2,425E+08	1	2,425E+08	12,95	0,0070**	D	+3893,29
E-Tiempo (min)	2,268E+07	1	2,268E+07	1,21	0,3031	E	+1190,71
F-Velocidad (rpm)	1,785E+05	1	1,785E+05	0,0095	0,9246	F	-105,63
AD	2,205E+08	1	2,205E+08	11,78	0,0089**	AD	-3712,29
Residual	1,498E+08	8	1,873E+07				
Cor Total	7,829E+08	15					

gl*: Grados de libertad ** p<0,05

-pH

Tabla B-2. ANOVA de los factores y su efecto sobre el pH DEE.

Fuente	Suma de Cuadrados	gl*	Cuadrado Medio	Valor F	Valor p	Ecuación	
Modelo	0,7798	6	0,1300	6,36	0,0074**	Intercepto	+7,27

A-Tipo de Emulsificante	0,3813	1	0,3813	18,67	0,0019**	A	+0,1540
B-%Emulsificante	0,3570	1	0,3570	17,48	0,0024**	B	+0,1485
C-%Aceite	0,0002	1	0,0002	0,0076	0,9322	C	+0,0035
D-%Alcoholes	0,0163	1	0,0163	0,7958	0,3956	D	-0,0315
E-Tiempo (min)	0,0033	1	0,0033	0,1618	0,6969	E	-0,0135
F- Velocidad (rpm)	0,0218	1	0,0218	1,06	0,3290	F	+0,0365
Residual	0,1839	9	0,0204				
Cor Total	0,9636	15					

gl*: Grados de libertad ** p<0.05

-Tamaño de gota

Tabla B-3. ANOVA de los factores y su efecto sobre el tamaño de gota D_{4,3} DEE.

Fuente	Suma de Cuadrados	gl*	Cuadrado Medio	Valor F	Valor p	Ecuación	
Modelo	54,21	6	9,03	5,90	0,0095**	Intercepto	+4,12
A-Tipo de Emulsificante	0,1681	1	0,1681	0,1098	0,7479	A	+0,1025
B-%Emulsificante	20,57	1	20,57	13,44	0,0052**	B	-1,13
C-%Aceite	9,33	1	9,33	6,10	0,0356**	C	-0,7638
D-%Alcoholes	7,40	1	7,40	4,83	0,0555	D	-0,6800
E-Tiempo (min)	0,9409	1	0,9409	0,6147	0,4531	E	-0,2425
F- Velocidad (rpm)	15,80	1	15,80	10,32	0,0106**	F	-0,9938
Residual	13,78	9	1,53				
Cor Total	67,98	15					

gl*: Grados de libertad ** p<0.05

-Span

Tabla B-4. ANOVA de los factores y su efecto sobre el span DEE.

Fuente	Suma de Cuadrados	gl*	Cuadrado Medio	Valor F	Valor p	Ecuación	
Modelo	6,12	6	1,02	3,42	0,0482**	Intercepto	+1,86
A-Tipo de Emulsificante	0,0588	1	0,0588	0,1973	0,6674	A	+0,0606
B-%Emulsificante	1,54	1	1,54	5,18	0,0489**	B	-0,3106
C-%Aceite	3,77	1	3,77	12,66	0,0061**	C	-0,4856
D-%Alcoholes	0,1008	1	0,1008	0,3382	0,5751	D	+0,0794
E-Tiempo (min)	0,0039	1	0,0039	0,0131	0,9114	E	+0,0156
F- Velocidad (rpm)	0,6360	1	0,6360	2,13	0,1781	F	-0,1994
Residual	2,68	9	0,2980				
Cor Total	8,80	15					

gl*: Grados de libertad ** p<0,05

▪ **Diseño estadístico experimental de optimización**

-Viscosidad

Tabla B-5. ANOVA de los factores y su efecto sobre la viscosidad DEO.

Fuente	Suma de Cuadrados	gl*	Cuadrado Medio	Valor F	Valor p	Ecuación	
Modelo	2,721E+08	7	3,887E+07	330,52	< 0,0001*	Intercepto	+15316,06
A-%Aceite	1,107E+08	1	1,107E+08	941,45	< 0,0001*	A	+2630,69
B-%Emulsificante	9,806E+05	1	9,806E+05	8,34	0,0148*	B	-247,56
C-Velocidad (rpm)	1,294E+08	1	1,294E+08	1100,27	< 0.0001*	C	+2843,94
AB	8,429E+06	1	8,429E+06	71,67	< 0,0001*	AB	+725,81
AC	1,461E+06	1	1,461E+06	12,42	0,0048*	AC	-302,19
BC	1,875E+07	1	1,875E+07	159,43	< 0,0001*	BC	+1082,56
ABC	2,362E+06	1	2,362E+06	20,08	0,0009*	ABC	+384,19
Curvatura	23839,51	1	23839,51	0,2027	0,6613		
Error puro	1,294E+06	11	1,176E+05				
Cor Total	2,734E+08	19					

gl*: Grados de libertad * p<0,05

-pH

Tabla B-6. ANOVA de los factores y su efecto sobre el pH DEO.

Fuente	Suma de Cuadrados	gl*	Cuadrado Medio	Valor F	Valor p	Ecuación	
Modelo	0,0237	7	0,0034	8,66	0,0010*	Intercepto	+7,19
A-%Aceite	3,469E-18	1	3,469E-18	8,875E-15	1,0000	A	+0,0000
B-%Emulsificante	0,0156	1	0,0156	39,97	< 0,0001*	B	-0,0313
C-Velocidad (rpm)	0,0036	1	0,0036	9,21	0,0114*	C	+0,0150
AB	0,0002	1	0,0002	0,5756	0,4640	AB	+0,0038
AC	0,0016	1	0,0016	4,09	0,0681	AC	-0,0100
BC	0,0006	1	0,0006	1,60	0,2322	BC	+0,0063
ABC	0,0020	1	0,0020	5,18	0,0438*	ABC	-0,0113
Curvatura	0,0045	1	0,0045	11,51	0,0060*		
Error puro	0,0043	11	0,0004				
Cor Total	0,0325	19					

gl*: Grados de libertad *: p<0,05

-Tamaño de gota**Tabla B-7.** ANOVA de los factores y su efecto sobre el tamaño de gota D_{4,3} DEO.

Fuente	Suma de Cuadrados	gl*	Cuadrado Medio	Valor F	Valor p	Ecuación	
Modelo	105,90	7	15,13	215,43	< 0.0001*	Intercepto	+3,54
A-%Aceite	12,46	1	12,46	177,44	< 0.0001*	A	-0,8825
B-%Emulsificante	41,67	1	41,67	593,32	< 0.0001*	B	-1,61
C-Velocidad (rpm)	18,62	1	18,62	265,13	< 0.0001*	C	-1,08
AB	11,12	1	11,12	158,37	< 0.0001*	AB	+0,8337
AC	7,00	1	7,00	99,62	< 0.0001*	AC	+0,6612
BC	9,61	1	9,61	136,84	< 0.0001*	BC	+0,7750
ABC	5,43	1	5,43	77,30	< 0.0001*	ABC	-0,5825
Curvatura	3,22	1	3,22	45,79	< 0.0001*		
Error puro	0,7725	11	0,0702				
Cor Total	109,89	19					

gl*: Grados de libertad * p<0,05

-Span**Tabla B-8.** ANOVA de los factores y su efecto sobre el span DEO.

