



**Universidad Andrés Bello
Facultad de Medicina
Escuela de Química y Farmacia**

**“DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA
CUANTIFICACIÓN DEL ACETIL HEXAPEPTIDO – 8 EN UN PRODUCTO
COSMÉTICO ANTI-EDAD A TRAVÉS DE LA TÉCNICA DE
ESPECTROFOTOMETRÍA UV – VISIBLE”**

Unidad de Investigación para optar al Título de Químico Farmacéutico

JOSEFA ANDREA LEIVA PINCHEIRA

Laboratorio de Farmacia Química y Farmacognosia

**Alejandro Charmell Jameson
DIRECTOR**

**Eva Graf Finckenstein
CODIRECTOR**

Santiago de Chile, diciembre, 2023.



Universidad Andrés Bello
Facultad de Medicina
Escuela de Química y Farmacia

**“DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA
CUANTIFICACIÓN DEL ACETIL HEXAPÉPTIDO – 8 EN UN PRODUCTO
COSMÉTICO ANTI-EDAD A TRAVÉS DE LA TÉCNICA DE
ESPECTROFOTOMETRÍA UV – VISIBLE”**

Unidad de Investigación para optar al Título de Químico Farmacéutico

JOSEFA ANDREA LEIVA PINCHEIRA

Laboratorio de Farmacia Química y Farmacognosia

Profesor (a) Corrector:
Fernando Torres Moscoso

Profesor(a) Corrector:
Aleida Kulikoff Bravo



DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Se declara por este medio que el trabajo de titulación presentado para su defensa y evaluación es original; las fuentes, herramientas y aplicaciones utilizadas que contribuyeron a la investigación realizada están debidamente citadas en el texto y acreditadas en el apartado de las referencias, conforme con los requisitos que establece el estilo bibliográfico Vancouver y respetando los aspectos que conciernen a la propiedad intelectual.

Por lo tanto, ante cualquier falta de integridad académica encontrada y que atente contra la Ley N°17.336 de Propiedad Intelectual, se asume la responsabilidad que representa para tal efecto, dejando constancia de ello, con fecha __04__ de __Julio__ de __2024__, en la ciudad de _____Santiago de Chile_____.

Facultad de Medicina

Escuela de Química y Farmacia

Título del trabajo: **DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL ACETIL HEXAPEPTIDO – 8 EN UN PRODUCTO COSMÉTICO ANTI-EDAD A TRAVÉS DE LA TÉCNICA DE ESPECTROFOTOMETRÍA UV – VISIBLE**

Josefa Leiva Pincheira

Nombre y firma del autor

Fernando Torres Moscoso

Químico Farmacéutico Universidad Andrés Bello.

Diplomado en Diseño Curricular y Evaluación de los Aprendizajes.

Magister en Farmacia Mención Clínica, Universidad Andrés Bello.

Magister en Docencia para la Educación Superior, Universidad Andrés Bello.

Profesor de Toxicología Clínica y Forense.

Director de Escuela Química y Farmacia, Universidad Andrés Bello.

Aleida Kulikoff Bravo

Químico Farmacéutico Universidad de Chile.

Diplomado en Toxicología Clínica, Pontificia Universidad Católica de Chile.

Diplomado en Neurobiología de las drogas de abuso Pontificia Universidad Católica de Chile.

Diplomado en Gestión de Calidad Laboratorios Clínicos y Forenses, Universidad de Santiago de Chile.

MBA, Mención Gestión de Calidad, Universidad Diego Portales.

Máster en Administración de Negocios, Universidad Pompeu Fabra, Barcelona.

Profesora de Toxicología Clínica y Forense, Universidad Andrés Bello.

Secretaria Académica de la Escuela de Química y Farmacia, Universidad Andrés Bello.

Alejandro Charmell Jameson

Licenciado en Química Universidad de Los Andes, Venezuela

Docente en Instituto Universitario de Tecnología y Administración, Venezuela

Magister en Docencia para la Educación Superior Universidad Andrés Bello.

Profesor de la asignatura Gestión y Control de la Calidad de la Universidad Andrés Bello.

Eva Graf Finckenstein

Químico Farmacéutico, Universidad de Chile

Profesora de Tecnología Cosmética, Escuela de Química y Farmacia, Universidad Andrés Bello

Magister en Docencia para la Educación Superior, Universidad Andrés Bello

Asesora Técnica de Asuntos Regulatorios ante ISP.

Índice de Contenido

I. ÍNDICE DE FIGURAS	9
II. ÍNDICE DE TABLAS	10
III. ÍNDICE DE GRÁFICOS	11
1. INTRODUCCIÓN	14
2. MARCO TEÓRICO	15
2.1 Características de la Piel y el Envejecimiento.....	15
2.2 Péptidos de Uso Cosméticos.....	16
2.2.1 Mecanismo de Acción de los Péptidos.....	18
2.3 Legislación Chilena sobre Productos Cosméticos	19
2.4 Control de Calidad de Cosméticos.	20
2.5 Espectrofotometría UV – VIS.....	22
2.5.1 Tipos de Transiciones Electrónicas.....	23
2.6 Ley de Lambert – Beer	26
2.6.1 Ley de Lambert:.....	27
2.6.2 Ley de Beer	28
2.6.3 Limitaciones de la Ley de Lamber – Beer	28
2.7 Componentes Básicos de un Espectrofotómetro	29
2.8 Barrido Espectral	32
2.9 Curva de Calibración.....	33
2.10 Cuantificación Analítica	34
2.11. Planteamiento del problema	35
3. HIPÓTESIS	37
4. OBJETIVOS	39
4.1 Objetivo General.....	39
4.2. Objetivos Específicos.....	39

5. METODOLOGÍA	41
5.1. Materiales.....	41
5.2 Equipos e Instrumentos	41
5.3 Etapas del Desarrollo Analítico.	42
5.3.1 Etapa 1. Caracterización fisicoquímica del cosmético de uso tópico que contiene Acetil Hexapéptido – 8.....	42
5.3.2 Etapa 2. Evaluación de los parámetros analíticos para la cuantificación de Acetil Hexapéptido – 8 e cosméticos Anti- edad de uso tópico.	44
5.3.3 Etapa 3. Implementación el método desarrollado para la determinar la cuantificación del activo en cosméticos Anti - Edad.	57
5.3.4 Etapa 4. Reporte de los resultados analíticos obtenidos en la cuantificación de Acetil Hexapéptido – 8 en cosméticos Anti- edad de uso tópico, a través de la técnica de espectrofotometría UV- Vis.....	61
6. RESULTADOS	64
6.1 Características fisicoquímicas del cosmético de uso tópico que contiene Acetil Hexapéptido – 8.....	64
6.2 Evaluación de la interferencia de los solventes en la determinación del Acetil Hexapéptido – 8 a través de la técnica Espectrofotometría UV-Vis.....	65
6.3 Evaluación de la interferencia de los solventes junto a la matriz cosmética en la determinación del Acetil Hexapéptido – 8.	68
6.4 Barrido espectrofotométrico de la solución de referencia del activo cosmético Acetil Hexapéptido – 8.....	71
6.5 Verificación del comportamiento lineal de la técnica a diferentes concentraciones de interés, de acuerdo con la Ley de Lambert-Beer para λ_{max} seleccionada.	72
6.6 Aplicación del Método de Adición de Estándar a la crema formulada por presencia de interferencias	79
7. DISCUSIÓN	83
8. CONCLUSIONES	90
9. BIBLIOGRAFÍA	93

I. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema general de la síntesis de péptidos en fase solida	17
Figura 2. Estructura química de Acetil Hexapéptido – 8.....	19
Figura 3. Espectro electromagnético	22
Figura 4. Niveles de energía de los orbitales moleculares y sus transiciones	24
Figura 5. Atenuación de un haz de radiación por una solución absorbente	27
Figura 6. Cambios en la intensidad exponencialmente del medio absorbente	28
Figura 7. Partes básicas de un espectrofotómetro de absorción.....	32
Figura 8. Relación de Absorbancia v/s Concentración en espectrofotometría UV-Vis	35

II. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 5.1 Formulación de la crema cosmética.....	42
Tabla 6.1. pH de las formulaciones cosméticas.....	64
Tabla 6.2. Características organolépticas de la crema cosmética	64
Tabla 6.3 Primera curva de calibración utilizando como solvente NaOH 0,1 M....	74
Tabla 6.4. Segunda curva de calibración utilizando como solvente NaOH 0,1M..	76
Tabla 6.5. Tercera curva de solución de referencia con mezcla solvente Acetato de amonio 40 mM:ACN (70:30).....	78

III. ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Barrido espectrofotométrico del Agua.....	65
Gráfico 2. Barrido espectrofotométrico del solvente Acetato de Etilo.....	66
Gráfico 3. Barrido espectrofotométrico del solvente Cloroformo	67
Gráfico 4. Barrido espectrofotométrico de la mezcla de Acetato de Amonio 40 mM: ACN (70:30)	67
Gráfico 5. Barrido espectrofotométrico de la matriz cosmética en Agua	68
Gráfico 6. Barrido espectrofotométrico de la matriz cosmética en Acetato de Etilo	69
Gráfico 7. Barrido espectrofotométrico de la matriz cosmética en Cloroformo.....	70
Gráfico 8. Barrido espectrofotométrico de la matriz cosmética con la mezcla Acetato de Amonio 40 mM: ACN (70:30) (70:30).....	70
Gráfico 9. Barrido espectrofotométrico de la Solución referente Argireline® 1×10^{-5} M en Agua.....	71
Gráfico 10. Barrido espectrofotométrico de la Solución referente Argireline® 1×10^{-5} M en NaOH 0,1M	72
Gráfico 11. Barridos espectrofotométricos de la primera curva de calibración de las soluciones de referencia con NaOH 0,1 M	73
Gráfico 12. Primera curva de calibración con NaOH 0,1M.....	74
Gráfico 13. Barridos espectrofotométricos de la segunda curva de calibración de las soluciones de referencia con NaOH 0,1 M	75
Gráfico 14. Segunda curva de calibración con NaOH 0,1M.....	76
Gráfico 15. Barridos espectrofotométricos de la curva de calibración de las soluciones de referencia con la mezcla 70:30.....	77
Gráfico 16. Tercera curva de calibración con la mezcla Acetato de amonio 40mM: ACN (70:30)	78
Gráfico 17. Curva de adición de estándar	79

RESUMEN

El Acetil-Hexapéptido-8 o Argireline[®], es un activo cosmético con propiedades anti-edad y anti-arrugas, pertenece a la categoría de inhibidores de neurotransmisores. Al penetrar la membrana cutánea, este compuesto inhibe de manera reversible la liberación de acetilcolina, induciendo la relajación del músculo facial y reduciendo la expresión de arrugas.

De acuerdo con el Decreto Supremo N° 239/02 de la República de Chile, todos los productos cosméticos deben contar con un registro sanitario autorizado por el Instituto de Salud Pública (ISP) para su comercialización y distribución.

La cuantificación del activo cosmético puede realizarse mediante diversas técnicas analíticas. Entre estas, la espectrofotometría de absorción ultravioleta y visible es preferida por su simplicidad y costos de ejecución reducidos.

Este trabajo, de seminario de título, planteó demostrar que el Acetil Hexapéptido – 8 contenido en una crema cosmética Anti-edad es cuantificable a través de la técnica de espectrofotometría UV – Vis.

La metodología se realizó en cuatro etapas: la primera consta de la caracterización de las propiedades fisicoquímicas de la crema cosmética que contiene Acetil Hexapéptido – 8, en la segunda etapa se describieron los parámetros analíticos para evaluar las interferencias de la matriz cosmética en conjunto de diferentes solventes, en la tercera etapa se implementó el método desarrollado para la determinación del activo mediante un método de adición de estándar y por último; en la cuarta etapa se elaboró el reporte de los resultados analíticos obtenidos en la cuantificación de este Hexapéptido en cosméticos Anti-edad de uso tópico. Se postula que el Acetil Hexapéptido – 8 contenido en una crema cosmética anti-edad podría ser cuantificable a través de la técnica de espectrofotometría UV – Vis utilizando una metodología de derivación química, para generar la transformación del analito a una especie cuyos grupos cromóforos presenten una longitud de onda de máxima de absorción no coincidente con la de aquellos ingredientes que evidencien interferencias fotométricas

Introducción y Marco teórico

1. INTRODUCCIÓN

El Químico Farmacéutico desempeña un papel crucial en la salud pública al supervisar la producción y dispensación de medicamentos y/o productos destinados para el cuidado de la piel. Su función incluye asegurar y garantizar el uso adecuado de estos elementos para resguardar la salud de la población y llevar a cabo evaluaciones de procesos de calidad y análisis de principios activos y/o activos cosméticos en la industria farmacéutica y cosmética.

El Sistema de Gestión de la Calidad (SGC) comprende una serie de actividades relacionadas entre sí orientadas en garantizar la calidad de un producto en una organización, por lo que la importancia de esto es velar por la satisfacción del consumidor y proveer la adecuada confianza que una organización es capaz de cumplir con los requisitos mínimos de calidad que se necesitan. El control de calidad se define como un conjunto de normas que permiten estandarizar procesos para mejorar los requerimientos de calidad de productos o servicios, asegurando que estos cumplan con las especificaciones establecida y descartando posibles errores. Es responsabilidad de las Industrias cosméticas la aplicación de proporcionar recursos necesarios para cumplir con los estándares establecidos y del aseguramiento de la calidad. **(12)**.

La característica principal de las metodologías analíticas empleadas en los laboratorios de control de calidad es entregar resultados confiables y obtener respuestas concluyentes en el menor tiempo posible. El desarrollo de éstas para evaluar la calidad de productos farmacéuticos y/o cosméticos requiere tomar en consideración las características de las especies químicas involucradas, es decir tanto las sustancias activas como las matrices que la acompañan, y de este modo permitir transformar los productos en muestras apta para su análisis. En esta unidad de investigación se desarrolló una metodología analítica para la cuantificación de Acetil Hexapéptido – 8 contenido en cremas cosméticas anti-edad a través de la técnica de espectrofotometría UV-Vis.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Características de la Piel y el Envejecimiento

La piel desempeña una serie de funciones vitales y protectoras para el organismo, no solo actúa como barrera contra agentes físicos, químicos y microorganismos, sino que también contribuye a mantener la salud general. Su integridad es esencial para una piel saludable, lo que a su vez se traduce en una apariencia atractiva y juvenil. No obstante, es importante tener en cuenta que factores como la dotación genética y el estilo de vida influyen en la salud cutánea. Además, la exposición constante a diversos agentes externos provoca un proceso continuo y gradual de envejecimiento de la piel. **(1)**.

El envejecimiento cutáneo se produce de forma natural con el paso de los años y debido a la exposición de factores ambientales. Esta manifestación se refleja en la aparición de arrugas, hiperpigmentación y sequedad, estos efectos son principalmente atribuibles a la disminución gradual de la producción de colágeno y elastina, las proteínas predominantes en la dermis que proporcionan firmeza, resistencia y flexibilidad a la piel **(1)**. Las investigaciones sobre el envejecimiento han impulsado a desarrollar productos cosméticos innovadores con ingredientes activos para mejorar la apariencia de la piel. Estos productos buscan reducir los signos del envejecimiento y mejorar la calidad de la piel de manera efectiva. **(2)**.

De acuerdo con el Artículo N° 106 del Código Sanitario; “Un producto cosmético se define como cualquier preparado que se destine a ser aplicado de forma tópica externamente, con fines de embellecimiento, modificación de su aspecto físico o conservación de las condiciones fisicoquímicas normales de la piel y sus anexos” **(3)**. Por otro lado, un producto Anti-edad, llamado “cosmeceúticos”, es un cosmético tópico que contiene un activo para mantener propiedades como elasticidad, firmeza, sequedad y prevenir arrugas **(4)**.

Se han realizado múltiples investigaciones científicas para crear productos tópicos anti-edad y anti-arrugas que ofrecen diversos beneficios en la piel. Estos productos buscan mejorar la apariencia de la piel y reducir los signos de envejecimiento. Se utilizan ingredientes cosméticos como retinoides, niacinamida, ácido hialurónico, antioxidantes y vitamina E. En esta investigación, nos centraremos en los péptidos **(5)**.

2.2 Péptidos de Uso Cosméticos

En los últimos 20 años, los péptidos se han ido incorporando progresivamente en la industria cosmética, su uso ha sido de gran impacto en los productos cosméticos ya que tienen la capacidad de penetrar la capa más externa de la piel hasta la más interna, siendo capaces de desencadenar funciones específicas para estimular la producción de colágeno y elastina para mejorar la firmeza, grosor y elasticidad de la piel **(6)**. Son moléculas que están compuestas por una cadena corta de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, se encuentran de manera natural en el organismo actuando como mensajeros celulares **(6)**.

La síntesis de péptidos ha impulsado proyectos de investigación que exploran estructuras proteicas, mecanismos de acción y diversas aplicaciones. Esta síntesis se realiza mediante dos procesos: en disolución o en fase sólida. La síntesis en disolución, un método clásico, implica la necesidad de aislar y purificar el péptido, lo que consume más tiempo y recursos de producción. La purificación de péptidos se realiza mediante técnicas de separación que consisten en una combinación de métodos en la que se incluyen las técnicas cromatográficas. En el caso de la síntesis en fase sólida, el péptido se incorpora en solventes orgánicos, en donde va sintetizando anclado sobre un soporte de resina, este anclaje permite bloquear el extremo C-terminal del primer aminoácido, además, este proceso es más rápido **(7)**.

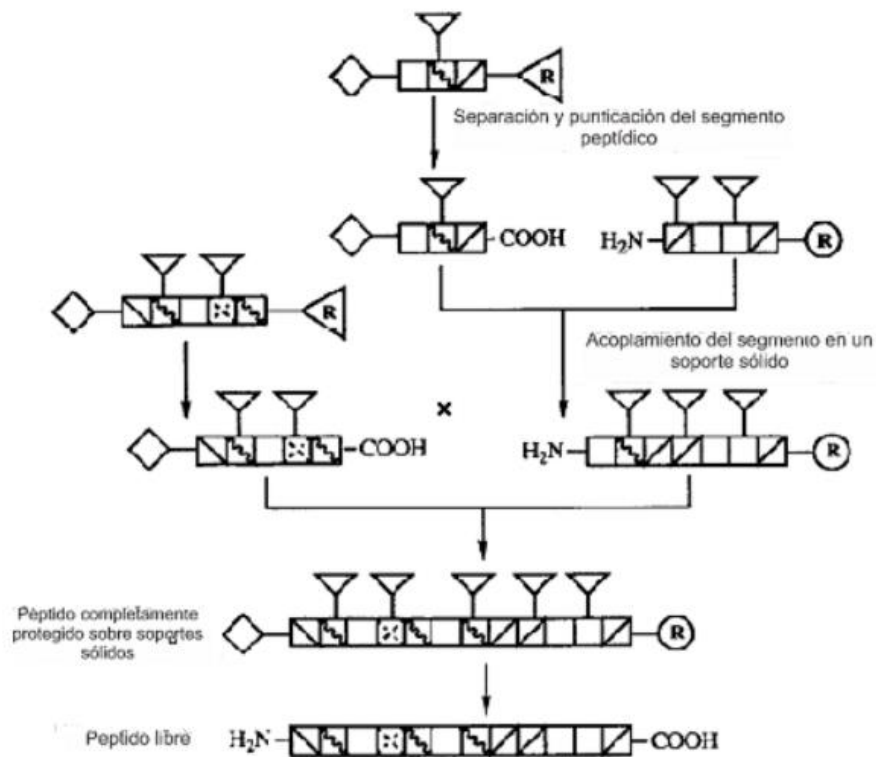


Figura 1. Esquema general de la síntesis de péptidos en fase sólida

Fuente: Calderon Sierra A. Desarrollo histórico y perspectivas de la síntesis de péptidos en fase sólida. [Tesis de pregrado]. Bogotá D.C, Colombia. 2017.