Fuente	Suma de Cuadrados	gl*	Cuadrado Medio	Valor F	Valor p	Ecuación	
Modelo	3,77	7	0,5392	6,15	0,0041*	Intercepto	+1,50
A-%Aceite	0,1243	1	0,1243	1,42	0,2589	A	-0,0881
B-%Emulsificante	2,47	1	2,47	28,21	0,0002*	B	-0,3931
C-Velocidad (rpm)	0,9555	1	0,9555	10,90	0,0071*	C	-0,2444
AB	0,1040	1	0,1040	1,19	0,2993	AB	+0,0806
AC	0,0371	1	0,0371	0,4227	0,5289	AC	-0,0481
BC	0,0011	1	0,0011	0,0120	0,9146	BC	-0,0081
ABC	0,0798	1	0,0798	0,9104	0,3605	ABC	+0,0706
Curvatura	0,4852	1	0,4852	5,53	0,0383*		
Error puro	0,9643	11	0,0877				
Cor Total	5,22	19					

gl*: Grados de libertad * p<0,05

C. Anexo: Datos estadísticos del diseño experimental para la evaluación de la actividad cicatrizante

Los datos del porcentaje de contracción de las heridas fueron analizados estadísticamente mediante un ANOVA de dos vías de medidas repetidas, seguido de una prueba t por pares con el método de corrección de pruebas múltiples de Bonferroni para realizar comparaciones entre los tratamientos y los días con un $\alpha=0,05$. Para la aplicación de las pruebas estadísticas realizadas, los siguientes supuestos se deben cumplir: no se presentan valores atípicos significativos, la varianza entre grupos es igual (esfericidad) y la distribución de los datos es aproximadamente normal (normalidad). Los datos analizados cumplen con los supuestos, de modo que es posible aplicar los análisis estadísticos.

A continuación, se presentan los análisis de varianza (ANOVA) de dos vías de medidas repetidas y las pruebas t por pares con el método de corrección de pruebas múltiples de Bonferroni para cada uno de los grupos evaluados.

- **Crema de panela (CP) vs control negativo de la crema de panela (CPC)**

Tabla C-1. ANOVA de dos vías de medidas repetidas para la crema de panela (CP) y su control negativo (CPC).

Efecto	gln*	gld*	Valor F	Valor p	p<0,05
Días	3,00	15,00	93,078	6,4e ⁻¹⁰	*
Tratamiento	1,00	5,00	14,521	1,2e ⁻⁰²	*
Días: tratamiento	1,57	7,83	6,321	2,8e ⁻⁰²	**

gln*: Grados de libertad numerador; gld*: Grados de libertad denominador; *: p<0,05

Tabla C-2. Comparaciones por pares entre grupos de tratamiento CP y CPC.

Días	Grupo 1	Grupo 2	Estadístico	gl	p.ajs.	p.ajs. significativo
3	CP	CPC	1,34	5	0,238	NS

6	CP	CPC	4,29	5	0,008	*
9	CP	CPC	5,84	5	0,002	*
12	CP	CPC	6,49	5	0,001	*

gl: Grados de libertad p.ajs; valor p ajustado *, **, ***: p<0,05; NS: No significativo

Tabla C-3. Comparaciones por pares entre puntos de tiempo CP y CPC.

Tratamiento	Grupo 1 (Día)	Grupo 2 (Día)	Estadístico	gl	p.ajs.	p.ajs. significativo
CP	3	6	-4,49	5	0,039	*
CP	3	9	-9,61	5	0,001	**
CP	3	12	-9,93	5	0,001	**
CP	6	9	-5,58	5	0,015	*
CP	6	12	-6,40	5	0,008	**
CP	9	12	-5,56	5	0,015	*
CPC	3	6	-3,09	5	0,163	NS
CPC	3	9	-9,55	5	0,001	**
CPC	3	12	-10,2	5	0,000942	***
CPC	6	9	-5,80	5	0,013	*
CPC	6	12	-7,31	5	0,005	**
CPC	9	12	-5,70	5	0,014	*

gl: Grados de libertad p.ajs; valor p ajustado *, **, ***: p<0,05; NS: No significativo

▪ **Crema de caléndula (CC) vs control negativo de la crema de caléndula (CCC)**

Tabla C-4. ANOVA de dos vías de medidas repetidas para la crema de caléndula (CC) y su control negativo (CCC).

Efecto	gln*	gld*	Valor F	Valor p	p<0,05
Días	1,39	6,97	63,395	5,71e ⁻⁰⁵	*
Tratamiento	1,00	5,00	2,672	0,163	NS
Días: tratamiento	1,99	9,93	1,013	0,397	NS

gln*: Grados de libertad numerador; gld*: Grados de libertad denominador; *: p<0,05; NS: no significativo

Tabla C-5. Comparaciones por pares entre puntos de tiempo CC y CCC.

Efecto	Grupo 1 (Día)	Grupo 2 (Día)	Estadístico	gl	p.ajs.	p.ajs. significativo
Contracción	3	6	-2,47	11	0,187	NS
Contracción	3	9	-9,59	11	0,0000678	****
Contracción	3	12	-10,4	11	0,0000313	****
Contracción	6	9	-10,1	11	0,0000412	****
Contracción	6	12	-9,78	11	0,0000551	****
Contracción	9	12	-4,38	11	0,007	**

gl: Grados de libertad p.ajs; valor p ajustado **, ****: p<0,05; NS: No significativo

▪ **Vehículo (CSP) vs control negativo del vehículo (CSPC)**

Tabla C-6. ANOVA de dos vías de medidas repetidas para el vehículo (CSP) y su control negativo (CSPC).

Efecto	gln*	gld*	Valor F	Valor p	p<0,05
Días	3	15	117,048	1,25e ⁻¹⁰	*
Tratamiento	1	5	1,983	0,218	NS
Días: tratamiento	3	15	1,218	0,338	NS

gln*: Grados de libertad numerador; gld*: Grados de libertad denominador; *: p<0,05; NS: no significativo

Tabla C-7. Comparaciones por pares entre puntos de tiempo CSP y CSPC.

Efecto	Grupo 1 (Día)	Grupo 2 (Día)	Estadístico	gl	p.ajs.	p.ajs. significativo
Contracción	3	6	-4,86	11	0,003	**
Contracción	3	9	-13,2	11	0,000000226	****
Contracción	3	12	-20,9	11	0,00000000196	****
Contracción	6	9	-8,39	11	0,0000248	****
Contracción	6	12	-10,5	11	0,00000266	****
Contracción	9	12	-4,94	11	0,003	**

gl: Grados de libertad p.ajs; valor p ajustado **, ****: p<0,05; NS: No significativo

▪ **Crema de panela (CP) vs crema de caléndula (CC) vs vehículo (CSP).**

Tabla C-8. ANOVA de dos vías de medidas repetidas para crema de panela (CP), crema de caléndula (CC) y vehículo (CSP).

Efecto	gln*	gld*	Valor F	Valor p	p<0,05
Días	1,07	5,34	155,909	3,44e ⁻⁰⁵	*
Tratamiento	2,00	10,00	4,427	0,042	*
Días: tratamiento	6,00	30,00	2,387	0,053	NS

gln*: Grados de libertad numerador; gld*: Grados de libertad denominador; *: p<0,05; NS: no significativo

Tabla C-9. Comparaciones por pares entre grupos de tratamiento CP, CC, CSP.

Grupo 1	Grupo 2	Estadístico	gl	p.ajs.	p.ajs. significativo
CSP	CP	-4,12	23	0,001	*
CSP	CC	-0,254	23	1	NS
CP	CC	2,68	23	0,04	*

gl: Grados de libertad p.ajs; valor p ajustado *, **, ****: p<0,05; NS: No significativo

Tabla C-10. Comparaciones por pares entre puntos de tiempo CP, CC, CSP.

Grupo 1 (Día)	Grupo 2 (Día)	Estadístico	gl	p.ajs.	p.ajs. significativo
3	6	-5,71	17	1,54e ⁻⁰⁴	***
3	9	-13,7	17	7,44e ⁻¹⁰	****
3	12	-14,4	17	3,59e ⁻¹⁰	****
6	9	-9,37	17	2,38e ⁻⁰⁷	****
6	12	-10,1	17	7,5e ⁻⁰⁸	****
9	12	-6,50	17	3,28e ⁻⁰⁵	****

gl: Grados de libertad p.ajs; valor p ajustado *, **, ***: p<0,05; NS: No significativo

D. Anexo: Carta de aval del proyecto por parte del Comité de Ética de la Facultad de Ciencias y Resolución de acreditación de sus integrantes

En el presente Anexo, se incluyen la Carta de Aval para la realización de los ensayos *in vivo* del presente estudio por parte del Comité de Ética de la Facultad de Ciencias en la reunión realizada el 02 de mayo de 2022 mediante Acta 05 de 2022, así como la Resolución No. 28 de 2022 de la acreditación de los integrantes que conforman el Comité Permanente de Ética de la Facultad de Ciencias de la Sede Bogotá de la Universidad Nacional de Colombia.

Carta de aval:**FACULTAD DE CIENCIAS
COMITÉ DE ÉTICA**

Bogotá, mayo 03 de 2022

Profesor(a)
Yolima Baena Aristizábal
Departamento de Farmacia

Respetado(a) Profesor(a):

Atentamente le comunico que el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias, en reunión realizada el día 02 de mayo de 2022 (Acta 05-2022), evaluó aspectos éticos del proyecto presentado por usted. Como resultado de esta revisión, el Comité considera que el proyecto *cumple* con los aspectos éticos básicos. Para los fines pertinentes, se transcriben las observaciones y el concepto final.

Proyecto / Investigadores – Grupos – Dependencias / Observaciones.**Proyecto 5.** Contribución al desarrollo de una formulación tópica a base de panela con posible actividad cicatrizante.**Responsables.** Yolima Baena Aristizábal (Directora de Tesis, Grupo de Investigación en Tecnología de Productos Naturales – TECPRONA), Laura Alejandra Martínez Contreras (Tesisista de Maestría en Ciencias Farmacéuticas).**Objetivo del estudio.** *En este proyecto se contempla evaluar la actividad cicatrizante de una crema tópica de panela desarrollada a través de un diseño estadístico experimental, en modelos in vivo de herida por escisión en piel de ratas Wistar.*

Los principales aspectos éticos, legales y ambientales a tener en cuenta por los investigadores están relacionados con:

1. Protocolos de bioseguridad. Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) y sistema institucional de gestión ambiental - SGA (disposición de residuos químicos y biológicos). El acceso a espacios físicos del campus UNAL deberá acogerse a protocolos de bioseguridad ajustados por la coyuntura actual de la pandemia por COVID-19.**2. Guías y pautas normativas.**Los investigadores declaran: *Los ensayos se realizarán empleando animales de experimentación criados y mantenidos del Bioterio del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia.**Se asume el compromiso de reducir en lo posible las molestias y el dolor al animal, empleando un diseño experimental apropiado que reduzca al mínimo el número de animales a utilizar, y que garantice igualmente la validez de los resultados. Además, el personal participante estará debidamente entrenado en el cuidado y uso de animales de laboratorio. Los animales se alojarán por grupos, bajo condiciones estándar de fotoperiodo (12 horas luz/12 horas oscuridad), temperatura y humedad, con acceso ad libitum al agua y alimento. Por otro lado, los ensayos se llevarán a cabo teniendo en cuenta los principios éticos en el manejo de animales de laboratorio, consignados en la Ley 84 de 1989, en las "Normas Científicas, Técnicas y Administrativas para la Investigación en Salud" establecidas en la Resolución No. 008430 de 1993 del Ministerio de Salud; y considerando las recomendaciones internas de la Universidad Nacional de Colombia y del Bioterio del Departamento de Farmacia, relativas al manejo y cuidado del animal de experimentación. La disposición de los residuos biológicos se hará de acuerdo con los protocolos de riesgo biológico establecidos en la Universidad Nacional de Colombia.*

FACULTAD DE CIENCIAS
COMITÉ DE ÉTICA



Así mismo, se buscará respetar los intereses éticos, jurídicos y sociales de todos los involucrados, en particular las personas que residen en la zona de origen de las plantas. En lo cual incluiremos los permisos correspondientes de material vegetal para estudio científico, que permitan un uso racional de esta especie”.

3. Propiedad intelectual (protección de los desarrollos y cumplimiento de normativas). Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional de Colombia (Reglamento sobre Propiedad Intelectual UNAL) y Resolución RG 032 de 2012 - Rectoría UN (Propiedad Intelectual en proyectos de Extensión UNAL).

Concepto: Proyecto Avalado. La vigencia del presente aval será la correspondiente al cronograma presentado en la propuesta de investigación.

El CEI tuvo acceso a los siguientes documentos: Proyecto de Investigación conteniendo las consideraciones éticas.