La cromatografía de fase reversa es el método predominante para separar péptidos, permitiendo la eliminación de impurezas. La pureza del péptido después de la síntesis se determina al comparar el porcentaje del péptido deseado con las impurezas que absorben en la misma longitud de onda. El nivel de pureza necesario variará en función de la aplicación prevista para el péptido sintético (7).

2.2.1 Mecanismo de Acción de los Péptidos

Existen tres categorías de péptidos según su mecanismo de acción, los péptidos de señalización, péptidos transportadores y péptidos inhibidores de neurotransmisores como es el Acetil Hexapéptido – 8. **(6)**.

- **Péptidos de Señalización:** Desencadenan una cascada de señalización que estimula la producción de proteínas en la matriz extracelular de la piel, actúan como mensajeros provocando el crecimiento y la activación de fibroblastos, por ende, el aumento de la producción de colágeno, elastina y ácido hialurónico. Esto genera que disminuyan las líneas de expresión y arrugas cutáneas, aumenta la elasticidad y firmeza de la piel, un ejemplo el palmitoil tripéptido – 3 **(8)**.
- **Péptidos transportadores:** Tienen la capacidad de penetrar la membrana celular de la dermis y transportar metales esenciales como el cobre, estimulando la producción de colágeno en la síntesis enzimática de procesos metabólicos, un ejemplo el complejo tripéptido de cobre **(9)**.
- **Inhibidores de neurotransmisores:** El Acetil-Hexapéptido - 8 es un péptido hidrofílico que se ha ido incorporando en los productos cosméticos para reducir las arrugas debajo de los ojos y los surcos de la frente, arrugas llamadas dinámicas que se deben a los movimientos musculares del rostro. Pertenece a la categoría de los inhibidores de neurotransmisores, el cual imita la secuencia de aminoácidos de la proteína sináptica SNAP-25, que gestiona el acoplamiento y fusión de vesículas a través del complejo SNARE en el terminal sináptico para la liberación de acetilcolina y se genere la sinapsis entre la neurona y el músculo para la posterior contracción muscular proveniente del estímulo nervioso **(8)**. Por lo que estos péptidos al penetrar la membrana cutánea evitan que se libere la acetilcolina, provocando la relajación del músculo facial y disminución de la expresión de arrugas dinámicas, un ejemplo el pentapéptido – 3 **(9)**.

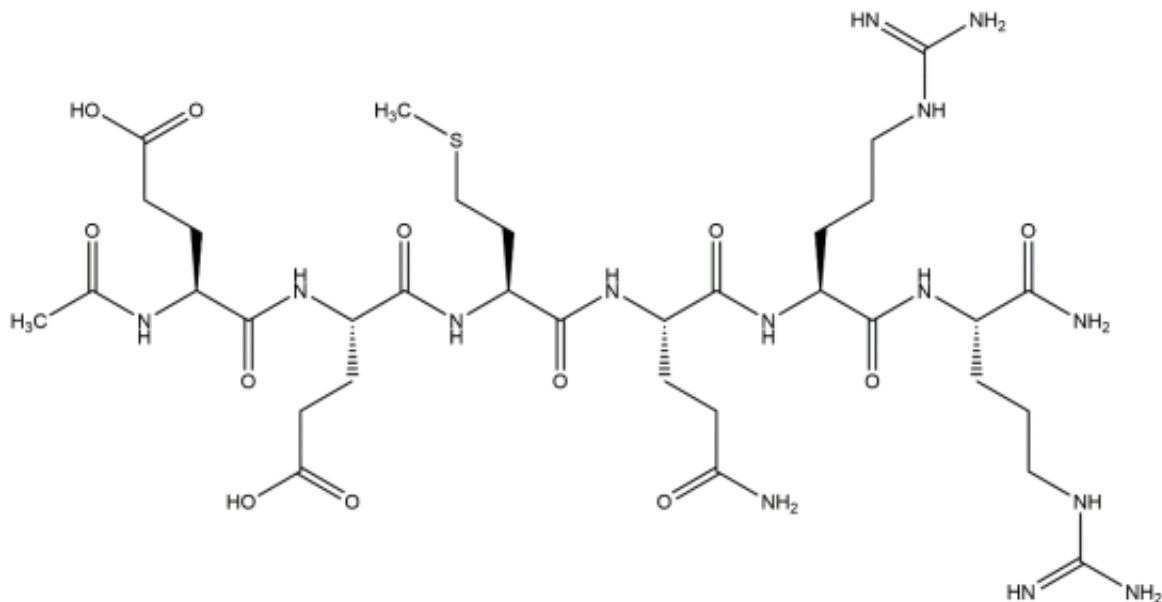


Figura 2. Estructura química de Acetil Hexapéptido – 8.

Fuente: Chair, Wilma F. Bergfeld, M.D., F.A.C.P.; Donald V. Belsito, M.D.; Curtis D. Klaassen, Ph.D.; Daniel C. Liebler, Ph.D.; James G. Marks, Jr., M.D.; Lisa A. Peterson, Ph.D.; Ronald C. Shank, Ph.D.; Thomas J. Slaga, Ph.D.; and Paul W. Snyder, D.V.M., Ph.D. Safety Assessment of Acetyl Hexapeptide-8 and Acetyl Hexapeptide-8 Amide as Used in Cosmetics. Cosmetics Ingredient Review. 2020

La fórmula química de este péptido es $C_{34}H_{60}N_{14}O_{12}S$. El Acetil Hexapéptido - 8 tiene un peso molecular de 889,0 Da o g/mol, con un coeficiente de reparto (octanol/agua) estimado ($\log/K_o/w$) de $-7,68$. Es soluble en agua con una solubilidad de 8,8 mg/mL. **(10)**.

2.3 Legislación Chilena sobre Productos cosméticos

Todo producto cosmético en Chile requiere de un registro sanitario para ser comercializado y distribuido en el territorio nacional, el cual debe ser autorizado ante el Instituto de Salud pública (ISP). Este registro es una inscripción que garantiza la eficacia, seguridad y estabilidad del producto, confirmando las indicaciones que describe su respectivo envase. Según el Artículo 21° del Decreto Supremo N° 239/02 todo producto, cualquiera sea su denominación, clase o finalidad, debe tener exclusivamente acción local sobre la piel y sus anexos. Por otra parte, según el

Artículo n° 56 del mismo DS, hay que mencionar que la responsabilidad es de los fabricantes o importadores por velar que la calidad y proclamaciones de los productos se cumplan, adoptando un sistema de control de calidad que certifique el cumplimiento de las especificaciones de producción, materias primas y del producto terminado. **(11)**.

2.4 Control de Calidad de Cosméticos.

Las medidas de control de calidad para un producto cosmético se basan en la Guía Técnica de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) que garantizan que los productos sean fabricados de acuerdo con estándares apropiados para su finalidad de uso, estas normas reflejan los requisitos mínimos para el aseguramiento de la Calidad, que vienen ser todas las actividades implementadas y sistematizadas dentro del sistema que son necesarias para establecer confianza de los requisitos mínimos **(12)**.

Las BPM contribuyen a completar el Reglamento del Sistema Nacional de Control Cosméticos del Ministerio de Salud, para asegurar mayor eficiencia en lo que respecta a la implementación y cumplimiento de la normativa sanitaria vigente. Por otra parte, la Resolución exenta 6444 determina las especificaciones técnicas mínimas de un producto terminado para productos cosméticos, tal y como; ensayos microbiológicos (cuando correspondan), ensayos fisicoquímicos: pH, viscosidad, características organolépticas (aspecto, color, olor), entre otros **(13)**.

Los formularios que están asociados a los registros sanitarios de comercialización de un producto cosmético deben contar con declaraciones específicas del producto ya terminado, dentro de ellas según el Artículo n° 26 del Decreto supremo 239/03 debe contar con la fórmula cualitativa completa y la formula cuantitativa expresada en unidades de peso o volumen del sistema métrico que debe corresponder de manera proporcional a la formula autorizada o declarada según corresponda en el

registro **(11)**. En la declaración técnica se debe indicar la metodología que se va a utilizar para la identificación y valoración cuantitativa de los ingredientes en la formulación. **(11)**. Además, El Reglamento (CE) 1223/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo sobre productos cosméticos establece las condiciones de uso de una lista de componentes, como el tipo de producto que pueden utilizarse y sus concentraciones máximas, de las cuales se deben aplicar métodos para su análisis de control de calidad **(14)**.

Los métodos utilizados para el análisis en control de calidad se definen en tres secciones, microbiológico, fisicoquímico y analítico. El control analítico tiene como finalidad estudiar la composición química de la muestra de interés mediante estudios cualitativos y cuantitativos en donde se usan métodos como análisis volumétricos para que un reactivo de volumen y concentración conocida reaccione con una solución del analito de concentración desconocida y evaluar la cantidad exacta que se ha consumido al finalizar la valoración, mientras que el análisis gravimétrico determina las cantidades de un compuesto en una muestra eliminando las interferencias y apartar al componente deseado **(15)**. Es importante realizar investigaciones exhaustivas sobre la cuantificación de los péptidos bioactivos que se encuentren en productos cosméticos, por lo que se requiere desarrollar métodos analíticos **(16)**.

El desarrollo de una metodología analítica requiere entregar resultados confiables, ya que serán utilizados para establecer diagnósticos analíticos, es necesario asegurar que en la determinación cuantitativa del activo cosmético la matriz cosmética (ingredientes que componen el producto cosmético sin considerar el activo) no posee algún compuesto interferente proveniente de la disolución de los componentes hidrofílicos o lipofílicos en los solventes utilizados para la metodología **(15)**.

Las interferencias pueden causar errores significativos en los resultados, generando diagnósticos equivocados al momento de medir la concentración del péptido cosmético. Esto implica la necesidad de utilizar otras metodologías, aumentando los gastos en reactivos, materias primas, equipo y tiempo para obtener resultados precisos (17).

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se ha utilizado en varios ámbitos de análisis de péptidos en investigación y desarrollo como método de separación, no obstante, la cromatografía líquida de interacción hidrofílica es la técnica de separación de elección para el análisis de péptido. Sin embargo, un método rápido y sencillo para la cuantificación de activos cosméticos es la espectrofotometría UV-Vis (17).

2.5 Espectrofotometría UV – VIS

El espectro electromagnético es una distribución de energías de radiaciones electromagnéticas que se propagan en forma de ondas, comprende un intervalo desde radiaciones de baja frecuencia a una mayor longitud de onda, así como las ondas de radio de 10^9 , hasta las radiaciones de alta frecuencia y energía a una menor longitud de onda, como las ondas de rayos gamma 10^{21} . (18).

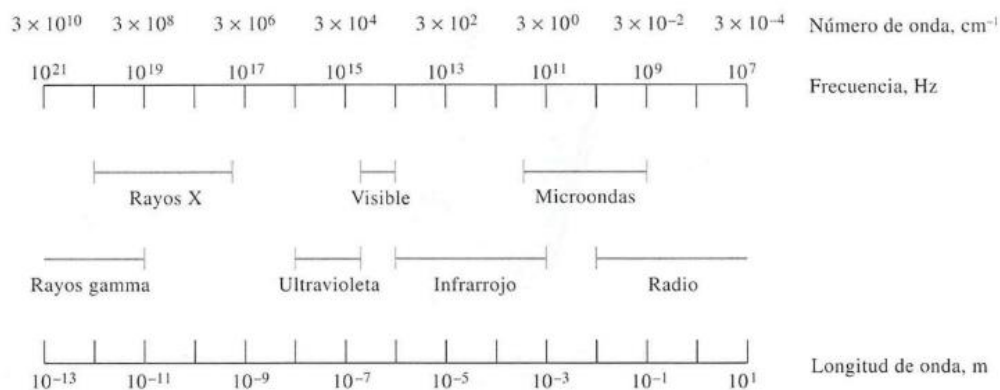


Figura 3. Espectro electromagnético

Fuente: Douglas A. Skoog, F. James Holler, Stanley R. Crouch. Principios de Análisis instrumental. Sexta edición. Cengage Learning [Internet]. 2008.

En la figura se representa el espectro electromagnético, donde se representa que, a mayor longitud de onda (10^1), menor es la frecuencia y la energía, esto quiere decir que las transiciones electrónicas requieren de poca energía para pasar de un orbital a otro. De lo contrario, a una menor longitud de onda (10^{-13}), mayor es la frecuencia y la energía necesaria para la generar una transición electrónica. **(19)**.

Las moléculas orgánicas distribuyen sus electrones en diferentes niveles de energía conocidos como orbitales moleculares. Estos orbitales presentan diversos estados energéticos: los orbitales δ son los de menor energía, seguidos por los orbitales π . Además, cuando una molécula contiene átomos con pares de electrones libres como oxígeno, nitrógeno, azufre o halógenos, estos se denominan orbitales no enlazantes "n". Por otro lado, los orbitales anti enlazantes δ^* y π^* son orbitales que contienen electrones que desestabilizan los enlaces químicos lo que contribuye a aumentar la energía de la molécula. **(18)**.

Las bandas de absorción que presentan los compuestos orgánicos en las regiones de ultravioleta y visible se asocian con transiciones electrónicas en la capa de valencia. Los electrones que participan en estas transiciones son aquellos que están menos atraídos por el conjunto de núcleos atómicos que conforma la molécula. **(18)**. Cuando un fotón a una longitud de onda y frecuencia específicas impacta un átomo, provoca la elevación de un electrón desde su estado fundamental "HOMO" (orbital ocupado de mayor energía) a un estado electrónico excitado "LUMO" (orbital ocupado de menor energía). Para que esta transición electrónica tenga lugar, la energía del fotón incidente debe ser igual o mayor que la diferencia de energía entre estos dos niveles. **(20)**.

2.5.1 Tipos de Transiciones Electrónicas

- **Transiciones electrónicas de "n" \rightarrow δ^*** anti enlazante se encuentran en compuestos saturados que contienen pares de electrones libres como los

heteroátomos (O, N, S, Halógenos) dentro del rango ultravioleta que involucran longitudes de onda de 150 a 250 nm. (19)

- **Transiciones electrónicas “n” → π* y π → π*** están presentes en la mayoría de los compuestos orgánicos insaturados dentro del rango UV y Vis, ya que las longitudes de onda varían entre los 200 a 700 nm. Los dos tipos de transiciones requieren de un grupo funcional no saturado que pueda ser absorbido. (19)
- **Transiciones electrónicas δ → π* y π → δ*** son posibles solo en compuestos insaturados, ya que son transiciones de baja intensidad. (19).
- **Transiciones electrónicas δ → δ** no son capaces de ser absorbidas en el rango de UV- vis. (19)

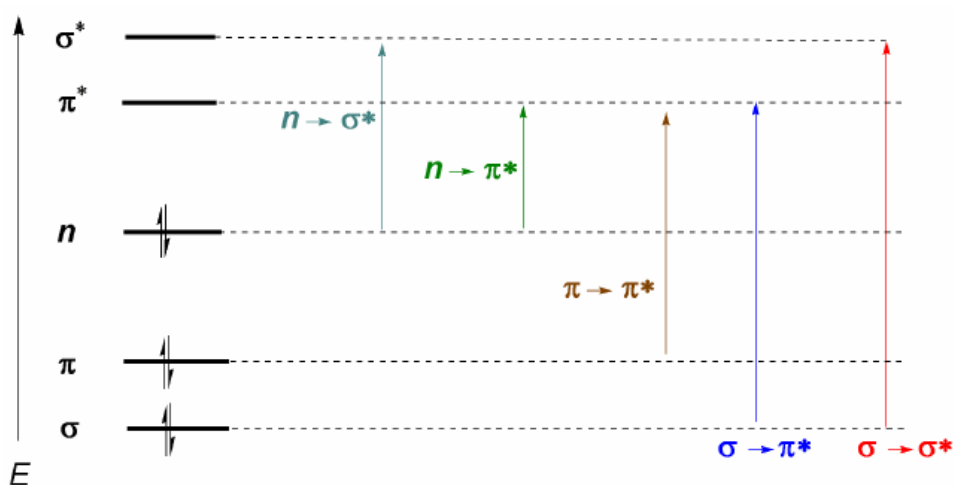


Figura 4. Niveles de energía de los orbitales moleculares y sus transiciones electrónicas

Fuente: Roberts, John D., y Marjorie C. Caserio. 1977. Basic Principles of Organic Chemistry, Second Edition (versión Published). Menlo Park, CA: W. A. Benjamin, Inc.

Espectrofotometría de absorción ultravioleta y visible es una técnica analítica que se basa en las transiciones electrónicas, esto se debe a la capacidad de una molécula para absorber la energía de la radiación electromagnética en el rango Ultravioleta (UV) de 180 a 380 nm y en el rango visible (VIS) de 380 a 780 nm (18). Esta técnica se emplea para cuantificar la energía absorbida por una molécula en

relación con la longitud de onda. Así, se logra determinar la concentración del analito presente en la muestra de interés. **(18)**.

Las moléculas suelen permanecer en su estado de energía más bajo, o estado basal, sin embargo, cuando se les estimula con energía en forma de fotón, que viaja como partícula u ondas electromagnéticas, pueden absorber radiación electromagnética, esto provoca un aumento en la energía de la molécula, llevando a los electrones no emparejados en sus órbitas más externas a un estado excitado. Esto da lugar a transiciones entre diferentes niveles de energía electrónica, incluyendo transiciones vibracionales o rotacionales. Como resultado, la muestra emite radiación de baja potencia. **(18)**.