Yazmín Yaneth Agámez Pertuz
Integrante del Comité de Ética (*)

(*) **Acto Administrativo.** Resolución No. 28 de 2022 Secretaría Facultad de Ciencias (Acta 15 del 7 de abril de 2022, Consejo Facultad de Ciencias) **Por la cual se actualiza la acreditación de los integrantes que conforman el Comité Permanente de Ética de la Facultad de Ciencias de la Sede Bogotá de la Universidad Nacional de Colombia para el periodo institucional, comprendido entre el 20 de abril del año 2022 y el 19 de abril del año 2024”.**

Resolución No. 28 de 2022

RESOLUCIÓN No. 28 DE 2022
(Acta 15 del 7 de abril de 2022 del Consejo de Facultad)

“Por la cual se actualiza la acreditación de los integrantes que conforman el Comité Permanente de Ética de la Facultad de Ciencias de la Sede Bogotá de la Universidad Nacional de Colombia para el período institucional, comprendido entre el 20 de abril del año 2022 y el 19 de abril del año 2024.”

LA SECRETARÍA DE LA FACULTAD
En uso de sus atribuciones legales y,

CONSIDERANDO:

1. Que Mediante Acuerdo 024 de 2009 del Consejo Superior Universitario se modifica la estructura y organización de la Facultad de Ciencias, Sede Bogotá.
2. Que Según el artículo 40 del Acuerdo 011 de 2005 del Consejo Superior Universitario, es competencia de la Secretaría de la Facultad acreditar mediante resolución previo cumplimiento de los requisitos legales y estatutarios, a los miembros elegidos y designados del Consejo de Facultad y demás cuerpos colegiados de ella, conforme a las normas y reglamentos de la Universidad.
3. Que mediante Acta No. 15 del 7 de abril de 2022, el Consejo de la Facultad de Ciencias de la Sede Bogotá aprobó la modificación de la Resolución No. 023 de 2020 de la Secretaría de la Facultad de Ciencias y la actualización de la acreditación de los miembros que conforman el Comité Permanente de Ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá, para el período institucional comprendido entre el 20 de abril del año 2022 y el 19 de abril de 2024, tomando en consideración la solicitud presentada mediante correo electrónico remitido a la Secretaría el 1 de abril de 2022, por parte del Coordinador del Comité de Ética, por cuanto finalizó el período institucional 2020-2022.

Que en mérito de lo anterior,

RESUELVE:

ARTÍCULO 1: Actualizar la acreditación de los integrantes que conforman el Comité Permanente de Ética de la Facultad de Ciencias de la Sede Bogotá de la Universidad

Nacional de Colombia para el período institucional, comprendido entre el 20 de abril del año 2022 y el 19 de abril del año 2024.”, así:

Prof. Alia Rodríguez Villate	Departamento de Biología
Prof. Edilberto Cepeda Cuervo	Departamento de Estadística
Prof. Anderson Dussán Cuenca	Departamento de Física
Prof. Nivea Cristina Garzón Gómez	Departamento de Geociencias
Prof. Agustín Moreno Cañadas	Departamento de Matemáticas
Prof. Yazmín Yaneth Agámez Pertuz	Departamento de Química
Prof. Clara Inés Orozco Pardo	Instituto de Ciencias Naturales
Prof. Santiago Vargas Domínguez	Observatorio Astronómico Nacional
Prof. Luis Fernando Ospina Giraldo – Coordinador	Departamento de Farmacia

ARTÍCULO 2. CALIDADES. Los miembros del Comité Permanente de ética de la Facultad de Ciencias deberán ser profesores de planta, con trayectoria académica reconocida, con experiencia y/o participación en reflexiones sobre el tema de la Ética. Podrán participar profesores pensionados de la Universidad.

ARTÍCULO 3. FUNCIONES. Las funciones y calidades de los miembros del Comité Permanente de Ética de la Facultad de Ciencias de la Sede Bogotá, fueron reglamentadas originalmente en la Resolución No. 074 de 2010 del Consejo de la Facultad de Ciencias en su sesión No. 07, así:

1. Formular criterios éticos institucionales, a partir de los principios y de las normas del nivel nacional e internacional.
2. Pronunciarse sobre la viabilidad y los demás aspectos éticos de proyectos de investigación sometidos a consideración, especialmente con seres vivos o materiales procedentes de los mismos, cuando sea consultado por las diferentes instancias de la Facultad de Ciencias de la Sede Bogotá.
3. Asesorar la toma de decisiones relacionadas con aspectos éticos de la investigación.
4. Rendir informes de actividades solicitados por la Dirección de la Facultad de Ciencias.
5. Las demás que señalen la Ley, los Estatutos, los Reglamentos y Disposiciones especiales de los órganos competentes nacionales y de la Universidad Nacional de Colombia.
6. Liderar en la Facultad de Ciencias la reflexión sobre la ética como parte de las buenas prácticas en la investigación.

ARTÍCULO 4. REUNIONES. El Comité Permanente de Ética de la Facultad de Ciencias, se reunirá periódicamente, por convocatoria del Secretario, nombrado

*SECRETARÍA FACULTAD DE CIENCIAS SEDE BOGOTÁ | RESOLUCIÓN N° 28 DE
2022*

entre los mismos miembros del Comité, o por solicitud formulada y motivada por parte de cualquiera de los miembros del Comité.

PARÁGRAFO 1. La fecha, hora y sitio de las reuniones serán fijados por el Secretario del Comité.

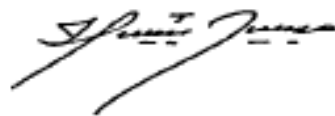
PARÁGRAFO 2. De todas las sesiones quedará constancia escrita en un acta numerada que elaborará el Secretario del Comité para ser enviada a la Secretaría de la Facultad de Ciencias.

PARÁGRAFO 3. Las decisiones del Comité serán de carácter consensual.

ARTÍCULO 5. VIGENCIA. La presente Resolución entrará en vigencia a partir de su fecha de expedición.

COMUNÍQUESE Y CÚMPLASE

Dada en Bogotá D.C., a los diecinueve (19) días del mes de abril de dos mil veintidós (2022).



Prof. HELBER DE JESÚS BARBOSA BARBSA
Secretario Facultad de Ciencias Sede Bogotá

Bibliografía

1. Kiya K, Kubo T. Neurovascular interactions in skin wound healing. *Neurochem Int* [Internet]. 2019;125: 144-50. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.02.014>
2. Moeini A, Pedram P, Makvandi P, Malinconico M, Gomez d' Ayala G. Wound healing and antimicrobial effect of active secondary metabolites in chitosan-based wound dressings: A review. Vol. 233, *Carbohydrate Polymers*. Elsevier Ltd; 2020.
3. Ziolkowski N, Kitto SC, Jeong D, Zuccaro J, Adams-Webber T, Miroshnychenko A, et al. Psychosocial and quality of life impact of scars in the surgical, traumatic and burn populations: A scoping review protocol. *BMJ Open*. 2019 jun 1;9(6).
4. Junginger HE. *Pharmaceutical emulsions and creams*. 1992.
5. Tarasenko VO, Shmatenko V v., Kuchmistov VO, Koziko NO, Shmatenko OP, Drozdova AO, et al. Pharmaceutical development of complex wound-healing ointment for the needs of military medicine. *Regul Mech Biosyst*. 2017 nov 24;8(4):662-72.
6. Bhowmik D, Gopinath H, Pragati Kumar B, Duraivel S, Sampath Kumar KP. THE PHARMA INNOVATION Recent Advances In Novel Topical Drug Delivery System. *Thepharmajournal* [Internet]. 2012;1(9). Disponible en: www.thepharmajournal.com
7. Antonio J, Prieto-gonzález S, Garrido-garrido G, Antonio J, Jorge G lavaut. Actualidad de la Medicina Tradicional Herbolaria. *Revista CENIC: Ciencias Biológicas*. 2004;35(1):19-36.
8. Mengarelli RH, Bilevich E, Belatti A, Gorosito S. Agentes tópicos tradicionales utilizados para la cura de heridas. ¿Mito o verdad? *Terapia Dermatológica* [Internet]. 2013; 1:98-103. Disponible en: http://www.aiach.org.ar/ckfinder/userfiles/files/Agentes_Topicos_en_Heridas_ATD_2013.pdf
9. Velásquez F, Espitia J, Mendieta O, Escobar S, Rodríguez J. Non-centrifugal cane sugar processing: A review on recent advances and the influence of process variables on qualities attributes of final products. *J Food Eng*. 2019 ago 1; 255:32-40.
10. Centro Provincial de Información de Ciencias Médicas (Cuba) R, González Tuero JH. Métodos alternativos para el tratamiento de pacientes con heridas infectadas. *Medisan* [Internet]. 2011;15(4):503-14.

11. Topham J. Sugar for wounds. *J Tissue Viability*. 2000;10(3):86-9.
12. Biswas A, Bharara M, Hurst C, Gruessner R, Armstrong D, Rilo H. Use of Sugar on the Healing of Diabetic Ulcers: A Review Epidemiology of Diabetic Foot Ulcers. *J Diabetes Sci Technol* [Internet]. 2010;4(5):1139-45. Disponible en: www.journalofdst.org
13. El espectador. La panela, un producto mágico. 2014; Disponible en: <http://www.elespectador.com/noticias/publirreportaje/panela-un-producto-magico-articulo-530396>
14. Dirección de Cadenas agrícolas y Forestales. Cadena Agroindustrial de la panela. 2019.
15. Alarcón AL. Estudio del comportamiento de propiedades fisicoquímicas, reológicas y térmicas de jugos y mieles de caña panelera. [Bogotá]: Universidad Nacional de Colombia; 2017.
16. Yousef H, Sharma S. Anatomy, Skin (Integument), Epidermis [Internet]. 2017. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/322063118>
17. La Roche-Posey. How much do you know about our skin? 2009.
18. Zuluaga MJ. Evaluación de la actividad cicatrizante de *Critoniella acuminata* en pequeños roedores. [Bogotá]: Universidad Nacional de Colombia; 2013.
19. Kaye BB, Ennis WM. Classification of wounds and their treatment. *The American Journal of Surgery*. 1943;59(1):94-8.
20. Jeschke MG, Shahrokhi S, Finnerty CC, Branski LK, Dibildox M. Wound Coverage Technologies in Burn Care: Established Techniques. *Journal of Burn Care and Research*. 2018;39(3):313-8.
21. Gil LR. Evaluación del desempeño preclínico de soportes de Colágeno tipo I asociados con extractos vegetales de Aloe vera en un modelo animal de *Cavia porcellus*. Universidad Nacional de Colombia. 2016.
22. Wang PH, Huang BS, Horng HC, Yeh CC, Chen YJ. Wound healing. *Journal of the Chinese Medical Association* [Internet]. 2018;81(2):94-101. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.11.002>
23. Cuarín C, Quiroga P, Landínez N. Proceso de Cicatrización de heridas de piel. *Rev Fac Med* [Internet]. 2013;61(4):441-8. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rfmun/v61n4/v61n4a14.pdf>
24. Jaffé WR. Nutritional and functional components of non-centrifugal cane sugar: A compilation of the data from the analytical literature. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2015; 43:194-202.

25. Jaffé WR. Health Effects of Non-Centrifugal Sugar (NCS): A Review. *Sugar Tech.* 2012;14(2):87-94.
26. Martínez I. La eficacia de la sacarosa y la miel en heridas crónicas: Revisión bibliográfica de la literatura [Internet]. 2017. Disponible en: http://tauja.ujaen.es/bitstream/10953.1/6579/1/MartnezLpezAnalsabel_TFG.pdf
27. Chirife J, Herszage L, Joseph A, Kohn ES. In vitro study of bacterial growth inhibition in concentrated sugar solutions: microbiological basis for the use of sugar in treating infected wounds. *Antimicrob Agents Chemother.* 1983;23(5):766-73.
28. Zidan D, Azlan A. Non-Centrifugal Sugar (NCS) and Health: A Review on Functional Components and Health Benefits. *Applied Sciences (Switzerland).* 2022 ene 1;12(1).
29. Zhao Y, Chen M, Zhao Z, Yu S. The antibiotic activity and mechanisms of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) bagasse extract against food-borne pathogens. *Food Chem* [Internet]. 2015; 185:112-8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.120>
30. Sivamani RK, Ma BR, Wehrli LN, Maverakis E. Phytochemicals and Naturally Derived Substances for Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2012;1(5):213-7.
31. Safta DA, Bogdan C, Moldovan ML. Vesicular Nanocarriers for Phytocompounds in Wound Care: Preparation and Characterization. *Pharmaceutics.* 2022 may 1;14(5).
32. Singh A, Lal UR, Mukhtar HM, Singh PS, Shah G, Dhawan RK. Phytochemical profile of sugarcane and its potential health aspects. *Pharmacogn Rev.* 2015;9(17):45-54.
33. (DANE). Particularidades del cultivo de la caña panelera (*Saccharum officinarum* L) en Colombia. 2017.
34. Velásquez F, Espitia J, Mendieta O, Escobar S, Rodríguez J. Non-centrifugal cane sugar processing: A review on recent advances and the influence of process variables on qualities attributes of final products. *J Food Eng.* 2019;255(March):32-40.
35. S.I.P.A. Departamentos paneleros producción de panela - Colombia 2021.
36. Gibson M. *Pharmaceutical Preformulation and Formulation.* Vol. 199, Pharmaceutical Preformulation and Formulation. 2016.
37. 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;107(10):2653-62.