En la región de las longitudes de onda de 180 a 780 nm, la absorción de radiación de los compuestos orgánicos es producto de la interacción entre los fotones y los electrones que participan en la formación de enlaces entre dos átomos. Para la excitación de enlaces simples saturados requieren de energías correspondientes a longitudes de onda menores a 180nm, es decir de mayor energía la transición electrónica. Por otra parte, los electrones que poseen enlaces dobles o triples son compuestos insaturados, más fácil de excitar ya que la radiación que requieren es menor, por lo que presentan bandas de absorción más útiles. **(18)**

Los grupos funcionales orgánicos insaturados que absorben dentro del rango de UV-Vis se conocen como **cromóforos**, generalmente tienden a ser moléculas como carbonilos, grupos aromáticos, alquenos, alquinos, entre otros. Sus conjugaciones pueden generar desplazamientos hacia las longitudes de onda mayores en los máximos de absorción, este efecto se denomina como *batocrómico* ($>\lambda$), además, puede provocar un desplazamiento mayor en el pick de absorción, esto se denomina efecto *hipercrómico* ($>Abs$) **(18)**.

Los grupos orgánicos saturados **auxocromos** son compuestos que no son capaces de absorber en la región de UV-vis. Cuando los cromóforos están unidos a grupos auxocromos pueden generar desplazamientos hacia las longitudes de onda menores, efecto *hipsocromico* ($<\lambda$) y un desplazamiento menor en el pick de absorción, denominado efecto *hipocrómico* ($< \text{Abs}$). **(18)**.

2.6 Ley de Lambert – Beer

Cada especie molecular es capaz de absorber sus propias frecuencias de radiación electromagnética, este proceso de absorción transfiere energía a la molécula y da como resultado una disminución en la intensidad de la radiación electromagnética incidente, por ende, esta absorción de radiación atenúa el haz según la Ley de Beer. La espectroscopia se basa en la medición de Transmitancia (T) o Absorbancia (A) de las soluciones que están en celdas transparentes que tienen una longitud de trayectoria de b centímetros (1cm). **(19)**.

$$T = \frac{P}{P_0} \qquad A = -\text{Log } T = -\text{Log } \frac{P}{P_0} = \text{Log } \frac{P_0}{P}$$

Fuente: Douglas A. Skoog, F. James Holler, Stanley R. Crouch. Principios de Análisis instrumental. Sexta edición. Cengage Learning. 2008

La transmitancia de la disolución es la fracción incidente de la radiación transmitida por la disolución expresada en %T. La absorbancia de una disolución está relacionada con la transmitancia de una forma logarítmica, a medida que la absorbancia de una disolución incrementa, la transmitancia disminuye. **(19)**. Esta ley de absorción establece que la radiación incidente (P_0) a una longitud de onda (λ) que pasa por la solución en la cubeta es atenuada y transformada, por lo que la radiación de salida (P) disminuye al atravesar la cubeta (b), debido a que las moléculas de la solución tienden absorber cierta cantidad de luz y por ende, su intensidad disminuye. **(19)**

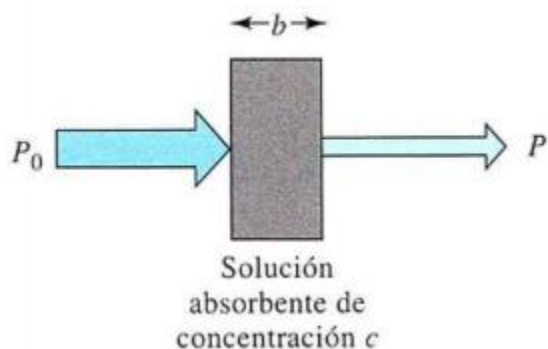


Figura 5. Atenuación de un haz de radiación por una solución absorbente

Fuente: Douglas A. Skoog, Donald Weste, F. James Holler, Stanley R. Crouch. Química Analítica. Séptima edición. Mc Graw Hill. [Internet]. 2000.

La Luz incidente y la luz que atraviesa la sustancia, depende de:

- El tipo de sustancia por la que atraviesa la luz
- La distancia que recorre la luz (ancho de cubeta)
- La concentración de la sustancia

Establece que la absorción de la disolución a una longitud de onda dada (A) de la radiación electromagnética es directamente proporcional a la concentración de la sustancia absorbente de la disolución (C) y la longitud de trayectoria del medio en la cubeta (b) mediante una constante de proporcionalidad denominada constante de absortividad (ϵ), la cual es característica de la sustancia analizar. **(19)**.

$$A = \epsilon * b * C$$

Douglas A. Skoog, F. James Holler, Stanley R. Crouch. Principios de Análisis instrumental. Sexta edición. Cengage Learning. 2008.

2.6.1 Ley de Lambert: Esta ley determina cuando un rayo de luz monocromático (I_0) pasa a través de un medio absorbente, su intensidad disminuye exponencialmente a medida que la longitud de trayectoria del medio absorbente aumenta. Ej. el ancho de la cubeta puede variar.

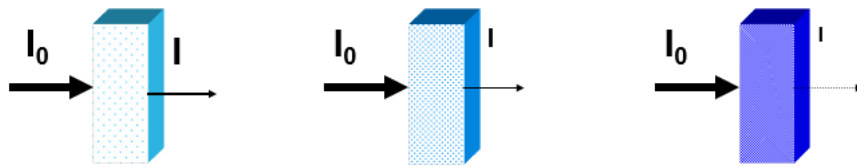


Figura 6. Cambios en la intensidad exponencialmente del medio absorbente

Fuente: Douglas A. Skoog, Donald Weste, F. James Holler, Stanley R. Crouch. Química Analítica. Séptima edición. Mc Graw Hill. [Internet]. 2000.

2.6.2 Ley de Beer: Mediante esta ley de absorción, se puede determinar las concentraciones de una sustancia a partir de mediciones de intensidad de luz absorbida. Por lo que, al ser proporcional, a mayor concentración, mayor absorbancia (respuesta lineal), la cantidad de luz absorbidas depende de la concentración de la sustancia analizar. **(19).**

2.6.3 Limitaciones de la Ley de Lamber – Beer

- **Transiciones electrónicas:** Es importante tomar en cuentas que la longitud de onda a las transiciones $\delta \rightarrow \delta^*$ antienlaces no se encuentran dentro del rango UV – VIS, por lo que no es posible analizar hidrocarburos saturados sin grupos funcionales, ya que el equipo no detectara sus señales. **(18).**
- **Ley de Beer:** Describe la absorción de sustancias en medios con concentraciones bajas de analitos. A concentraciones altas, las interacciones entre solvente y soluto pueden afectar la absorción de radiación. La absorptividad depende del índice de refracción del medio, y las interacciones electrostáticas pueden desviar la relación lineal entre absorbancia y concentración. **(18).**
- **Desviaciones químicas:** Cuando el analito se disocia, asocia o reacciona con el solvente, su espectro de absorción puede cambiar. Las soluciones

indicadoras ácido/base pueden mostrar esto, alterando el equilibrio químico y produciendo curvas diferentes. **(18)**.

- **Desviaciones instrumentales por radiación policromática:** La Ley de Beer se cumple con radiaciones monocromáticas, pero fuentes policromáticas tienen múltiples longitudes de onda. Se usan redes para aislar una banda de longitudes de onda cercana a la deseada. **(18)**.
- **Desviación instrumental por radiación parasita:** La radiación dispersa, llamada luz parasita, contamina la luz emitida por el monocromador y proviene de fuentes fuera de la longitud de onda deseada. **(18)**.
- **Celdas desajustadas:** Si las celdas de soluciones analito y blanco tienen longitudes de trayectoria desiguales, una ordenada al origen "K" aparecerá en la curva de calibración de absorbancia. **(18)**

2.7 Componentes Básicos de un Espectrofotómetro

1. **Fuentes de radiación:** Proporcionan la radiación electromagnética que pasa a través de la muestra, debe emitir una radiación continua que solo cambia de intensidad lentamente en función de la longitud de onda en una amplia zona del espectro, debe ser de intensidad elevada y con una longitud de onda constante.
 - Fuentes térmicas: Estas fuentes generan radiación debido a la temperatura, como las lámparas de wolframio o tungsteno que emiten en el rango de 350nm a 2500nm. También llamadas lámparas de cuarzo/halógeno, contienen yodo en una envoltura de cuarzo, permitiendo operar el filamento a 3500K, aumentando la intensidad y extendiendo el rango hacia el UV. **(21)**.
 - Fuentes de cargas eléctricas: Ejemplo de estas fuentes son las lámparas de deuterio e hidrógeno, que generan radiación continua al excitar moléculas de deuterio eléctricamente para disociarlas en

átomos y un fotón de UV. Estas lámparas producen un espectro continuo en el rango UV, abarcando desde 160nm hasta el inicio de la región visible. **(21)**.

2. **Monocromador:** Este componente separa la luz en diferentes longitudes de onda permitiendo seleccionar la longitud de onda específica para la medición. Puede ser un prisma o una red de difracción. Al girar o ajustar el monocromador, se puede seleccionar la longitud de onda deseada.

- Prisma: separa todas las longitudes de onda de un emisor de radiación, y la longitud de onda deseada va hacia un lente que direcciona el haz hacia la rendija de salida. **(21)**.
- Red de difracción: láminas de aluminio altamente pulidas sobre la que se han hecho una gran cantidad de estrías que actúan como centro de dispersión de todas las radiaciones incidente. **(21)**.

El intervalo de longitudes de onda que deja pasar un monocromador, llamado pase de banda espectral o ancho de banda efectivo puede ser menor que 1 nm para instrumentos relativamente caros o de más de 20 nm para sistemas económicos. **(21)**

3. **Cubetas o celdas:** Es el recipiente donde se coloca la muestra para que la radiación electromagnética la atraviese. Pueden ser de vidrio, cuarzo u otros materiales transparentes, y están diseñadas para minimizar la interferencia con la radiación. Las cubetas de vidrio o plástico se usan para la región visible (380-800nm), mientras que las cubetas de cuarzo o sílice se usan en el rango UV debajo de 350nm. **(21)**.

- Cubetas de cuarzo: Son transparentes en una amplia gama de longitudes de onda, desde el ultravioleta (UV) hasta el infrarrojo cercano. Son ideales para muestras que deben analizarse en el rango

UV, ya que el cuarzo es transparente en esa región. Sin embargo, son más frágiles que otros materiales y pueden ser más costosas. **(21)**.

- Cubetas de vidrio: Son versátiles y económicas, pero generalmente no son adecuadas para aplicaciones en el rango UV debido a la absorción de la luz en esa región. Son adecuadas para aplicaciones en la región visible e incluso en el infrarrojo cercano. **(21)**.
- Cubetas de plástico: Son económicas y resistentes a roturas, pero suelen tener limitaciones en términos de transparencia en el rango UV. Son útiles para aplicaciones en la región visible. **(21)**.

4. **Detector**: Mide la intensidad de la radiación electromagnética que ha pasado a través de la muestra. Los detectores más comunes son los fotodiodos y los fotomultiplicadores. Convierten la radiación en una señal eléctrica que puede ser amplificada y registrada. **(21)**.
5. **Sistema óptico**: Incluye lentes y espejos que dirigen la radiación desde la fuente de luz hacia el monocromador, luego a través de la muestra y finalmente al detector. También puede incluir filtros para ajustar o limitar el rango de longitudes de onda. **(21)**.
6. **Pantalla o dispositivo de lectura**: Muestra los resultados de la medición en términos de absorbancia, transmitancia o concentración. Puede ser una pantalla digital o una interfaz con una computadora. **(21)**.
7. **Electrónica y software**: Controla la operación del espectrofotómetro, incluyendo la selección de la longitud de onda, la medición de la intensidad de la radiación y el cálculo de la absorbancia o transmitancia. También puede proporcionar análisis más avanzados y generación de gráficos. **(21)**.

En conjunto, estos componentes permiten al espectrofotómetro medir la absorción de luz por una muestra en función de la longitud de onda, lo que brinda información valiosa sobre las propiedades químicas y físicas de la muestra.

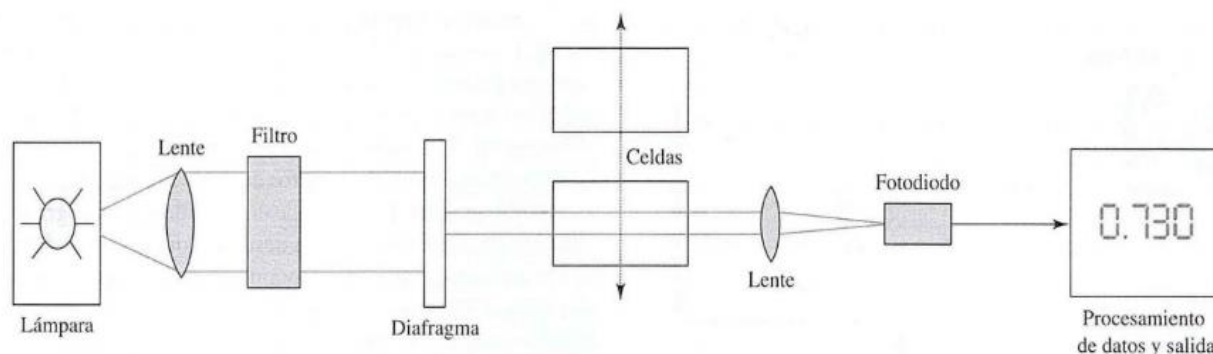


Figura 7. Partes básicas de un espectrofotómetro de absorción.
fuente: C. Avendaño Lopez. "Introducción a la química farmacéutica". Segunda edición. Mc Graw Hill. [Internet]. 2001.

2.8 Barrido Espectral

El barrido espectral es permite medir la absorbancia o transmitancia de una muestra a través de un rango de longitudes de onda, y se obtiene información sobre su estructura química. Realizar un barrido fotométrico permite identificar la longitud de onda en la que el analito absorbió la mayor cantidad de radiación electromagnética (λ_{\max}), la cual representa la condición para la mejor lectura analítica. **(21)**.

- Elección de longitud de onda de máxima absorción

La elección de la longitud de onda λ_{\max} , en la cual la absorptividad es alta incluso cuando la concentración del analito es baja, resulta en una absorbancia distinta de cero. Teóricamente, seleccionar una λ_{\max} con mayor absorptividad proporciona una mayor sensibilidad en las lecturas, un límite de detección más bajo y una reducción del error en las mediciones. **(21)**.

- Espectrofotómetro y control de banda

Es fundamental que el espectrofotómetro mantenga un control del centro de banda para evitar la pérdida de sensibilidad en las mediciones. De lo contrario, existe el riesgo de que los valores de absorbancia obtenidos sean menores de lo esperado debido a una menor absorptividad de la sustancia a la nueva longitud de onda. Esto conlleva una disminución en la sensibilidad de las lecturas. **(21)**.

- Consideraciones al Seleccionar λ_{max} :

En la práctica, es de suma importancia evitar la realización de mediciones en las zonas del espectro donde pequeñas variaciones en la longitud de onda resulten en cambios significativos en la absorbancia. Por lo tanto, al elegir λ_{max} , se deben tener en cuenta dos factores clave:

- Se otorga preferencia a las longitudes de onda con máxima absorbancia, ya que esto proporciona una mayor sensibilidad en las lecturas.
- Se evita trabajar en regiones del espectro con cambios bruscos en la absorbancia, ya que incluso un ligero desplazamiento en la longitud de onda puede llevar a errores en las lecturas. **(21)**.

2.9 Curva de Calibración

Se trata de una gráfica que relaciona la respuesta proporcionada por el equipo con los valores de absorbancia y concentración del analito. Para ello, se preparan soluciones estándar con diversas concentraciones. A medida que aumenta la concentración del estándar, aumenta proporcionalmente la absorbancia obtenida. Luego, se registran los valores de absorbancia, estableciendo así una relación lineal para cada nivel de concentración, esta relación se representa mediante una línea de tendencia, de la cual se obtiene la ecuación de una recta. Esta ecuación revela

el coeficiente de correlación (R^2), cuyo valor cercano a 1 indica la linealidad de la relación. **(20)**.

2.10 Cuantificación Analítica

Es esencial trazar la curva de calibración de absorbancia, que idealmente se presenta como una línea recta. Esto se debe a que normalmente se opera en un intervalo de concentraciones donde el analito sigue la Ley de Lambert-Beer en el rango de concentraciones analizadas. Si esta premisa se cumple, se puede trabajar específicamente con la porción lineal del gráfico, determinada por la ecuación de la recta. Esto nos permite transformar el valor de absorbancia corregido de la muestra en su correspondiente valor de concentración. Esta concentración representa la cantidad del analito presente en la muestra. **(18)**.

Los diagnósticos cuantitativos se usan particularmente para determinar impurezas y/o productos de degradación, así evaluar que no existan interferencias en la detección por espectrofotometría. Una de las aplicaciones más importante de la espectrofotometría es la determinación cuantitativa de especies inorgánicas, orgánicas y biológicas de la intensidad absorbida de un haz de luz monocromática de una muestra de interés, puesto que se evalúa que no exista degradación en su estructura química para confirmar las cantidades definidas en las especificaciones del preparado inicial. **(18)**.

La representación gráfica implica contrastar la absorbancia en el eje vertical (Y) y los valores de concentración en el eje horizontal (X). Esto permite derivar una ecuación de la recta que revela la pendiente y el coeficiente de determinación (R^2), el cual debe exceder 0.99 para garantizar la linealidad de la ecuación. **(18)**.

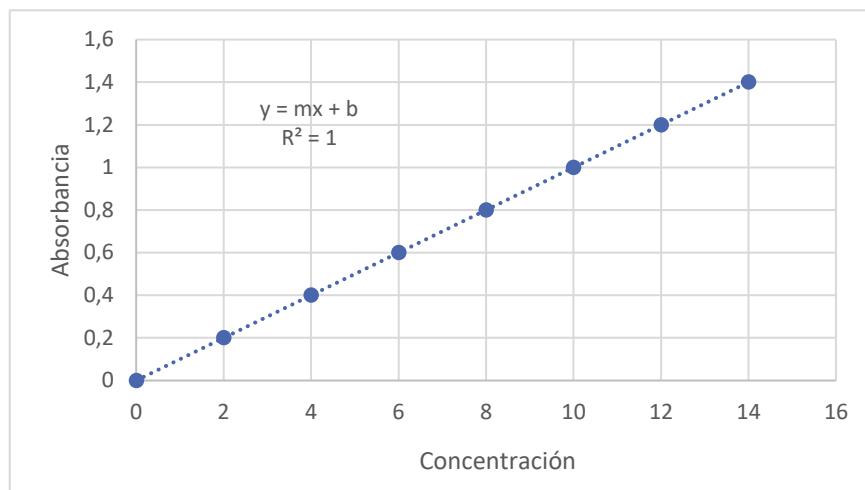


Figura 8. Relación de Absorbancia v/s Concentración en espectrofotometría UV-Vis

Fuente propia con Microsoft® Excel® para Microsoft 365

2.11. Planteamiento del problema

La cuantificación del Acetil Hexapéptido – 8 como ingrediente activo cosmético se vuelve un proceso complejo debido a varios factores. Primero, es esencial considerar la posible degradación de su estructura química durante el análisis. Esto se vuelve aún más crítico cuando se reconoce que su efectividad puede depender de la sinergia que establece con otros ingredientes presentes en la formulación cosmética.

Esta sinergia podría dar lugar a la presencia de interferentes en la matriz cosmética, estos interferentes deben ser meticulosamente identificados y tomados en cuenta al definir los parámetros y las condiciones del método analítico que se empleará.

Es precisamente este conjunto de consideraciones lo que nos lleva a una pregunta fundamental: ¿Es posible llevar a cabo la cuantificación del Acetil Hexapéptido – 8 en productos tópicos Anti-Age utilizando la técnica de espectrofotometría UV-Vis? Esta cuestión se convierte en el punto de partida para explorar la viabilidad y la adecuación de esta técnica analítica en un contexto complejo como el de los productos cosméticos.

Hipótesis

3. HIPÓTESIS

La técnica de espectrofotometría UV – Vis permite la cuantificación del Acetil Hexapéptido – 8 contenido en una crema cosmética Anti-edad.

Objetivos

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Desarrollar una metodología analítica para la cuantificación de Acetil Hexapéptido – 8 contenido en cremas cosméticas Anti-edad a través de la técnica de espectrofotometría UV-Vis.

4.2. Objetivos Específicos

1. Identificar las propiedades fisicoquímicas del cosmético de uso tópico que contiene Acetil Hexapéptido – 8.
2. Establecer los parámetros analíticos para la cuantificación de Acetil Hexapéptido–8 en una crema cosmética Anti-edad de uso tópico.
3. Implementar el método analítico desarrollado para la determinación del activo en cremas cosméticas Anti-edad.
4. Reportar los resultados analíticos obtenidos en la cuantificación de Acetil Hexapéptido – 8 cremas cosméticas Anti-edad de uso tópico, a través de la técnica de espectrofotometría UV- Vis.

Metodología

5. METODOLOGÍA

Diseño del estudio: Se realizó un estudio de tipo cuantitativo, experimental y analítico.

Lugar de Realización del estudio: Laboratorio de Farmacia Química y Farmacognosia

5.1. Materiales

- ❖ Matraz de aforo de 10mL, 25mL, 50mL, 100mL
- ❖ Tubos de ensayos Pyrex 16x100mm
- ❖ Gradilla universal para tubos de ensayo
- ❖ Pipeta aforada de 1mL, 5mL, 10mL, 25 mL
- ❖ Vaso precipitado de 10, 50 y 100mL
- ❖ Micropipeta de 20-200 µL y de 100 - 1000uL
- ❖ Puntas para micropipetas 10 a 100 UL y 200UL
- ❖ Piseta con agua Bidestilada
- ❖ Pipeta Pasteur
- ❖ Membranas de filtración hidrofóbicas PTFE 0.22 µm (JET BIOFIL)
- ❖ Tubos Eppendorf de 2 mL
- ❖ Gradilla universal para tubos eppendorf
- ❖ Parafilm
- ❖ Guantes de látex
- ❖ Jeringa de 5 mL de plástico.

5.2 Equipos e Instrumentos

- Espectrofotómetro Bell Photonics UV-M51
- Software UV Professional 2 Analisisys
- Balanza analítica BEL Engineering
- Centrifuga Thermo Scientific Megafuge 16R
- pH-Metro PHS -25

5.3 Etapas del Desarrollo Analítico.

Este trabajo se realizó a través de las siguientes etapas:

5.3.1 Etapa 1. Caracterización fisicoquímica del cosmético de uso tópico que contiene Acetil Hexapéptido – 8.

Se llevó a cabo la fabricación de un producto cosmético consistente en una crema emulsionada que contiene el péptido Acetil Hexapéptido-8 como ingrediente activo. Además de esto, se formuló una matriz cosmética compuesta por los mismos ingredientes, excluyendo el péptido como activo cosmético

Lo anteriormente señalado con el objetivo de evaluar el impacto del ingrediente cosmético principal al 8% en la metodología analítica, se elaboraron dos cremas de 50 g cada una. Una de estas formulaciones corresponde a la crema cosmética que incluye el Acetil Hexapéptido – 8, mientras que la otra se refiere a la matriz cosmética. Esta última se desarrolló principalmente porque en las casas comerciales no se encuentran disponibles productos cosméticos sin el ingrediente activo.

Tabla 5.1 Formulación de la Crema Cosmética

	Componentes	Cantidad 100g	Cantidad 50g
Fase oleosa	Aceite de almendras	15g	7,5 g
	Monoestearato de glicerilo	2g	1 g
	Manteca de karité	3g	1.5 g
	Acido Esteárico	3g	1.5 g
	Alcohol cetílico	2g	1 g
	Span 60	3g	1.3 g
	Ceteareth-21	1g	0.8 g
Fase acuosa	Glicerina	2g	1 g
	Agua destilada	58g	29.5 g
Fase terciaria	Acetil Hexapéptido – 8 (Argireline®)	8g	4 g
	Vitamina E	1g	0.5 g
	BHT	0.2g	0.1 g
	Benzoato de sodio	0.8g	0.4 g

Se consideró que la crema contiene diferentes componentes que pueden afectar la estabilidad del producto terminado, provocando separación de fases, alteración en el aspecto del producto y/o cambios en el pH, por lo que se realizaron tres pruebas para la evaluación de la crema con activo y la matriz sin activo, una vez terminado el proceso de manufactura.

1.1 pH: Se utilizó un pH-metro PHS 25 previamente calibrado:

Calibración del pH-metro PHS 25

- a) Limpia suavemente el electrodo con agua destilada y secarlo con cuidado
- b) Utilizar soluciones tampón de pH 4.01, 7.00 y 10.01. Asegurar de que estas soluciones no estén contaminadas.
- c) Encender el medidor de pH y sumergir el electrodo en la solución de calibración de pH 7.00. Asegurarse de que el electrodo esté completamente sumergido y que no toque el recipiente.
- d) Esperar a que el medidor de pH estabilice la lectura. Esto puede tardar unos minutos. Una vez que la lectura se estabilice, ajustar el medidor para que marque el pH de la solución de calibración (en este caso, 7.00).
- e) Retirar el electrodo de la solución de calibración pH 7.00 y limpiarlo con agua destilada. Luego, sumergir el electrodo en la solución de calibración de pH 4.01 y repetir el proceso de estabilización y ajustar para que el medidor marque el pH correcto.
- f) Repetir el proceso de calibración utilizando la solución de calibración de pH 10.01 en lugar de la solución de pH 4.01
- g) Después de calibrar, verificar nuevamente la lectura del medidor con las soluciones de calibración para asegurarte de que esté mostrando los valores de pH correctos.

El proceso de medición de pH, involucró la dilución de 1 g de crema cosmética en 10 mL de agua destilada en un vaso precipitado para formar una solución acuosa y realizar la medición de pH

1.2 Estabilidad: Se colocaron 0,5 g de crema cosmética en dos tubos eppendorf de 2 mL de capacidad y se introdujeron en la centrifuga a 15.000 rpm durante 30 minutos para evaluar la separación de fases de la emulsión.

1.3 Características organolépticas: Para este análisis se utilizó la crema cosmética, y se observaron las siguientes características macroscópicas: aspecto, olor, color y textura.

5.3.2 Etapa 2. Evaluación de los parámetros analíticos para la cuantificación de Acetil Hexapéptido – 8 en cosméticos Anti- edad de uso tópico.

2.1 Evaluación de la interferencia de los solventes en la determinación del Acetil Hexapéptido – 8 a través de la técnica Espectrofotometría UV-Vis.

En el primer procedimiento de esta segunda etapa se seleccionaron varios solventes para evaluar el efecto interferente para la cuantificación del activo cosmético. Estos solventes incluyeron principalmente agua, acetato de etilo, cloroformo y una mezcla solvente Acetato de Amonio 40 mM: Acetonitrilo (70:30). Se realizaron barridos espectrofotométricos a cada solvente para evaluar posibles interferencias y determinar la longitud de onda de máxima absorción (λ_{\max}) correspondiente de cada uno.

Se tuvo en cuenta que el valor teórico de máxima absorción del Acetil Hexapéptido -8 es de 214 nm como λ_{\max} (16). Por lo tanto, se esperaba que los solventes no presentaran una absorción máxima en el rango de estimación entre 210 a 230 nm, con el fin de descartar la presencia de interferentes en los solventes que pudieran interferir en la cuantificación del activo cosmético.

2.1.1 Preparación de solución de acetato de amonio al 40mM en 1000 mL

1) Preparación de la Solución de Acetato de Amonio 40 mM:

- Se utilizó una balanza analítica.
- En la balanza analítica, se pesó exactamente 3.0832 g de acetato de amonio en polvo.
- Se transfirieron los 3.0832 g de acetato de amonio a un matraz de aforo de 1000 mL.

2) Aforo de la Solución:

- Se llenó el matraz de aforo con agua destilada cuidadosamente hasta alcanzar la marca del matraz de aforo.
- Se aplicó agitación de manera constante y cuidadosa para lograr una completa homogeneización de la solución.
- Se rotuló el matraz con la preparación de la solución

2.1.2. Preparación de mezcla solvente Acetato de Amonio 40 mM: Acetonitrilo (70:30).

1) Medición volumétrica de la Solución de Acetato de Amonio:

- Se usó una probeta de 500 mL para medir con precisión 350 mL de la solución de acetato de amonio al 40 mM

2) Preparación del Solvente Orgánico Acetonitrilo al 98%:

- En un vaso precipitado, se vertieron 200 mL de acetonitrilo al 98%.
- En la probeta de 500 mL con la solución de acetato de amonio previamente medida, se transfirieron 150 mL del acetonitrilo al 98%.

3) Mezcla de Soluciones:

- Se combinaron ambas soluciones en la probeta, y con una varilla de vidrio se aplicó agitación de manera lenta para homogenizar la solución, además se tuvo en cuenta que es un proceso endotérmico por lo que disminuyó la temperatura.
- Se trasvasijo la mezcla resultante a un matraz volumétrico de 500 mL.
- Se agitó de manera enérgica para lograr una homogeneización completa.

Procedimiento de lectura espectrofotométrica de cada solvente:

- 1) Los solventes elegidos (Agua, Acetato de etilo, Cloroformo y la mezcla solvente Acetato de Amonio 40 mM: Acetonitrilo (70:30)) se colocaron en diferentes tubos de ensayos previamente rotulados.
- 2) Luego se filtró cada solución con filtros de membrana de 0,45 μm para eliminar residuos presentes en ellos.
- 3) Se llevó cada solución filtrada a las cubetas de cuarzo (Q) para realizar los barridos espectrofotométricos en el espectrofotómetro Bell Photonics UV-M51 con la opción "Wavelength Scan" del Programa software UV Professional 2 Analysis, en un rango específico de longitud de onda, entre los 190 nm y los 300 nm.

2.2 Evaluación de la interferencia de los solventes junto a la matriz cosmética en la determinación del Acetil Hexapéptido – 8 a través de la técnica Espectrofotometría UV-Vis.

Después de confirmar la ausencia de interferencias de cada solvente y descartar aquellos que, si presentaban dentro del rango estimado, se procedió a evaluar la solubilidad de la matriz cosmética y a examinar las posibles interferencias que esta pudiera causar junto a los solventes seleccionados. En este proceso se tomó una cantidad específica de la matriz cosmética y se mezcló con agua, cloroformo, acetato de etilo y mezcla solvente Acetato de Amonio 40 mM: Acetonitrilo (70:30).

2.2.1 Barrido espectrofotométrico de la matriz cosmética en agua bidestilada.

Se preparó una solución de la matriz cosmética con agua bidestilada, luego se realizó un barrido en el espectrofotómetro Bell Photonics UV-M51 con el fin de evaluar que los componentes hidrosolubles de la matriz no generarán interferencias dentro del rango de estimación, y a su vez, evaluar que la forma cosmética se haya disuelto correctamente en agua.

Procedimiento:

- 1) En un matraz volumétrico de 100 mL, con ayuda de una jeringa de 5mL previamente llenada con matriz cosmética, se pesó con precisión 1,1324 g de matriz en balanza analítica.
- 2) Se aforo con agua bidestilada y se agitó suavemente por 5 minutos manualmente.
- 3) Luego se filtró cada solución con filtros de membrana de 0,45 μm para eliminar todos los residuos presentes en ella.
- 4) Se llevó la solución filtrada a una cubeta de cuarzo (Q) y se realizó un barrido en el espectrofotómetro Bell Photonics UV-M51 con la opción "Wavelength Scan" del Programa software UV Professional 2 Analysis, en un rango específico de longitud de onda, entre los 190 nm y los 300 nm.

2.2.2 Barrido fotométrico de la matriz cosmética en Acetato de etilo (99,5%)

Se preparó una solución de la matriz cosmética en un matraz volumétrico con el solvente acetato de etilo. Se realizó un barrido espectrofotométrico en el espectrofotómetro Bell Photonics UV-M5 con este solvente para evaluar que los componentes grasos de la matriz cosmética que están disueltos no generen interferencia dentro del rango establecido.

Procedimiento:

- 1) En un matraz de aforo de 100 mL, con ayuda de una jeringa de 5mL previamente llenada con matriz cosmética, se pesó con precisión 1,1625 g de matriz en balanza analítica.
- 2) Se aforó con acetato de etilo hasta la marca del matraz y se agitó suavemente por 5 minutos.
- 3) Luego se filtró la solución con filtros de membrana de 0,45 μm para eliminar residuos presentes en ellos.
- 4) Se llevó la solución a una cubeta de cuarzo (Q) y se realizó el barrido en el espectrofotómetro Bell Photonics UV-M51 con la opción "Wavelength Scan" del Programa software UV Professional 2 Analysis, en un rango estimado de longitud de onda, entre los 190 nm y los 300 nm.

2.2.3 Barrido espectrofotométrico de la matriz cosmética en Cloroformo (99,9%)

Se preparó una solución de la matriz cosmética en un matraz de aforo con el Cloroformo. Se realizó un barrido espectrofotométrico en el espectrofotómetro Bell Photonics UV-M5 con este solvente para evaluar que los componentes grasos de la matriz cosmética que están disueltos no generen interferencia dentro del rango de estimación.

Procedimiento:

- 1) En un matraz de aforo de 100 mL, con ayuda de una jeringa de 5mL previamente llenada con matriz cosmética, se pesó con precisión 1,1485 g de matriz en balanza analítica.
- 2) Se aforó con cloroformo hasta la marca del matraz y se agitó suavemente por 5 minutos.

- 3) Luego se filtró la solución con filtros de membrana de 0,45 μm para eliminar residuos presentes en ellos.
- 4) Se llevó la solución a una cubeta de cuarzo (Q) y se realizó el barrido en el espectrofotómetro Bell Photonics UV-M51 con la opción “Wavelength Scan” del Programa software UV Professional 2 Analysis, en un rango específico de longitud de onda, entre los 190 nm y los 300 nm.

2.2.4 Barrido espectrofotométrico de la matriz cosmética en la mezcla solvente Acetato de Amonio 40 mM: Acetonitrilo (70:30).

Esta mezcla está conformada por una solución acuosa de acetato de amonio de 40 mM con el solvente orgánico de acetonitrilo en una proporción 70:30 ya preparada anteriormente.

Se realizó un barrido en el espectrofotómetro Bell Photonics UV-M5 para evaluar que la matriz cosmética en esta mezcla no generara interferencias.

Procedimiento:

- 1) En un matraz de aforo de 25 mL, con ayuda de una jeringa de 1mL previamente llenada con matriz, se debe medir con precisión 0,1044 g en balanza analítica.
- 2) Se aforó con mezcla solvente Acetato de Amonio 40 mM: Acetonitrilo (70:30).
- 3) Se aplicó agitación suavemente por 2 minutos de manera manual
- 4) Luego se vertió la solución en dos tubos eppendorf de 2 mL y se llevó a la centrifugadora por 35 minutos a 15.000 rpm.
- 5) Las soluciones se filtraron con filtros de membrana hidrofóbicos de PTFE de 0.22 μm .
- 6) Se llevó la solución a una cubeta de cuarzo (Q) y se realizó el barrido en el espectrofotómetro Bell Photonics UV-M51 con la opción “Wavelength

Scan” del Programa software UV Professional 2 Analysis, en un rango específico de longitud de onda, entre los 190 nm y los 300 nm.

2.3 Barrido espectrofotométrico de la solución referente Argireline® del activo cosmético Acetil Hexapéptido – 8.

El Acetil Hexapéptido – 8 tiene un PM de 889.0 g/mol, este péptido se encuentra en el producto comercial Argireline® en solución con Caprilyl glicol y agua destilada a una concentración de 0.05 %.

Se llevaron a cabo diferentes barridos espectrofotométricos de la solución referente Argireline® en diferentes soluciones utilizando el espectrofotómetro Bell Photonics UV-M51, junto con el software UV Professional 2 Analysis. Esto se realizó para identificar la longitud de onda máxima absorción (λ_{max}) del activo cosmético Acetil Hexapéptido – 8, y así, identificar las posibles interferencias analíticas que pueda presentar.

2.3.1 Barrido espectrofotométrico de la solución referente Argireline® en solución con agua bidestilada.

Se preparó una solución referente (I SR) de Argireline® a una concentración conocida de 1×10^{-5} M en un matraz volumétrico de 100 mL aforado con agua bidestilada. Se consideró un volumen de 1,65 mL de Argireline® según los cálculos respectivos para obtener esa concentración.

Procedimiento:

- 1) Se midió con precisión 1.65 mL de Argireline® utilizando una micropipeta de 100 – 1000 μ L, luego se transfirió a un matraz volumétrico de 100 mL.

- 2) Se aforó el matraz volumétrico con agua bidestilada hasta alcanzar la marca de 100 mL, asegurando así la preparación de una solución a concentración de 1×10^{-5} M.
- 3) Se agitó de manera constante por 5 minutos, se filtró con filtros membrana de 0,45 μm y luego la solución se llevó a una cubeta de cuarzo (Q).
- 4) Se realizó un barrido en el espectrofotómetro Bell Photonics UV-M51 con la opción "Wavelength Scan" del Programa software UV Professional 2 Analysis en un rango estimado de longitud de onda, entre los 190 nm y los 300 nm.

2.3.2 Barrido espectrofotométrico de la solución referente Argireline® en solución de Hidróxido de sodio (NaOH) al 0.1 M.

Se preparó una segunda solución referente (II SR) Argireline® a concentración conocida de 1×10^{-5} M en un matraz volumétrico de 100 mL aforado con una solución acuosa de NaOH al 0,1 M para identificar la presencia de un posible desplazamiento de longitud de onda de absorción de tipo batocromico del activo cosmético Acetil Hexapéptido – 8, con el objetivo de establecer un nuevo valor de λ_{max} para la solución referente.

Procedimiento:

Para esta preparación, se parte de la solución referente (I SR) de Argireline® con una concentración de 1×10^{-5} M. Se tomaron 5 mL de esta solución (I SR) y se preparó la segunda solución referente (II SR) con la misma concentración, pero fue aforada con una solución de hidróxido de sodio (NaOH) al 0.1 M.