38. Kulkarni VS, Shaw C. Formulating Creams, Gels, Lotions, and Suspensions. En: *Essential Chemistry for Formulators of Semisolid and Liquid Dosages*. Elsevier; 2016. p. 29-41.
39. WHO. *Topical-semi-solid-dosage-forms*. 2020.
40. Freire M. *Desarrollo de emulsiones dobles y emulsiones dobles gelificadas como análogos de grasa y su aplicación en productos cárnicos funcionales*. [Madrid]: Universidad Complutense de Madrid; 2018.
41. O'Farrell C, Hall TJ, Grover LM, Cox SC. Formulation of an antibacterial topical cream containing bioengineered honey that generates reactive oxygen species. *Biomaterials Advances*. 2022 feb 1;133.
42. Gordon H. Sugar and wound healing. *The Lancet*. 1985;663-4.
43. Nakao H, Yamazaki M, Tsuboi R, Ogawa H. Mixture of sugar and povidone - Iodine stimulates wound healing by activating keratinocytes and fibroblast functions. *Arch Dermatol Res*. 2006 sep;298(4):175-82.
44. Mesa L. *Diseño de un producto cosmético exfoliante tipo gel a escala laboratorio basado en panela*. [Bogotá]: Universidad Nacional de Colombia; 2019.
45. León H. *Diseño de un producto cosmético tipo mascarilla facial emulsionado a escala de laboratorio basado en arcillas y panela*. [Bogotá]: Universidad Nacional de Colombia; 2018.
46. Suárez MC. *Desarrollo de un producto cosmético tipo polvo exfoliante con panela como ingrediente activo*. [Bogotá]: Universidad Nacional de Colombia; 2019.
47. Tharwat F, Tadros T. *Emulsions: Formation, stability, industrial applications*. En: *Emulsion*. 2016.
48. Yamashita Y, Miyahara R, Sakamoto K. *Emulsion and emulsification technology* [Internet]. *Cosmetic Science and Technology: Theoretical Principles and Applications*. Elsevier Inc.; 2017. 489-506 p. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802005-0.00028-8>
49. Effendy I, Maibach HI. Surfactants and experimental irritant contact dermatitis. *Contact Dermatitis*. 1995;33(4):217-25.
50. Paye Marc. *Handbook of Cosmetic Science and Technology*. Second. Paye, Marc. Barel, André. Maibach H, editor. Vol. 53. London: Taylor Francis; 2006. 1689-1699 p.
51. Seweryn A. Interactions between surfactants and the skin – Theory and practice. *Adv Colloid Interface Sci*. 2018 jun 1; 256:242-55.

52. Lémery E, Briançon S, Chevalier Y, Bordes C, Oddos T, Gohier A, et al. Skin toxicity of surfactants: Structure/toxicity relationships. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2015; 469:166-79.
53. Rancan F, Jurisch J, Günday C, Türeli E, Blume-Peytavi U, Vogt A, et al. Screening of surfactants for improved delivery of antimicrobials and poly-lactic-co-glycolic acid particles in wound tissue. *Pharmaceutics.* 2021 jul 1;13(7).
54. Ghafourian T, Nokhodchi A, Kaialy W. Surfactants as penetration enhancers for dermal and transdermal drug delivery. En: *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement: Modification of the Stratum Corneum.* Springer Berlin Heidelberg; 2015. p. 207-30.
55. Srirod S, Tewtrakul S. Anti-inflammatory and wound healing effects of cream containing Curcuma mangga extract. *J Ethnopharmacol.* 2019;238(March).
56. Jagtap NS, Khadabadi SS, Farooqui IA, Nalamwar VP, Sawarkar HA. Development and evaluation of herbal wound healing formulations. *Int J Pharmtech Res.* 2009;1(4):1104-8.
57. Shamsu J. Formulation and evaluation of herbal skin for wound healing. 2017.
58. Steinbrenner I, Houdek P, Pollok S, Brandner JM, Daniels R. Influence of the oil phase and topical formulation on the wound healing ability of a birch bark dry extract. *PLoS One.* 2016;11(5):1-17.
59. Namjoyan F, Kiashi F, Moosavi ZB, Saffari F, Makhmalzadeh BS. Efficacy of Dragon's blood cream on wound healing: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *J Tradit Complement Med.* 2016 ene 1;6(1):37-40.
60. Baie SH, Sheikh KA. The wound healing properties of Channa striatus-cetrimide cream-tensile strength measurement. *J Ethnopharmacol [Internet].* 2000; 71:93-100. Disponible en: www.elsevier.com/locate/jethpharm
61. Kuhlmann N, Heinbockel L, Correa W, Gutschmann T, Goldmann T, Englisch U, et al. Peptide drug stability: The anti-inflammatory drugs Pep19-2.5 and Pep19-4LF in cream formulation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2018 mar 30; 115:240-7.
62. Sadaf F, Saleem R, Ahmed M, Ahmad SI, Navaid-ul-Zafar. Healing potential of cream containing extract of *Sphaeranthus indicus* on dermal wounds in Guinea pigs. *J Ethnopharmacol.* 2006 sep 19;107(2):161-3.
63. Beaulieu A. Wound healing formulation containing human plasma fibronectin. 1998.
64. Akman EE. Herbal supplement cream used in cancer patients. 2021.

65. Gupta N. An improved topical pharmaceutical composition comprising nanonized silver sulfadiazine. 2012.
66. Farber E. Allantoin-containing skin cream. 2005. p. 1-17.
67. Purnamawati S, Indrastuti N, Danarti R, Saefudin T. The role of moisturizers in addressing various kinds of dermatitis: A review. *Clin Med Res*. 2017;15(3-4):75-87.
68. Draelos ZD. New treatments for restoring impaired epidermal barrier permeability: Skin barrier repair creams. *Clin Dermatol*. 2012;30(3):345-8.
69. Panzuti P, Vidémont E, Fantini O, Fardouet L, Noël G, Cappelle J, et al. A moisturizer formulated with glycerol and propylene glycol accelerates the recovery of skin barrier function after experimental disruption in dogs. *Vet Dermatol*. 2020 oct 1;31(5):344-e89.
70. Klotz T, Munn Z, Aromataris E, Greenwood J. The effect of moisturizers or creams on scars: A systematic review protocol. *JBI Database System Rev Implement Rep*. 2017;15(1):15-9.
71. Grada A, Mervis J, Falanga V. Research Techniques Made Simple: Animal Models of Wound Healing. *Journal of Investigative Dermatology*. 2018;138(10):2095-2105.e1.
72. Sami DG, Heiba HH, Abdellatif A. Wound healing models: A systematic review of animal and non-animal models. *Wound Medicine [Internet]*. 2019;24(1):8-17. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.wndm.2018.12.001>
73. Gurtner GC, Wong VW, Sorkin M, Glotzbach JP, Longaker MT. Surgical approaches to create murine models of human wound healing. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011.
74. Glicerio I, El-Amin I, Mendenhall V. Animal Models for Wound Healing [Internet]. *Skin Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Elsevier Inc.; 2016. 387-400 p. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801654-1.00019-X>
75. Sami DG, Heiba HH, Abdellatif A. Wound healing models: A systematic review of animal and non-animal models. *Wound Medicine*. 2019 mar 1;24(1):8-17.
76. Porras DO. Contribución al desarrollo de una formulación líquida de administración oral para un extracto de hojas de *Passiflora quadrangularis* L aplicando los conceptos del enfoque de calidad basada en el diseño (QbD). [Bogotá]: Universidad Nacional de Colombia; 2019.
77. Henao M. Contribución al estudio de formulación de un producto cosmético de uso capilar basado en aceite de aguacate. 2016.
78. Gómez M, Velázquez S, Villafuerte L. Distribución del tamaño de micropartículas lipídicas sólidas de ácido esteárico obtenidas por fusión-emulsificación. *Revista Mexicana*

de Ciencias Farmacéuticas [Internet]. 2008;39(4). Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57911113006>

79. ICONTEC. NORMA TÉCNICA NTC COLOMBIANA 1311. 2009.

80. Alarcón AL, Palacios LM, Osorio C, César Narváez P, Heredia FJ, Orjuela A, et al. Chemical characteristics and colorimetric properties of non-centrifugal cane sugar ("panela") obtained via different processing technologies. *Food Chem.* 2021 mar 15;340.