- 1) Preparación de la Solución Blanco (NaOH 0,1 M)
 - Se pesó con precisión 4,0301 g de hidróxido de sodio (NaOH).
 - Se transfirieron los 4,0301 g de NaOH a un matraz de aforo 1000 mL.

- Se aplicó agitación constantemente hasta que el NaOH se disolviera completamente, formando una solución diluida.

2) Preparación de la segunda solución referente (II SR) con NaOH 0,1M:

- Se tomaron 5 mL de la solución referente (I SR) de concentración de 1×10^{-5} M con una pipeta volumétrica.
- Se transfirieron los 5 mL a un matraz de aforo de 100 mL.
- Luego se aforó el matraz con la solución blanco de NaOH al 0.1 M.

3) Medición de la Longitud de Onda:

- Se agitó de manera constante por 5 minutos, se filtró con filtros membrana de 0,45 μ m y luego la solución se llevó a una cubeta de cuarzo (Q).
- Luego, se realizó un barrido en el espectrofotómetro Bell Photonics UV-M51 con la opción “Wavelength Scan” del Programa software UV Professional 2 Analysis en un rango específico de longitud de onda, entre los 190 nm y los 300 nm.

2.3.3 Barrido espectrofotométrico de la solución referente Argireline® con mezcla solvente Acetato de Amonio 40 mM: Acetonitrilo (70:30).

Se prepararon cinco soluciones referentes de Argireline® a diferentes concentraciones conocidas, tomando en cuenta los puntos de 0,112; 0,096; 0,073; 0,050; 0,028 M. Estas soluciones se obtuvieron utilizando diferentes volúmenes del producto comercial Argireline® en matraces de 10 mL, los cuales se aforaron con la mezcla solvente Acetato de Amonio 40 mM: Acetonitrilo (70:30).

Luego, se realizaron barridos espectrofotométricos en cada una de estas soluciones, utilizando el espectrofotómetro Bell Photonics UV-M51. El propósito

de estos análisis fue determinar si todas las soluciones presentaban una absorción en el mismo valor de longitud de onda para establecer el valor de longitud de onda de máxima absorción (λ_{\max}).

2.4 Verificación del comportamiento lineal de la técnica a diferentes concentraciones de interés, de acuerdo con la Ley de Lambert-Beer para λ_{\max} seleccionada.

Para corroborar la linealidad de la técnica, se prepararon dos curvas de calibración a diferentes concentraciones con la segunda solución referente (II SR) con NaOH al 0.1 M, además, se preparó una tercera curva de calibración con la mezcla solvente Acetato de Amonio 40 mM: Acetonitrilo (70:30) a concentraciones conocidas. Estas soluciones se llevaron al espectrofotómetro Bell Photonics UV-M51 y utilizando el Software UV Professional 2 Analisisys, se creó en el programa una curva de calibración con los distintos puntos seleccionados, según las absorbancias obtenidas y se creó una gráfica representativa para observar la linealidad.

Este proceso se llevó a cabo con el objetivo de comprobar si se cumplía la ley de Lambert-Beer, que establece una relación lineal entre la absorbancia y la concentración de una sustancia en una solución. La creación de una curva de calibración a partir de estas concentraciones permitió determinar si el sistema de medición sigue esta ley fundamental de la espectrofotometría, lo que es esencial para asegurar la precisión y la validez de las mediciones en el análisis químico.

2.4.1 Primera Curva de Calibración en solución con NaOH 0.1 M

Se emplearon 6 matraces de aforo de 10 mL para preparar soluciones a diferentes concentraciones con hidróxido de sodio (NaOH) 0,1M, se tomaron volúmenes desde la solución II SR.

1) Solución a concentración 1×10^{-7} M de Acetil Hexapéptido – 8

- Se utilizó una micropipeta de 100-1000 μ L para medir con precisión 0.1 mL de la solución referente II SR y luego se transfirió a un matraz de 10 mL.
- El matraz se aforó con solución NaOH 0.1 M.

2) Solución a concentración 3×10^{-7} M de Acetil Hexapéptido – 8

- Se utilizó una micropipeta de 100-1000 μ L, para medir con precisión 0.3 mL de la solución referente II SR y luego se transfirió a un matraz de 10 mL.
- El matraz se aforó con solución NaOH 0.1 M.

3) Solución a concentración 5×10^{-7} M de Acetil Hexapéptido – 8

- Se utilizó una micropipeta de 100-1000 μ L, para medir con precisión 0.5 mL de la solución referente II SR y luego se transfirió a un matraz de 10 mL.
- El matraz se aforó con solución NaOH 0.1 M.

4) Solución a concentración 7×10^{-7} M de Acetil Hexapéptido – 8

- Se utilizó una micropipeta de 100-1000 μ L, para medir con precisión 0.7 mL de la solución referente II SR y luego se transfirió a un matraz de 10 mL.
- El matraz se aforó con solución NaOH 0.1 M.

5) Solución a concentración 9×10^{-7} M de Acetil Hexapéptido – 8

- Se utilizó una micropipeta de 100-1000 μ L, para medir con precisión 0.9 mL de la solución referente II SR y luego se transfirió a un matraz de 10 mL.
- El matraz se aforó con solución NaOH 0.1 M.

6) Solución a concentración 1×10^{-6} M de Acetil Hexapéptido – 8

- Se utilizó una micropipeta de 100-1000 μ L, para medir con precisión 1.0 mL de la solución referente II SR y luego se transfirió a un matraz de 10 mL.
- El matraz se aforó con solución NaOH 0.1 M.

2.4.2 Segunda Curva de Calibración en solución con NaOH 0.1 M

Se emplearon 6 matraces volumétricos de 10 mL para preparar soluciones a diferentes concentraciones con hidróxido de sodio (NaOH) 0,1M, se tomaron volúmenes desde la solución II SR.

1) Solución a concentración 5×10^{-7} M de Acetil Hexapéptido – 8

- Se utilizó una micropipeta de 100-1000 μ L para medir con precisión 0.5 mL de la solución II SR y luego se transfirió a un matraz de 10 mL.
- El matraz se aforó con solución NaOH 0.1 M.

2) Solución a concentración 3×10^{-7} M de Acetil Hexapéptido – 8

- Se utilizó una micropipeta de 100-1000 μ L, para medir con precisión 0.3 mL de la solución referente II SR y luego se transfirió a un matraz de 10 mL.
- El matraz se aforó con solución NaOH 0.1 M.

3) Solución a concentración 1×10^{-7} M de Acetil Hexapéptido – 8

- Se utilizó una micropipeta de 100-1000 μ L, para medir con precisión 0.1 mL de la solución referente II SR y luego se transfirió a un matraz de 10 mL.
- El matraz se aforó con solución NaOH 0.1 M.

4) Solución a concentración 9×10^{-8} M de Acetil Hexapéptido – 8

- Se utilizó una micropipeta de 100-1000 μ L, para medir con precisión 0.09 mL de la solución referente II SR y luego se transfirió a un matraz de 10 mL.
- El matraz se aforó con solución NaOH 0.1 M.

5) Solución a concentración 7×10^{-8} M de Acetil Hexapéptido – 8

- Se utilizó una micropipeta de 100-1000 μ L, para medir con precisión 0.07 mL de la solución referente II SR y luego se transfirió a un matraz de 10 mL.
- El matraz se aforó con solución NaOH 0.1 M.

6) Solución a concentración 5×10^{-8} M de Acetil Hexapéptido – 8

- Se utilizó una micropipeta de 100-1000 μL , para medir con precisión 0.05 mL de la solución referente II SR y luego se transfirió a un matraz de 10 mL.
- El matraz se aforó con solución NaOH 0.1 M.

2.4.3 Tercera Curva de Calibración en solución con mezcla solvente Acetato de Amonio 40 mM: Acetonitrilo (70:30).

Se prepararon otras seis soluciones de referencia a diferentes concentraciones para corroborar que la curva cumplieran con la linealidad. Se emplearon 6 matraces volumétricos de 10 mL. En este procedimiento se tomaron diferentes volúmenes directamente del producto comercial Argireline® para completar la curva de calibración.

1) Solución a concentración 0.112 M de Acetil Hexapéptido – 8

- Se utilizó una micropipeta de 100-1000 μL para medir con precisión 1.86 mL del compuesto Argireline® y luego se transfirió a un matraz de 10 mL.
- El matraz se aforó con la mezcla en proporción 70:30.

2) Solución a concentración 0.096 M de Acetil Hexapéptido – 8

- Se utilizó una micropipeta de 100-1000 μL , para medir con precisión 1.58 mL del compuesto Argireline® y luego se transfirió a un matraz de 10 mL.
- El matraz se aforó con la mezcla en proporción 70:30.

3) Solución a concentración 0.073 M de Acetil Hexapéptido – 8

- Se utilizó una micropipeta de 100-1000 μL , para medir con precisión 1.21 mL del compuesto Argireline® y luego se transfirió a un matraz de 10 mL.
- El matraz se aforó con la mezcla en proporción 70:30.

4) **Solución a concentración 0.050 M de Acetil Hexapéptido – 8**

- Se utilizó una micropipeta de 100-1000 μL , para medir con precisión 0.84 mL del compuesto Argireline® y luego se transfirió a un matraz de 10 mL.
- El matraz se aforó con la mezcla en proporción 70:30.

5) **Solución a concentración 0.028 M de Acetil Hexapéptido – 8**

- Se utilizó una micropipeta de 100-1000 μL , para medir con precisión 0.46 mL del compuesto Argireline® y luego se transfirió a un matraz de 10 mL.
- El matraz se aforó con la mezcla en proporción 70:30.

Después de preparar los matraces con los diferentes niveles de concentraciones para cada punto de la curva de calibración, todas las soluciones se filtraron con filtros de membrana 0,22 μm y luego se colocaron en cubetas de cuarzo (Q) y finalmente se llevaron espectrofotómetro Bell Photonics UV-M51. Utilizando el software del espectrofotómetro, se eligió la opción "Curva Estándar" y se ingresan datos como curva de calibración y rango de medición para generar lecturas de absorbancia en un valor específico de λ_{max} .

5.3.3 Etapa 3. Implementación el método desarrollado para la determinar la cuantificación del activo en cosméticos Anti - Edad.

En esta etapa se realizó la implementación del método analítico desarrollado en esta unidad de investigación para la cuantificación del activo cosmético Acetil Hexapéptido – 8 desde la crema formulada mediante el Método de Adición de Estándar.

3.1 Aplicación del Método de Adición de Estándar a la crema formulada por la presencia de interferencias

Se determinaron cinco puntos que estuvieran dentro del rango de concentraciones (0,028 M – 0,112 M) de la curva de calibración con la mezcla de acetato de amonio al 40 mM: acetonitrilo (70:30), esto con el fin de preparar las soluciones a diferente concentración para el método de adición de estándar. Para ello, se tomaron diferentes volúmenes del producto comercial Argireline®.

Se emplearon cinco matraces volumétricos de 25 mL para la preparación de las soluciones a concentraciones de 0,045, 0,056, 0,067, 0,078, 0,089 M. A cada matraz rotulado con su respectiva concentración se agregaron 0,1 g de crema cosmética con el activo cosmético Acetil Hexapéptido – 8, luego se adicionaron los volúmenes de Argireline® para cada concentración estimada, y posteriormente se aforaron con la mezcla de acetato de amonio 40mM: acetonitrilo en proporción 70:30

Una vez preparadas las soluciones, se colocaron en tubos eppendorf de 2 mL y se llevaron a la centrifuga a 15.000 rpm por 35 minutos para obtener el sobrenadante que es la fase acuosa donde se encuentra el activo cosmético, luego se filtraron con filtros de membrana hidrofóbicos de PTFE de 0,22 µm para obtener soluciones limpias de residuos de crema y se colocaron en cubetas de cuarzo (Q) para llevar al espectrofotómetro Bell Photonics UV-M51 y crear una gráfica de curva de calibración con la opción de “Standar Curve”, para finalmente extrapolar los datos y poder cuantificar el Acetil Hexapéptido – 8 según la ecuación de Lambert beer.

3.1.1 Cálculos para la adición de volúmenes de Argireline® en la curva de cuantificación.

Cálculos respectivos

1) Calcular los gramos de Acetil Hexapéptido – 8

$$M = \frac{n \text{ (moles)}}{\text{Volumen (L)}} \rightarrow n = M \times V$$

$$n = 1 \times 10^{-4} M \times 0.1 \text{ L}$$

$$n = 1 \times 10^{-6} \text{ moles de Acetil Hexapeptido – 8}$$

$$n = \frac{m(g)}{PM \left(\frac{g}{mol}\right)} \rightarrow m = n \times PM$$

$$m = 1 \times 10^{-6} M \times 889.0 \frac{g}{mol}$$

$$m = 8.89 \times 10^{-4} \text{ g de Acetil Hexapeptido – 8}$$

2) Calcular cuantos gramos necesito tomar del producto comercial (Argireline) para tener $8.89 \times 10^{-4} \text{ g}$ de Acetil Hexapeptido – 8

$$100 \text{ mL de producto comercial} \rightarrow 0.05 \text{ g de Acetil Hexapeptido – 8}$$

$$X \text{ mL de producto comercial} \rightarrow 8.89 \times 10^{-4} \text{ g de Acetil Hexapeptido – 8}$$

$$X \text{ g de producto comercial} = 1,78 \text{ g de Argireline}$$

3) Calcular el volumen que debo tomar de producto comercial

$$d = \frac{m(g)}{V(ml)} \rightarrow V = \frac{m}{d} \rightarrow V = \frac{1,78 \text{ g de Argireline}}{1,074 \text{ g/ml}}$$

$$V = 1,65 \text{ mL de Argireline}$$

4) Calcular volumen de producto comercial según la concentración (Ejemplo 0,045 M) $\rightarrow (40 \mu\text{g/mL} \times 10 \text{ mL} = 400 \mu\text{g})$

$$400 \mu\text{g de Acetil Hexapeptido – 8} \rightarrow 0,8 \text{ g de Producto comercial}$$

$$V = \frac{0,8 \text{ g de Argireline}}{1,074 \text{ g/ml}} = 0,745 \text{ mL} \times 25 \text{ mL (matraz de aforo)} = 1,86 \text{ mL}$$

Solución a concentración 0.045 M de Acetil hexapéptido – 8

- Se utilizó una micropipeta de 100-1000 μL , para medir con precisión 1.86 mL del Argireline[®] y luego se transfirió a un matraz de 25 mL.

Solución a concentración 0.056 M de Acetil hexapéptido – 8

- Se utilizó una micropipeta de 100-1000 μL , para medir con precisión 2.33 mL del Argireline[®] y luego se transfirió a un matraz de 25 mL.

Solución a concentración 0.067 M de Acetil hexapéptido – 8

- Se utilizó una micropipeta de 100-1000 μL , para medir con precisión 2.80 mL del Argireline[®] y luego se transfirió a un matraz de 25 mL.

Solución a concentración 0.078 M de Acetil hexapéptido – 8

- Se utilizó una micropipeta de 100-1000 μL , para medir con precisión 3.25 mL del Argireline[®] y luego se transfirió a un matraz de 25 mL.

Solución a concentración 0.089 M de Acetil hexapéptido – 8

- Se utilizó una micropipeta de 100-1000 μL , para medir con precisión 3.73 mL del Argireline[®] y luego se transfirió a un matraz de 25 mL.

3.1.2 Procedimiento para la preparación del método de adición de estándar

- 1) Se utilizaron 5 matraces de aforo de 25 mL, con ayuda de una jeringa de 1 mL previamente llenada con crema cosmética, se pesaron 0.1 g en la balanza analítica en cada matraz rotulado.
- 2) Se agregaron diferentes cantidades determinadas de producto comercial Argireline[®] a cada matraz según la concentración establecida en la sección anterior (0,045 ; 0,056; 0,067; 0,078; 0,089 M).

- 3) Una vez ya agregados los dos puntos anteriores, se aforó cada matraz rotulado con la mezcla solvente Acetato de Amonio 40 mM: Acetonitrilo (70:30) y luego se aplicó agitación manual durante 2 minutos.
- 4) Cada solución se transfirió a dos tubos eppendorf de 2 mL, también debidamente rotulados para cada concentración. Posteriormente se colocaron los tubos en la centrifugadora a 15,000 rpm durante 35 minutos.
- 5) Después de la centrifugación, se filtró cada solución utilizando filtros de membrana hidrofóbicos PTFE de 0,22 μm y se transfirieron a cubetas de cuarzo (Q) para su posterior medición.
- 6) En el programa asociado al espectrofotómetro Bell Photonics UV-M5 se creó una curva de calibración para determinar la concentración del activo.

5.3.4 Etapa 4. Reporte de los resultados analíticos obtenidos en la cuantificación de Acetil Hexapéptido – 8 en cosméticos Anti- edad de uso tópico, a través de la técnica de espectrofotometría UV- Vis

Para la cuantificación del activo cosmético Acetil Hexapéptido – 8 se realizó el reporte de los resultados usando el programa Software UV Professional 2 Analysis como herramienta asociada al espectrofotómetro Bell Photonics UV-M5. Este programa se instaló en un ordenador con el sistema operativo Windows 10 con un manual que venían de fábrica con el equipo, el cual se activó con la ayuda de un pendrive.

El ordenador se conectó directamente al espectrofotómetro mediante el uso de un cable USB, con el propósito de que todos los resultados de cada experimento se vieran reflejados en el Software. Todos los datos obtenidos se descargaron directamente y se guardaron en archivo Excel del sistema operativo Microsoft Windows 7, con este programa se realizaron todos los gráficos y cálculos respectivos para cada resultado

Se establecieron gráficos para cada barrido espectrofotométrico, evaluando los parámetros de Absorbancia v/s Longitud de onda (nm) para identificar el valor del λ_{max} . Los gráficos para las curvas de calibración están asociadas a tablas que visualizan los valores de cada concentración con su respectivo valor de absorbancia y, por último, el grafico del método de adición de estándar.

Resultados

6. RESULTADOS

6.1 Características fisicoquímicas del cosmético de uso tópico que contiene Acetil Hexapéptido – 8.

Se realizaron mediciones de pH a la matriz cosmética y a la crema cosmética, bajo las condiciones descritas en la sección 1.1. Los valores obtenidos se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 6.1. pH de las formulaciones cosméticas

Solución	Valor de pH
Matriz cosmética	5,32
Crema cosmética	5,44

Tabla 6.2. Características organolépticas de la crema cosmética

Característica	Resultado Organoléptico
Aspecto	Ligero
Color	Blanco
Olor	Sin Aroma
Textura	Lisa

6.2 Evaluación de la interferencia de los solventes en la determinación del Acetil Hexapéptido – 8 a través de la técnica Espectrofotometría UV-Vis.

6.2.1 Barrido espectrofotométrico del Agua

Se evaluó la interferencia espectrofotométrica del agua como solvente realizando un barrido fotométrico en las longitudes de onda comprendidas entre 190 – 330 nm, evidenciando que no hay absorción. Los resultados se presentan en el grafico 1.

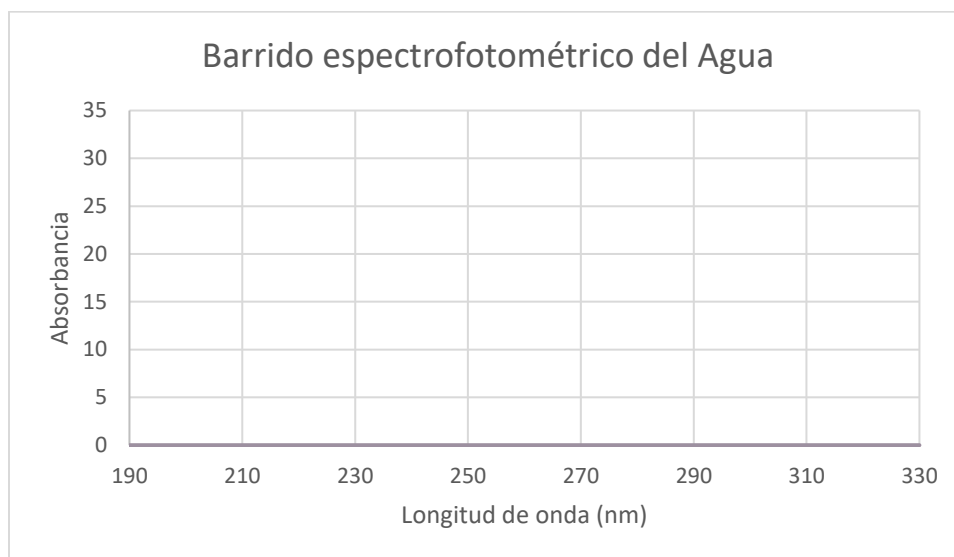


Gráfico 1. Barrido espectrofotométrico del Agua

Fuente propia. Gráfico realizado con Excel del sistema operativo Microsoft Windows 7 con datos obtenidos del Software UV Professional 2 Analisis del espectrofotómetro Bell Photonics UV-M5

6.2.2 Barrido espectrofotométrico del Acetato de etilo

Se evaluó la interferencia espectrofotométrica del solvente Acetato de etilo, realizando un barrido fotométrico en las longitudes de onda comprendidas entre 190 – 330 nm, presentando un valor de λ_{\max} de 235 nm y una absorbancia de 3,3125. Los resultados se presentan en el grafico 2.

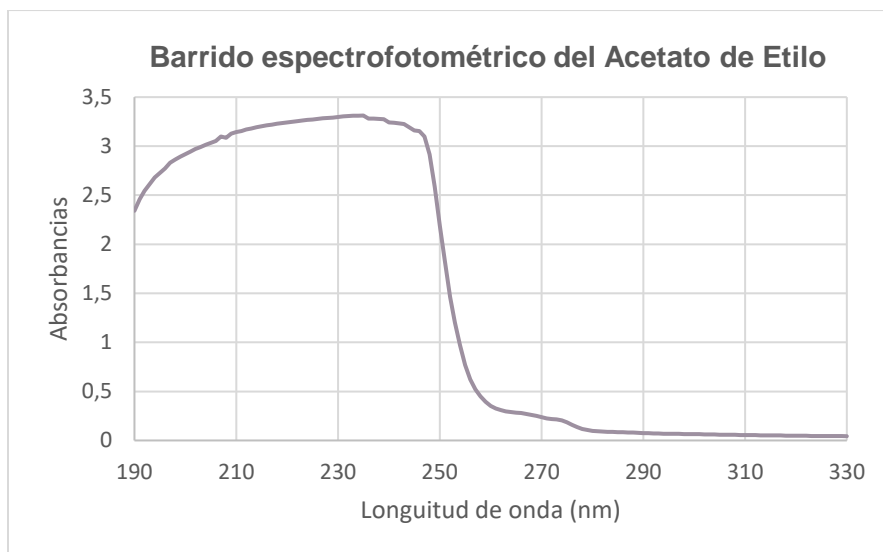


Gráfico 2. Barrido espectrofotométrico del solvente Acetato de Etilo

Fuente propia. Gráfico realizado con Excel del sistema operativo Microsoft Windows 7 con datos obtenidos del Software UV Professional 2 Analisis del espectrofotómetro Bell Photonics UV-M5

6.2.3 Barrido espectrofotométrico del Cloroformo

Se evaluó la interferencia espectrofotométrica del solvente Cloroformo, realizando un barrido fotométrico en las longitudes de onda comprendidas entre 190 – 330 nm, presentando un valor de λ_{\max} de 223 nm y una absorbancia de 2,5638. Los resultados se presentan en el grafico 3.

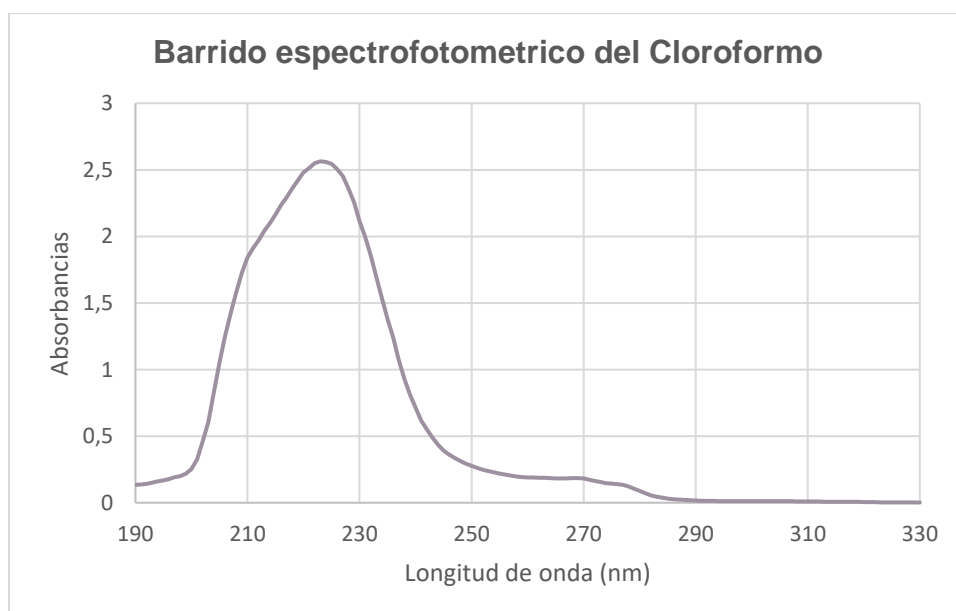


Gráfico 3. Barrido espectrofotométrico del solvente Cloroformo

Fuente propia. Gráfico realizado con Excel del sistema operativo Microsoft Windows 7 con datos obtenidos del Software UV Professional 2 Analisis del espectrofotómetro Bell Photonics UV-M5

6.2.4 Barrido espectrofotométrico de la mezcla solvente Acetato de Amonio 40 mM: Acetonitrilo (70:30).

Se evaluó la interferencia espectrofotométrica de la mezcla de Acetato de Amonio 40 mM: Acetonitrilo (70:30), realizando un barrido fotométrico en las longitudes de onda comprendidas entre 190 – 330 nm, presentando un valor de λ_{\max} de 207 nm y una absorbancia de 1,7198. Los resultados se presentan en el grafico 4.

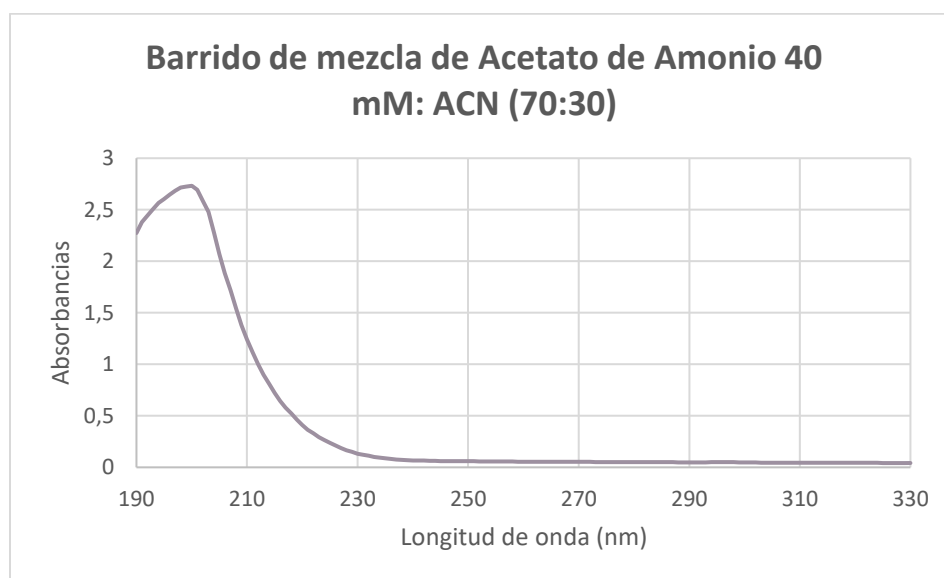


Gráfico 4. Barrido espectrofotométrico de la mezcla de Acetato de Amonio 40 mM: ACN (70:30)

Fuente propia. Gráfico realizado con Excel del sistema operativo Microsoft Windows 7 con datos obtenidos del Software UV Professional 2 Analisis del espectrofotómetro Bell Photonics UV-M5

6.3 Evaluación de la interferencia de los solventes junto a la matriz cosmética en la determinación del Acetil Hexapéptido – 8.

6.3.1 Barrido espectrofotométrico de la matriz en solución con Agua

Se evaluó la interferencia espectrofotométrica de la matriz cosmética en solución con agua, realizando un barrido fotométrico en las longitudes de onda comprendidas entre 190 – 330 nm, presentando un valor de λ_{\max} de 230 nm y una absorbancia de 3,37161. Los resultados se presentan en el grafico 5.

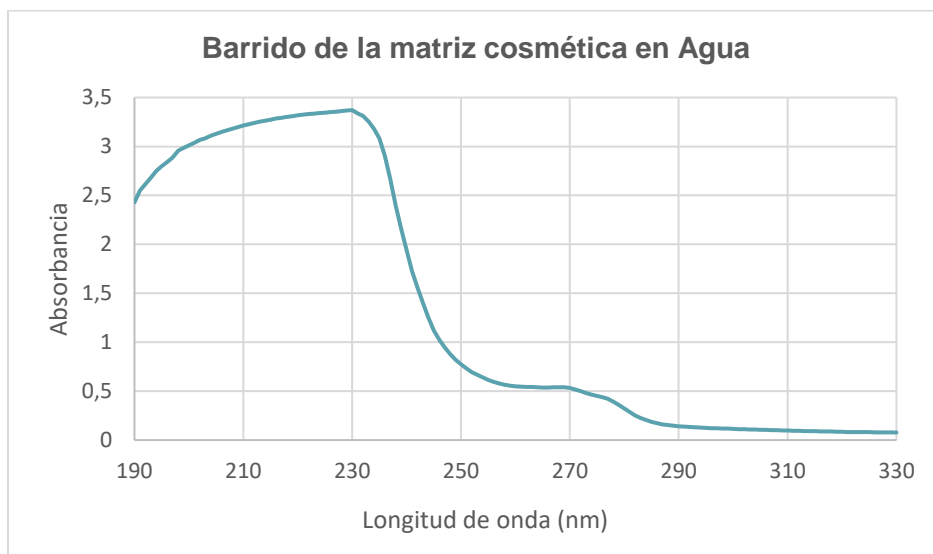


Gráfico 5. Barrido espectrofotométrico de la matriz cosmética en Agua

Fuente propia. Gráfico realizado con Excel del sistema operativo Microsoft Windows 7 con datos obtenidos del Software UV Professional 2 Analisis del espectrofotómetro Bell Photonics UV-M5

6.3.2 Barrido espectrofotométrico de la matriz en solución con Acetato de etilo

Se evaluó la interferencia espectrofotométrica de la matriz cosmética en solución con acetato de etilo, realizando un barrido fotométrico en las longitudes de onda comprendidas entre 190 – 330 nm, presentando un valor de λ_{\max} de 272 nm y una absorbancia de 1,981. Los resultados se presentan en el grafico 6.

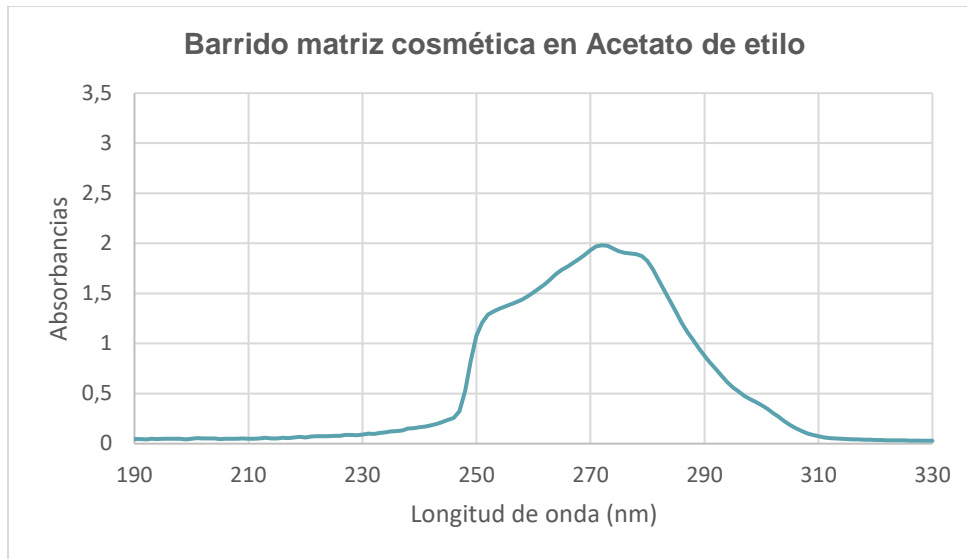


Gráfico 6. Barrido espectrofotométrico de la matriz cosmética en Acetato de etilo

Fuente propia. Gráfico realizado con Excel del sistema operativo Microsoft Windows 7 con datos obtenidos del Software UV Professional 2 Analisis del espectrofotómetro Bell Photonics UV-M5

6.3.3 Barrido espectrofotométrico de la matriz en solución con Cloroformo

Se evaluó la interferencia espectrofotométrica de la matriz cosmética en solución con cloroformo, realizando un barrido fotométrico en las longitudes de onda comprendidas entre 190 – 330 nm, presentando un valor de λ_{\max} de 279 nm y una absorbancia de 1,2315. Los resultados se presentan en el grafico 7.

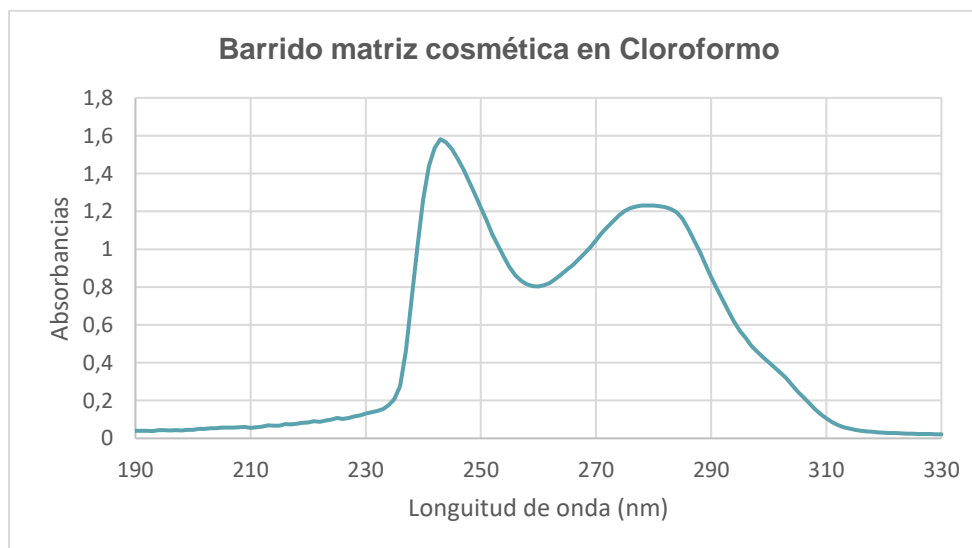


Gráfico 7. Barrido espectrofotométrico de la matriz cosmética en Cloroformo

Fuente propia. Gráfico realizado con Excel del sistema operativo Microsoft Windows 7 con datos obtenidos del Software UV Professional 2 Analisis del espectrofotómetro Bell Photonics UV-M5.

6.3.4 Matriz con mezcla solvente Acetato de Amonio 40 mM: Acetonitrilo (70:30)

Se evaluó la interferencia espectrofotométrica de la matriz cosmética en solución con la mezcla solvente acetato de amonio 40mM: acetonitrilo (70:30), realizando un barrido fotométrico en las longitudes de onda comprendidas entre 190 – 330 nm, presentando un valor de λ_{\max} de 235 nm y una absorbancia de 3,2676. Los resultados se presentan en el grafico 8.

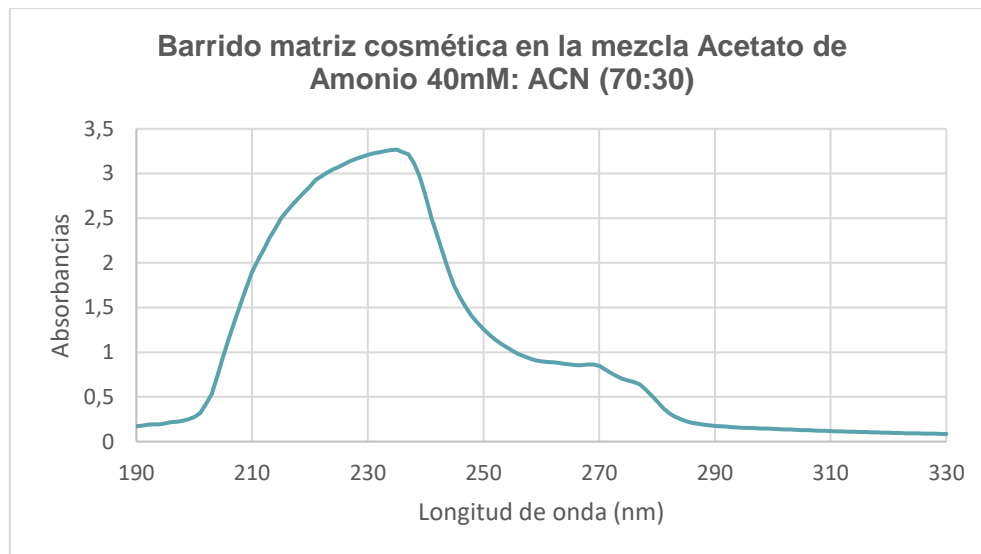


Gráfico 8. Barrido espectrofotométrico de la matriz cosmética con la mezcla Acetato de Amonio 40mM: ACN (70:30)

Fuente propia. Gráfico realizado con Excel del sistema operativo Microsoft Windows 7 con datos obtenidos del Software UV Professional 2 Analisis del espectrofotómetro Bell Photonics UV-M5

6.4 Barrido espectrofotométrico de la solución de referencia del activo cosmético Acetil Hexapéptido – 8.

6.4.1 Solución referente de Argireline® en solución con agua

Se determinó el valor de longitud de onda de máxima absorción (λ_{\max}) mediante un barrido espectrofotométrico de la solución referente I SR de Argireline® en agua a concentración de 1×10^{-5} M para evaluar el punto de máxima absorbancia, entregando un valor de λ_{\max} de 190 nm con una absorbancia de 1,2084, como se evidencia en el siguiente grafico 9.