81. Guerra MJ, Mujica V. Physical and chemical properties of granulated cane sugar «panelas». *Food Sci Technol.* 2010;30(1).

82. Jaffé WR. Nutritional and functional components of non-centrifugal cane sugar: A compilation of the data from the analytical literature. Vol. 43, *Journal of Food Composition and Analysis.* Academic Press Inc.; 2015. p. 194-202.

83. Negut I, Grumezescu V, Grumezescu AM. Treatment strategies for infected wounds. *Molecules.* 2018 sep 18;23(9).

84. Bessa LJ, Fazii P, di Giulio M, Cellini L. Bacterial isolates from infected wounds and their antibiotic susceptibility pattern: Some remarks about wound infection. *Int Wound J.* 2015 feb 1;12(1):47-52.

85. Sisay M, Worku T, Edessa D. Microbial epidemiology and antimicrobial resistance patterns of wound infection in Ethiopia: A meta-analysis of laboratory-based cross-sectional studies. *BMC Pharmacol Toxicol.* 2019 may 30;20(1).

86. Lara N, Clavijo A, Barrera V. Modelación de la Solubilidad de Panela Granulada y Otros Edulcorantes en Agua. *Revista Tecnológica ESPOL-RTE.* 2010; 23:25-31.

87. Chirife, Le6n Herszage J, Joseph A, Kohn3 ES. In Vitro Study of Bacterial Growth Inhibition in Concentrated Sugar Solutions: Microbiological Basis for the Use of Sugar in Treating Infected Wounds. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 1983;23(5):766-73. Disponible en: <http://aac.asm.org/>

88. Rowe R, Sheskey P, Quinn M. *Handbook of Pharmaceutical Excipients.* 2009.

89. Barnes H. *An Introduction to Rheology.* 1989.

90. Schramm LL. *Emulsions, Foams, and Suspensions.* Emulsions, Foams, and Suspensions. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2006.

91. Sherman BP. The Influence of Emulsifying Agent Concentration on Emulsion Viscosity. *Kolloid-Zeitschrift.* 1959;165(2).

92. Derkach SR. Rheology of emulsions. *Adv Colloid Interfase Sci.* 2009 oct 30;151(1-2):1-23.

93. Sherman P. Studies in water in oil emulsions. IV. The influence of the emulsifying agent on the viscosity of water in oil emulsions of high-water content. *J Colloid Sci.* 1955;10(1).
94. Percival SL, McCarty S, Hunt JA, Woods EJ. The effects of pH on wound healing, biofilms, and antimicrobial efficacy. *Wound repair and regeneration.* 2014;22(2):174-86.
95. Schneider LA, Korber A, Grabbe S, Dissemond J. Influence of pH on wound-healing: A new perspective for wound-therapy? *Arch Dermatol Res.* 2007 feb;298(9):413-20.
96. Sharma S, Shukla P, Misra A, Mishra PR. Interfacial and colloidal properties of emulsified systems: Pharmaceutical and biological perspective. *Pharmaceutical and biological perspective.* En: *Colloid and Interfase Science in Pharmaceutical Research and Development.* Elsevier Inc.; 2014. p. 149-72.
97. Lu GW, Gao P. Emulsions and Microemulsions for Topical and Transdermal Drug Delivery. En: *Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems.* Elsevier; 2010. p. 59-94.
98. Tadros T. Application of rheology for assessment and prediction of the long-term physical stability of emulsions. *Adv Colloid Interfase Sci.* 2004 may 20;108-109:227-58.
99. Rosen MJ. *Surfactants and Interfacial Phenomena* [Internet]. 2004. Disponible en: www.copyright.com.
100. Wilde PJ. *Improving Emulsion Stability Through Selection of Emulsifiers and Stabilizers.* Reference Module in Food Science. 2019.
101. Lawson J. *Design and Analysis of Experiments with R.* 2015.
102. Fang XL, Han LR, Cao XQ, Zhu MX, Zhang X, Wang YH. Statistical optimization of process variables for antibiotic activity of *Xenorhabdus bovienii*. *PLoS One.* 2012 jun 6;7(6).
103. Ahmadi D, Mahmoudi N, Heenan RK, Barlow DJ, Lawrence MJ. The influence of co-surfactants on lamellar liquid crystal structures formed in creams. *Pharmaceutics.* 2020 sep 1;12(9):1-22.
104. Suzuki T. Effect of molecular assembly for emulsion and gel formulations. En: *Cosmetic Science and Technology: Theoretical Principles and Applications.* Elsevier Inc.; 2017. p. 519-37.
105. Libre Texts. *Organic Chemistry* [Internet]. 2022. Disponible en: <https://LibreTexts.org>
106. Tcholakova S, Denkov ND, Banner T. Role of surfactant type and concentration for the mean drop size during emulsification in turbulent flow. *Langmuir.* 2004 ago 31;20(18):7444-58.