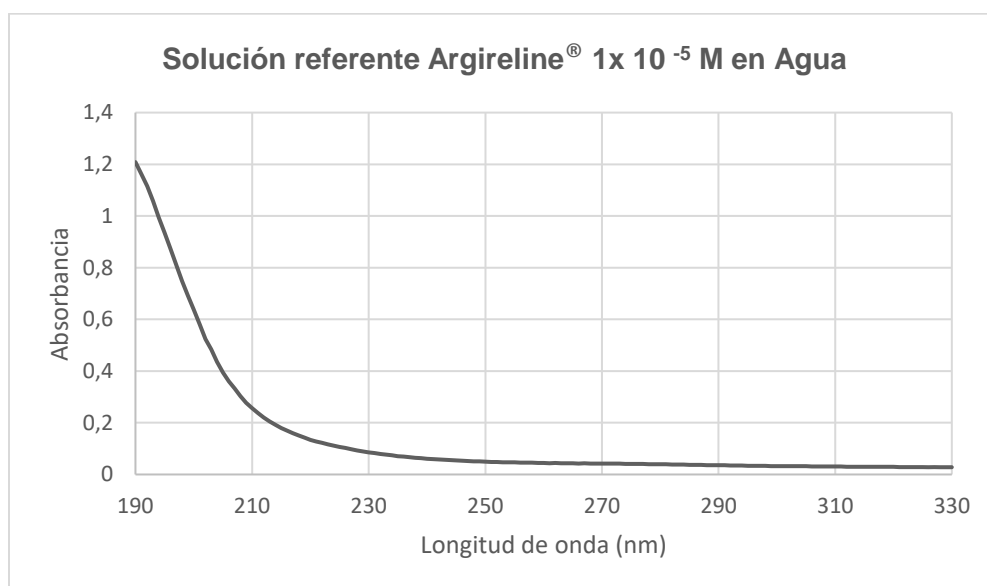


Gráfico 9. Barrido espectrofotométrico de la Solución referente Argireline® 1×10^{-5} M en Agua

Fuente propia. Gráfico realizado con Excel del sistema operativo Microsoft Windows 7 con datos obtenidos del Software UV Professional 2 Analisis del espectrofotómetro Bell Photonics UV-M5

6.4.2 Solución referente de Argireline® en solución con NaOH 0.1 M

Se determinó el valor de longitud de onda de máxima absorción (λ_{\max}) mediante un barrido espectrofotométrico de la solución referente I SR de Argireline® en NaOH 0,1M a concentración de 1×10^{-5} M para evaluar el punto de máxima

absorbancia, entregando un valor de λ_{\max} de 198 nm con una absorbancia de 2,4302, como se evidencia en el siguiente grafico 10.

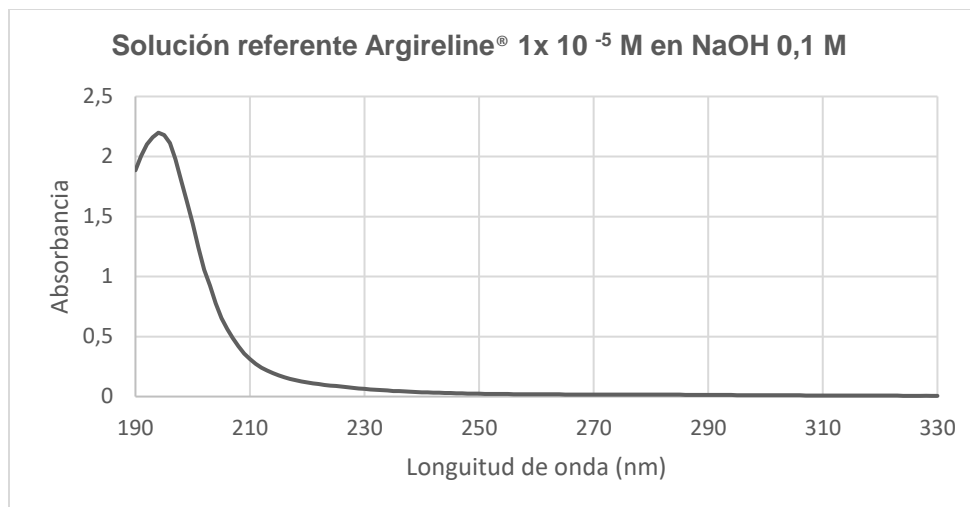


Gráfico 10. Barrido espectrofotométrico de la Solución referente Argireline® 1x 10⁻⁵ M en NaOH 0,1M

Fuente propia. Gráfico realizado con Excel del sistema operativo Microsoft Windows 7 con datos obtenidos del Software UV Professional 2 Analisis del espectrofotómetro Bell Photonics UV-M5

6.5 Verificación del comportamiento lineal de la técnica a diferentes concentraciones de interés, de acuerdo con la Ley de Lambert-Beer para λ_{\max} seleccionada.

6.5.1 Primera curva de calibración de solución referencia Argireline® con Hidróxido de sodio (NaOH) 0,1M.

La primera curva de solución referencia de Argireline® se creó con diferentes concentraciones. Estas concentraciones fueron previamente preparadas a partir de la solución II SR, y se llevaron a cabo barridos espectrofotométricos para su análisis.

En el gráfico siguiente, se presentan los resultados derivados del barrido espectrofotométrico, siendo cada solución obtenida identificada mediante colores distintos.

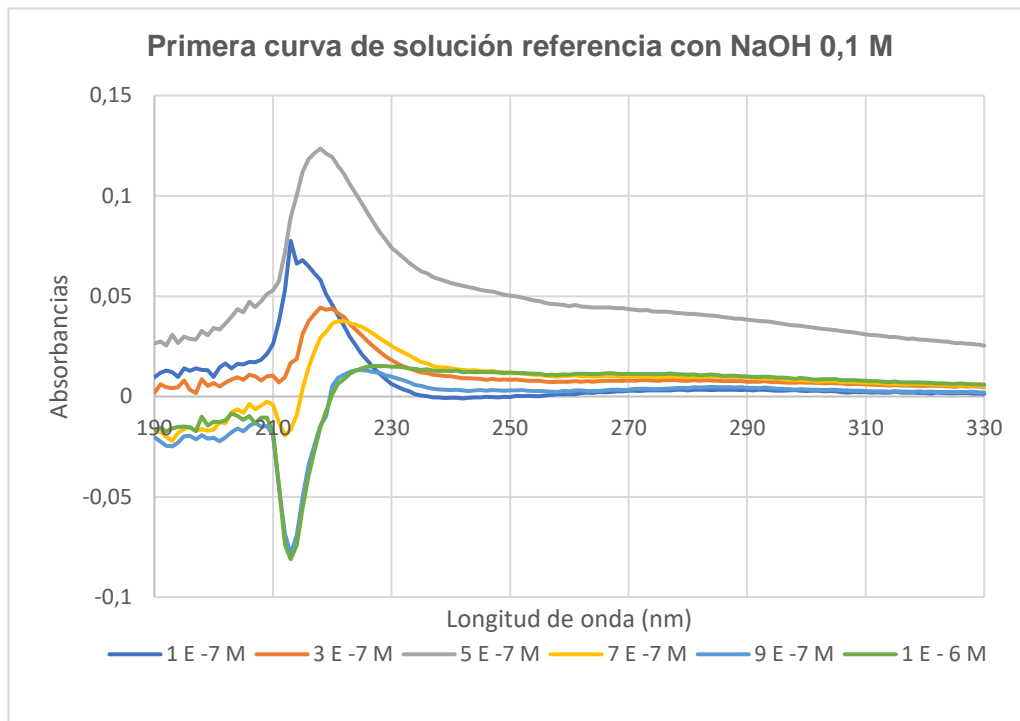


Gráfico 11. Barridos espectrofotométricos de la primera curva de calibración de las soluciones de referencia con NaOH 0,1 M

Fuente propia. Gráfico realizado con Excel del sistema operativo Microsoft Windows 7 con datos obtenidos del Software UV Professional 2 Analisis del espectrofotómetro Bell Photonics UV-M5

En la siguiente tabla se presentan los valores de λ_{\max} con sus respectivas absorbancias obtenidas de los barridos presentados en el gráfico anterior:

Tabla 6.3 Primera curva de calibración utilizando como solvente NaOH 0,1 M

Concentración Solución de referencia	λ max (nm)	Absorbancia
1×10^{-7} M	213	0.0776
3×10^{-7} M	218	0.0443
5×10^{-7} M	218	0,1236
7×10^{-7} M	221	0,0375
9×10^{-7} M	225	0,0132
1×10^{-6} M	227	0.0152

Esta curva de calibración se preparó con los puntos presentados en la tabla anterior, esto se realizó con el fin de verificar la linealidad a diferentes concentraciones. El siguiente grafico demuestra un valor de coeficiente de determinación (R^2) de 0,3871, y las etiquetas de datos indicando los valores de absorbancias.

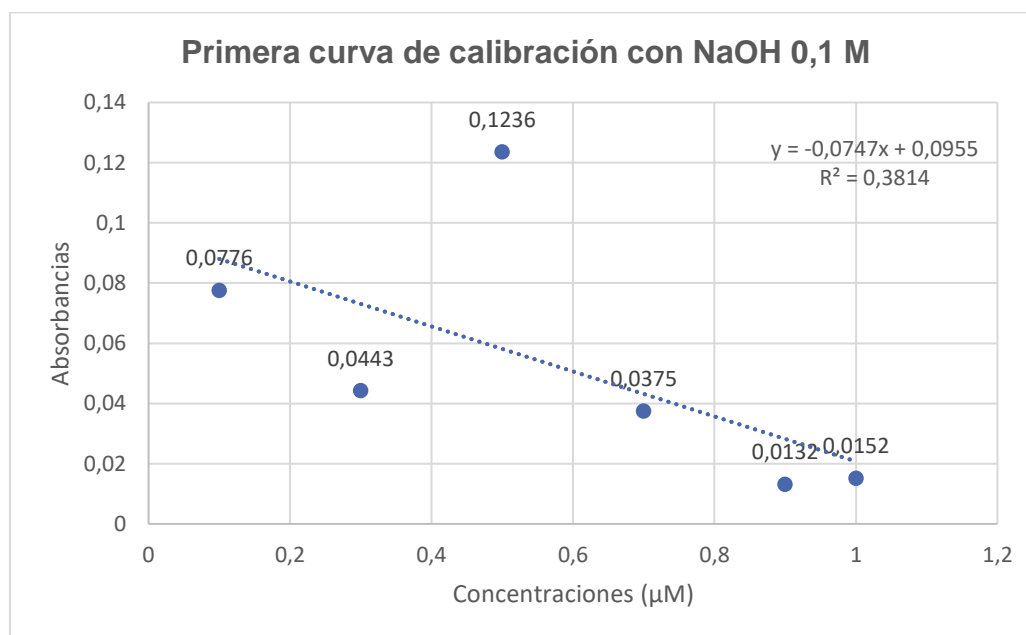


Gráfico 12. Primera curva de calibración con NaOH 0,1M

P valúe < 0,05, Valor experimental t calculado: - 1,57, Valor estadístico t crítico: 3,18

Fuente propia. Gráfico realizado con Excel del sistema operativo Microsoft Windows 7 con datos obtenidos del Software UV Professional 2 Analisis del espectrofotómetro Bell Photonics UV-M5

6.5.2 Segunda curva de calibración de solución referencia Argireline® con Hidróxido de sodio (NaOH) 0,1M.

Se preparó la segunda curva de solución de referencia Argireline® a diferentes concentraciones, considerando los puntos 5×10^{-7} M, 3×10^{-7} M, 1×10^{-7} M, 9×10^{-8} M, 7×10^{-8} M, 5×10^{-8} M. Estas concentraciones fueron previamente preparadas a partir de la solución II SR, y se llevaron a cabo barridos espectrofotométricos para su análisis.

En el gráfico siguiente, se presentan los resultados derivados del barrido espectrofotométrico, siendo cada solución obtenida identificada mediante colores distintos.

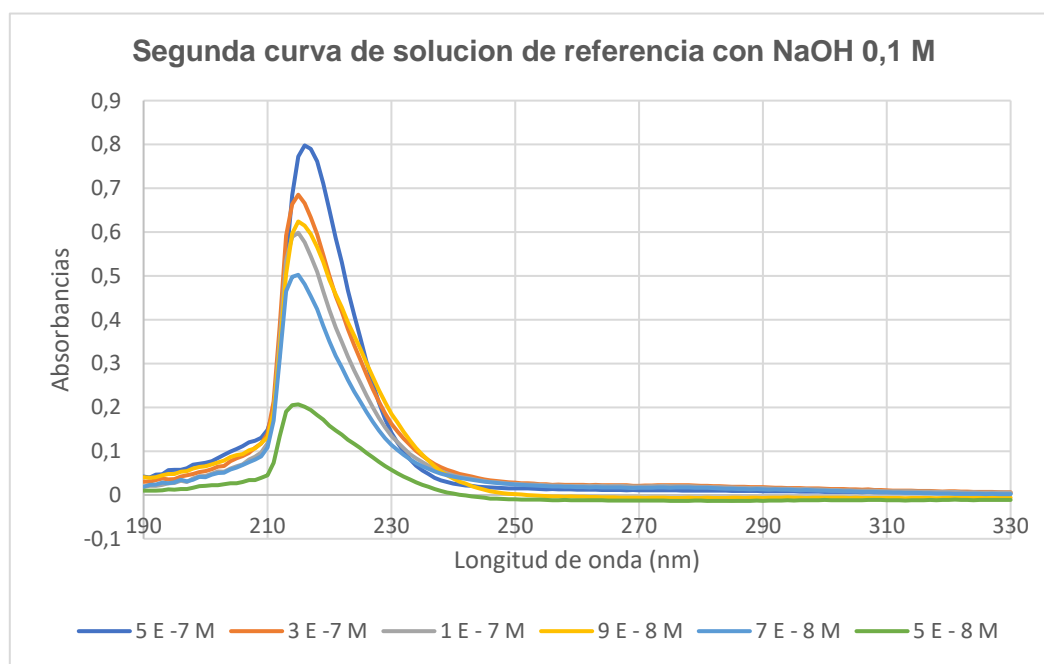


Gráfico 13. Barridos espectrofotométricos de la segunda curva de calibración de las soluciones de referencia con NaOH 0,1 M

Fuente propia. Gráfico realizado con Excel del sistema operativo Microsoft Windows 7 con datos obtenidos del Software UV Professional 2 Analisis del espectrofotómetro Bell Photonics UV-M5

En la siguiente tabla se presentan los valores de λ_{\max} con sus respectivas absorbancias obtenidas de los barridos presentados en el gráfico anterior:

Tabla 6.4. Segunda curva de calibración utilizando como solvente NaOH 0,1M

Concentración Solución de referencia	λ_{\max} (nm)	Absorbancia
5×10^{-7} M	215	0.7977
3×10^{-7} M	215	0.6852
1×10^{-7} M	215	0.5984
9×10^{-8} M	215	0.6242
7×10^{-8} M	216	0.5024
5×10^{-8} M	216	0.2067

Esta curva de calibración se preparó con los puntos presentados en la tabla anterior, esto se realizó con el fin de verificar la linealidad a diferentes concentraciones. El siguiente gráfico demuestra un valor de coeficiente de determinación (R^2) de 0,8411, y las etiquetas de datos indicando los valores de absorbancias.

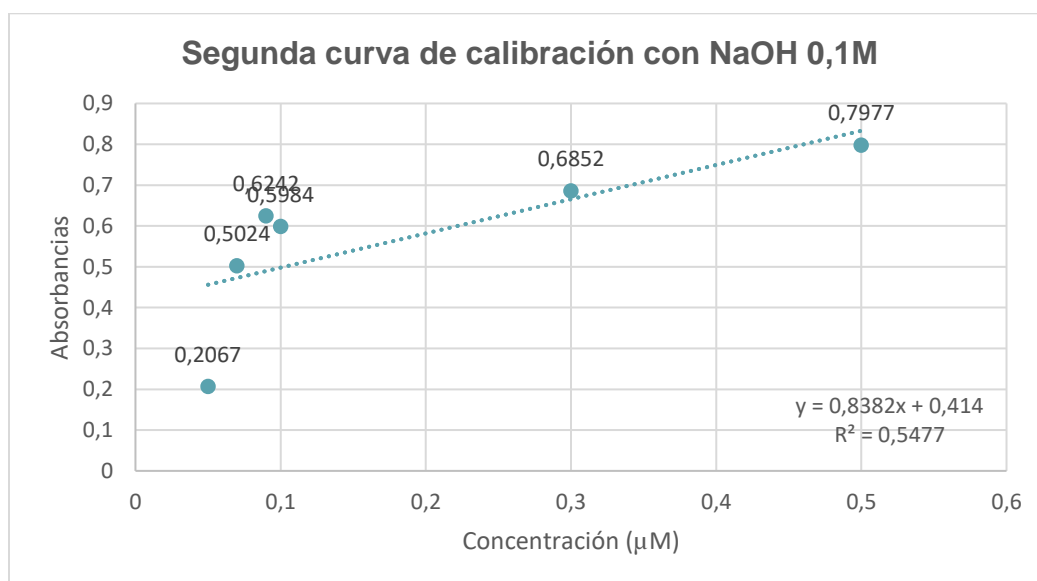


Gráfico 14. Segunda curva de calibración con NaOH 0,1M

P valúe > 0,05, Valor experimental t calculado: 2,20, Valor estadístico t crítico: 3,18

Fuente propia. Gráfico realizado con Excel del sistema operativo Microsoft Windows 7 con datos obtenidos del Software UV Professional 2 Analisis del espectrofotómetro Bell Photonics UV-M5

6.5.3 Tercera Curva de Calibración en solución con mezcla solvente Acetato de Amonio 40 mM: Acetonitrilo (70:30).

Se preparó una tercera curva de solución de referencia Argireline® a diferentes concentraciones, considerando los puntos 0.112, 0.096, 0.073, 0.050, 0.028 M. Estos puntos se prepararon tomando diferentes volúmenes del producto comercial Argireline® y se llevaron a cabo barridos espectrofotométricos para su análisis.