107. Pandolfe WD. Effect of premix condition, surfactant concentration, and oil level on the formation of oil-in-water emulsions by homogenization. *J Dispers Sci Technol*. 1995 nov 1;16(7):633-50.
108. Hasani F, Pezeshki A, Hamishehkar H. Effect of Surfactant and Oil Type on Size Droplets of Betacarotene-Bearing Nanoemulsions. *IntJCurrMicrobiolAppSci* [Internet]. 2015;4(9):146-55. Disponible en: <http://www.ijcmas.com>
109. Abismai"labismai"l B, Canselier JP, Wilhelm AM, Delmas H, Gourdon C. Emulsification by ultrasound: drop size distribution and stability. *Ultrason Sonochem*. 1999; 6:75-83.
110. Mulia K, Safiera A, Pane IF, Krisanti EA. Effect of high-speed homogenizer speed on particle size of polylactic acid. *J Phys Conf Ser*. 2019 may 10;1198(6).
111. Maa YF, Hsu C. Liquid-liquid emulsification by rotor/stator homogenization. *Journal of Controlled Release*. 1996; 38:219-28.
112. Salager J, Andérez J, Briceño M, Pérez M, Ramirez M. Emulsification yield related to formulation and composition variables as well as stirring energy. *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería*. 2002;25(3).
113. Ramisetty KA, Pandit AB, Gogate PR. Ultrasound assisted preparation of emulsion of coconut oil in water: Understanding the effect of operating parameters and comparison of reactor designs. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. 2015 feb 1; 88:70-7.
114. Sun C, Gunasekaran S. Effects of protein concentration and oil-phase volume fraction on the stability and rheology of menhaden oil-in-water emulsions stabilized by whey protein isolate with xanthan gum. *Food Hydrocoll*. 2009 ene;23(1):165-74.
115. Dapčević Hadnadev T, Dokić P, Krstonošić V, Hadnadev M. Influence of oil phase concentration on droplet size distribution and stability of oil-in-water emulsions. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2013 mar;115(3):313-21.
116. Luo X, Zhou Y, Bai L, Liu F, Zhang R, Zhang Z, et al. Production of highly concentrated oil-in-water emulsions using dual-channel microfluidization: Use of individual and mixed natural emulsifiers (saponin and lecithin). *Food Research International*. 2017 jun 1; 96:103-12.
117. Rodrigues MI, Lemma AF. *Experimental Design Process Optimization*. 2015.
118. Yulianingsih R, Gohtani S. The influence of stirring speed and type of oil on the performance of pregelatinized waxy rice starch emulsifier in stabilizing oil-in-water emulsions. *J Food Eng*. 2020 sep 1;280.

119. Barnes HA. Rheology of emulsions- A review. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 1994; 91:89-95.
120. Pal R. Effect of Droplet Size on the Rheology of Emulsions. *AIChE Journal.* 1996;42(11):3181-90.
121. Dłuewska E, Stobiecka A, Maszewska M. Effect of oil phase concentration on rheological properties and stability of beverage emulsions. *ACTA Acta Sci Pol, Technol Aliment.* 2006;5(2):147-56.
122. Alibaba. PEG-100 estearato. 2022.
123. Naeeni SK, Pakzad L. Droplet size distribution and mixing hydrodynamics in a liquid–liquid stirred tank by CFD modeling. *International Journal of Multiphase Flow.* 2019 nov 1;120.
124. Pérez-Bueno T, Rodríguez-Perdomo Y, Morales-Lacarrere I, María Soler-Roger D, de La N, Martín-Viaña P. Comportamiento reológico y extensibilidad de una formulación semisólida a partir del extracto acuoso de *Rhizophora mangle* L. *Tecnol Ciencia Ed (IMIQ).* 2011;26(2):75-9.
125. Rodriguez A, Paños I. Estudio reológico de emulsiones semisólidas de aplicación cutánea. *An R Acad Nac Farm [Internet].* 2004; 70:307-24. Disponible en: www.robopdf.com
126. Pérez D, de La Paz N, Fernández M, Mantilla N, Peña M, Menéndez A. Optimization, physical-chemical evaluation and healing activity of chitosan ointment. *J Pharm Pharmacogn Res [Internet].* 2019;7(4):297-309. Disponible en: <http://jppres.com/jppreshttp://jppres.com/>
127. Li Z, Bui HS. Factors Affecting Cosmetics Adhesion to Facial Skin. En: *Surface Science and Adhesion in Cosmetics.* 2021.
128. Eudier F, Savary G, Grisel M, Picard C. Skin surface physico-chemistry: Characteristics, methods of measurement, influencing factors and future developments. *Adv Colloid Interfase Sci.* 2019 feb 1; 264:11-27.
129. Miner P. Emulsion rheology: creams and lotions. En: *Rheological Properties of Cosmetics and Toiletries.* 1995.
130. Masmoudi H, Piccerelle P, le Dréau Y, Kister J, le Dré au Y. A Rheological Method to Evaluate the Physical Stability of Highly Viscous Pharmaceutical Oil-in-Water Emulsions. *Pharm Res [Internet].* 2006;23(8). Disponible en: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-03542960>
131. Tadros TF. Fundamental principles of emulsion rheology and their applications. *Colloids and Surfaces Physicochemical and Engineering Aspects.* 1994; 91:39-55.

132. Brummer R. Rheology of Cosmetic Emulsions. En 2013.
133. Bummer R. Rheology Essentials of Cosmetic and Food Emulsions. 2005.
134. European Medicines Agency. ICH Topic Q 1 A (R2) Stability Testing of new Drug Substances and Products Step 5 NOTE FOR GUIDANCE ON STABILITY TESTING: STABILITY TESTING OF NEW DRUG SUBSTANCES AND PRODUCTS [Internet]. 2003. Disponible en: <http://www.emea.eu.int>
135. Urrutia PI. Predicting water-in-oil emulsion coalescence from surface pressure isotherms [Internet]. [Calgary]: University of Calgary; 2007. Disponible en: <http://hdl.handle.net/1880/101949>
136. Masson-Meyers DS, Andrade TAM, Caetano GF, Guimaraes FR, Leite MN, Leite SN, et al. Experimental models and methods for cutaneous wound healing assessment. *Int J Exp Pathol*. 2020 feb 1;101(1-2):21-37.
137. Vizcaino M, Alarcón I, Sebazco C, Maceira M. Importancia de la sacarosa para la cicatrización de heridas infectadas. *Revista Cubana de Medicina Militar* [Internet]. 2013;42(1):49-55. Disponible en: <http://scielo.sld.cu>
138. Parente LML, Lino Júnior RDS, Tresvenzol LMF, Vinaud MC, de Paula JR, Paulo NM. Wound healing and anti-inflammatory effect in animal models of calendula officinalis L. growing in Brazil. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2012;2012.
139. Preethi KC, Kuttan R. WOUND HEALING ACTIVITY OF FLOWER EXTRACT OF CALENDULA OFFICINALIS. India; 2009.
140. Nicolaus C, Junghanns S, Hartmann A, Murillo R, Ganzera M, Merfort I. In vitro studies to evaluate the wound healing properties of Calendula officinalis extracts. *J Ethnopharmacol*. 2017 ene 20; 196:94-103.
141. Bhargava S, Kumar U, Kroumpouzou G. Subcorneal pustular dermatosis: Comprehensive review and report of a case presenting during pregnancy. *Int J Womens Dermatol*. 2020 jun 1;6(3):131-6.
142. Milde R, Ritter J, Tennent GA, Loesch A, Martinez FO, Gordon S, et al. Multinucleated Giant Cells Are Specialized for Complement-Mediated Phagocytosis and Large Target Destruction. *Cell Rep*. 2015 dic 1;13(9):1937-48.
143. Kumar P, Kumar S, Udupa EP, Kumar U, Rao P, Honnegowda T. Role of angiogenesis and angiogenic factors in acute and chronic wound healing. *Plast Aesthet Res*. 2015;2(5):243.