En el siguiente gráfico, se presentan los resultados derivados del barrido espectrofotométrico, siendo cada solución obtenida identificada mediante colores distintos.

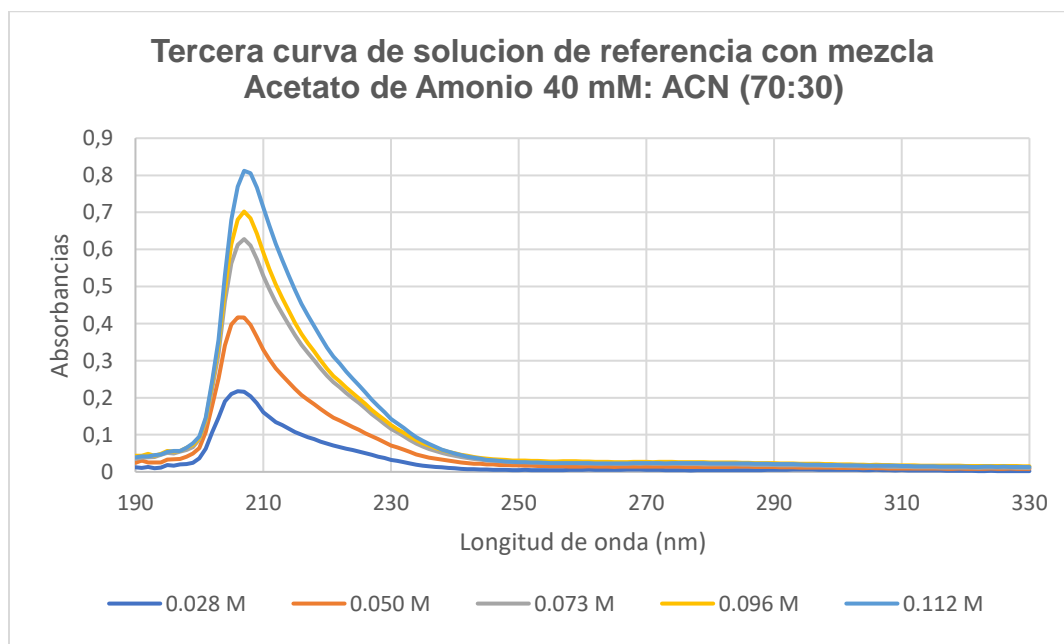


Gráfico 15. Barridos espectrofotométricos de la curva de calibración de las soluciones de referencia con la mezcla 70:30

Fuente propia. Gráfico realizado con Excel del sistema operativo Microsoft Windows 7 con datos obtenidos del Software UV Professional 2 Analisis del espectrofotómetro Bell Photonics UV-M5.

En la siguiente tabla se obtienen los valores de λ_{\max} con sus respectivas absorbancias, obteniendo los siguientes gráficos.

Tabla 6.5. Tercera curva solución de referencia con Mezcla 70:30

Concentración Solución de referencia	λ_{\max} (nm)	Absorbancia
0.112 M	207	0.8121
0.096 M	207	0.7023
0.073 M	207	0,5215
0.050 M	206	0.4166
0.028 M	206	0.2175

Esta curva de calibración se preparó con los puntos de las soluciones preparadas de estándar con la Mezcla de Acetato de amonio y acetonitrilo en una proporción 70:30, esto se realizó con el fin de verificar la linealidad a diferentes concentraciones. Se demuestra en el siguiente gráfico con un valor de coeficiente de determinación (R^2) de 0,993.

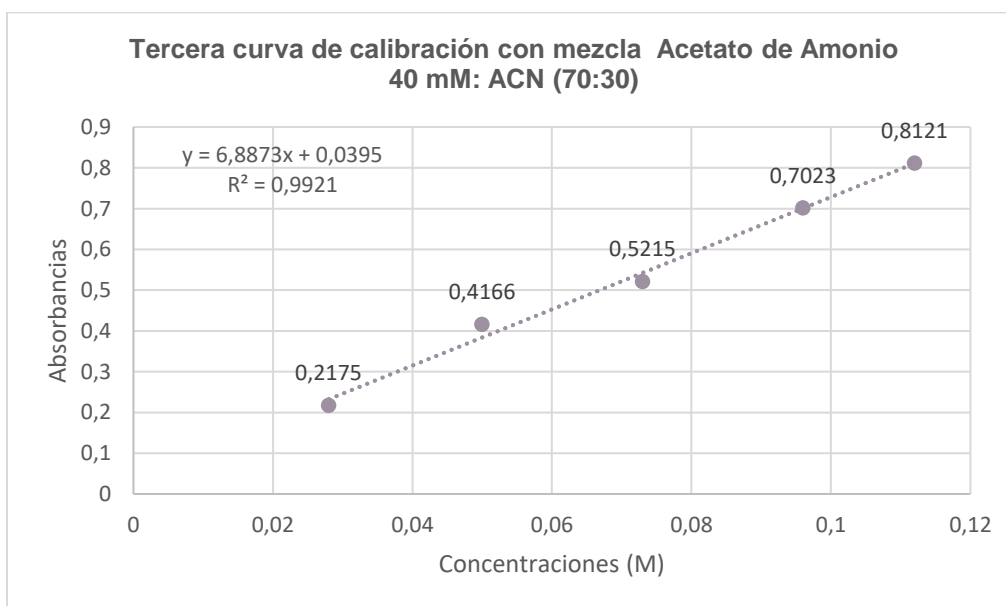


Gráfico 16. Tercera curva de calibración con la mezcla Acetato de amonio 40mM: Acetonitrilo (70:30)

P valúe < 0,05, Valor experimental t calculado: 19,45, Valor estadístico t crítico: 3,18

Fuente propia. Gráfico realizado con Excel del sistema operativo Microsoft Windows 7 con datos obtenidos del Software UV Professional 2 Analisis del espectrofotómetro Bell Photonics UV-M5

6.6 Aplicación del Método de Adición de Estándar a la crema formulada por presencia de interferencias

Una vez obtenida la linealidad de la curva del estándar junto a la mezcla en proporción 70:30, se procede a realizar un método de adición estándar producto de las interferencias obtenidas dentro de la matriz cosmética. Por lo que se prepararon cinco soluciones con la crema cosmética y el estándar de Argireline® para extrapolar los datos y obtener la concentración del Acetil Hexapéptido – 8.

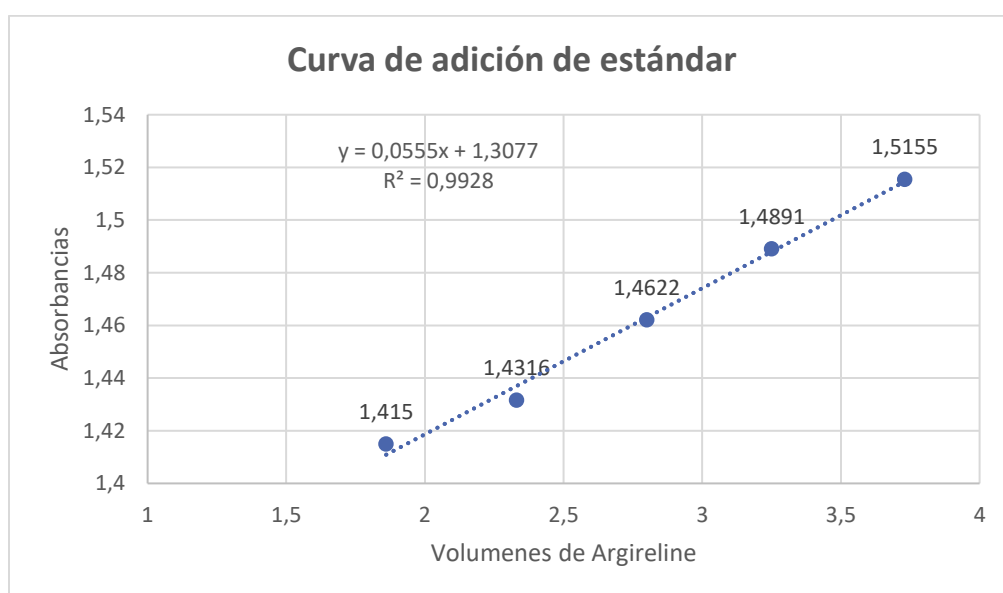


Gráfico 17. Curva de adición de estándar

P valúe < 0,05, Valor experimental *t calculado*: 20,36, Valor estadístico *t crítico* 3,18

Fuente propia. Gráfico realizado con Excel del sistema operativo Microsoft Windows 7 con datos obtenidos del Software UV Professional 2 Analisis del espectrofotómetro Bell Photonics UV-M5

El producto comercial Argireline® contiene 0,05 % de Acetil Hexapéptido – 8, el cual presenta una concentración como solución referente de $5,62 \times 10^{-4}$ M según la ecuación:

$$C_{\text{standar}} = \frac{\frac{\text{masa de Acetil Hexapéptido – 8 en Argireline®}}{PM \text{ del Acetil Hexapéptido – 8}}}{Volumen \text{ del Argireline (L)}}$$

Presentando un valor de masa teórica de $3,72 \times 10^{-6}$ g de Acetil Hexapéptido – 8 en 100 mL de producto comercial.

Los cálculos realizados con el método de adición estándar según el método numérico, entrego como resultado un valor de masa de 26,71 g Dado que:

$$A = A_{\text{muestra}} + A_{\text{estandar}}$$

Entonces:

$$A = \epsilon b \frac{n \text{ analito de la muestra}}{VT (L)} + \epsilon b \frac{C_{\text{estandar}} \times V_{\text{estandar}}}{VT (L)}$$

Que corresponde a la forma:

$$y = b + mx$$

Siendo:

$$b = k \frac{n \text{ analito de la muestra}}{VT (L)}$$

$$m = k \frac{C_{\text{estandar}}}{VT (L)}$$

Entonces:

$$\frac{b}{m} = \frac{k \frac{n \text{ analito de la muestra}}{VT (L)}}{k \frac{C_{\text{estandar}}}{VT (L)}}$$

$$\frac{b}{m} = \frac{n \text{ analito de la muestra}}{C_{\text{estandar}}}$$

$$C \text{ standar } x - \frac{b}{m} = n \text{ alito de la muestra}$$

$$C \text{ standar } x - \frac{b}{m} = \frac{\text{masa (g) analito en lamuestra}}{\text{Peso molecular analito}}$$

Finalmente

$$\text{masa (g)} = -\frac{b}{m} x C \text{ standar } x \text{ Peso molecular analito}$$

Fuente formulas: Douglas A. Skoog, F. James Holler, Stanley R. Crouch. Principios de Análisis instrumental. Sexta edición. Cengage Learning. 2008.

Discusión

7. DISCUSIÓN

El pH es un parámetro importante en la evaluación de la calidad de un producto cosmético, debido a las posibles reacciones adversas generadas en la piel por la desviación de este parámetro (24). El pH de un producto puede afectar su compatibilidad con la piel y la estabilidad de la formulación, el valor de pH incorrecto puede provocar cambios en la viscosidad, la textura o la apariencia del producto. Además, ciertos ingredientes pueden descomponerse o reaccionar de manera no deseada a pH extremos, lo que puede afectar negativamente la calidad del producto. Debido a esto es importante mantener un pH adecuado que pueda contribuir a la eficacia y seguridad del producto terminado (25).

El pH de 5,44 obtenido en la formulación de la crema anti-edad representa un punto de partida idóneo para evaluar la integridad química del activo cosmético Acetil Hexapéptido-8. Este pH es cercano al pH natural de la piel humana, que normalmente se encuentra alrededor de 5.5. La razón de esta idoneidad radica en que un pH similar al de la piel puede promover una mejor penetración y absorción del activo cosmético, ya que la piel está más receptiva a sustancias que se encuentran dentro de su rango de pH fisiológico. Además, mantener un pH cercano al de la piel puede ayudar a preservar la barrera ácida natural de la piel, lo que a su vez contribuye a su integridad y salud. Por lo tanto, el pH de 5,44 proporciona un entorno favorable para la estabilidad y eficacia del Acetil Hexapéptido-8 en la crema anti-edad. (24,26).

Para establecer que el cosmético a analizar cumple con las características físicas adecuadas para el propósito que fue diseñado, se centrifugó en las condiciones descritas en Sección 1.2 observándose homogeneidad en las fases constitutivas de la formulación. Posteriormente se inició la evaluación de el o los solventes idóneos para la extracción del activo cosmético desde la emulsión matriz, tomando en cuenta que esta función no debe interferir con la medición espectrofotométrica del analito

(28- 29), razón por la cual se realizaron barridos fotométricos de los solventes que permitieron una mejor solubilización de la forma cosmética.

Este procedimiento se llevó a cabo con el propósito de confirmar que los solventes no presentasen bandas de absorción coincidentes con la longitud de máxima absorción (λ_{\max}) del activo cosmético Acetil Hexapéptido – 8, cuyo rango establecido en la literatura se encuentra desde 214 hasta 225 nm de longitud de onda (30, 31). De acuerdo con los resultados obtenidos que se presentan en los Gráficos n° 1,2,3,4, el solvente idóneo para la cuantificación del activo cosmético fue el agua, los demás presentan bandas de absorción que superan las 0,5 unidades de absorbancia en el intervalo de longitudes de onda de interés.

Al evaluar el espectro de absorción de una solución de referencia del Acetil Hexapéptido – 8 utilizando el agua como solvente no se encontraron bandas de absorción en el rango de longitudes de onda seleccionado tal y como se muestra en el Gráfico n° 9, razón que condujo a la posibilidad de generar un corrimiento batocrómico a través de la modificación del pH de la solución utilizada, para ello se seleccionó como medio acuoso disolvente una solución de Hidróxido de Sodio (NaOH) 0,1 M. Los resultados se graficaron en un barrido espectrofotométrico donde se evidenció una banda con un máximo de absorción en 198 nm, reflejado en el Grafico n° 10, motivo por el que se decide elaborar una curva de calibración útil para la cuantificación del activo cosméticos con soluciones de referencia con el producto Argireline® que emplearon como medio la solución alcalina.

La curva de calibración elaborada utilizando como solvente el NaOH 0,1 M se muestra en el Gráfico n° 12 y presenta un comportamiento lineal errático con un coeficiente de determinación menor a 0,990, este resultado se interpreta como la posibilidad de que el analito se encontrarse fuera del rango de linealidad del método espectrofotométrico.

La validación estadística de la pendiente (m) en el modelo lineal se lleva a cabo mediante la evaluación del valor del t de Student. Al comparar los resultados del t calculado con los valores de t crítico, se toma una decisión con respecto a la hipótesis nula (H_0) que postula que la pendiente es igual a cero.

En virtud de los resultados obtenidos, el t calculado se revela significativamente menor que el valor crítico de t de la tabla, lo que conduce a la aceptación de (H_0), por lo tanto, no hay una correlación lineal con la probabilidad calculada, respaldado con el valor de p valúe menor a 0,05. Por esta razón se realiza una segunda curva de calibración con concentraciones menores del analito, resultando los valores que se muestran en el Gráfico n° 14, con un coeficiente de determinación que aún no corresponde a un valor de correlación lineal y con valores estadísticamente similares al grafico anterior, por lo que tampoco hay una correlación respecto a la linealidad adecuando para la cuantificación como se calcula en el mismo gráfico.

La ausencia de linealidad en las curvas anteriormente mencionadas pudiese atribuirse a la hidrólisis del péptido en sus aminoácidos constituyentes dada la concentración utilizada del álcali (32). Esta hidrólisis puede generar una variabilidad en la cantidad del péptido presente en la muestra, lo que dificulta la cuantificación precisa utilizando metodologías espectroscópicas. Esto abre la posibilidad de considerar métodos de cuantificación química alternativos, aunque estos no hayan sido previamente estipulados en la hipótesis del trabajo.

Otros factores que pueden afectar el análisis, el pH pudo influir en la velocidad de la reacción de hidrolisis, así como la estabilidad del péptido. Los solventes utilizados también podrían haber interactuado con el péptido y afectado su estructura o estabilidad. La temperatura del sistema podría haber afectado la cinética de la reacción de hidrólisis, así como la estabilidad de los reactivos y productos. (27).

Otra posibilidad en la evaluación de este resultado correspondería a la interferencia de uno o más ingredientes cosméticos empleados en la formulación de esta crema en la región del espectro electromagnético utilizada, razón por la que con los resultados mostrados en la Sección 6.5.1 y 6.5.2 con NaOH 0,1 M no se puede deducir cuál es el fenómeno que produce como resultado este comportamiento, habiéndose obtenido el corrimiento batocrómico deseado.

La evidente interferencia observada en los espectros, en la mayoría de los solventes probados condujo a la selección de mezclas de solventes reportadas en la literatura para el análisis de péptidos equivalentes a través de otras técnicas analíticas, en específico la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), evaluando entonces el comportamiento espectrofotométrico de la mezcla Acetato de Amonio 40 mM: Acetonitrilo (70:30) (16). El resultado obtenido se muestra en el Gráfico n° 4 y evidencia la escasa interferencia de bandas de absorción en la región de longitudes de onda donde se esperaría obtener el $\lambda_{\text{máx}}$ del Acetil Hexapéptido – 8 (29).

Una vez estudiados los efectos interferentes del solvente en el espectro ultravioleta, se consideró evaluar el efecto interferente de la matriz cosmética, debido a la posibilidad de solubilización tanto en agua como en la mezcla solvente Acetato de Amonio 40 mM: Acetonitrilo (70:30) de algunos ingredientes cosméticos tales como el alcohol cetílico, el ácido esteárico y la glicerina, los resultados mostrados en el Grafico n° 8, confirma esta aserveración, debido a la aparición de bandas anchas de amplia absorbancia en la región espectrofotométrica de interés (210-230 nm), lo que lleva a tomar decisiones basadas en la eliminación de la interferencia de la matriz con métodos instrumentales y no con métodos de separación físicos y químicos

Se plantea la necesidad de explorar métodos instrumentales alternativos que permitan una separación efectiva de las interferencias presentes en la matriz del analito. Entre las posibles estrategias a considerar se encuentran técnicas de cromatografía, como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o la

cromatografía de gases (GC) para separar eficazmente las interferencias en la matriz del analito (16). Estos métodos, especialmente cuando se combinan con detectores selectivos como la espectroscopía de masas (MS), pueden proporcionar una solución eficiente para identificar y cuantificar con precisión el activo cosmético, superando así, las limitaciones asociadas con las interferencias de la matriz.

Debido a la presencia de interferentes en la matriz cosmética, se tomó la decisión de utilizar el método de adición de estándar con el fin de realizar el análisis sin separar el activo cosmético de su matriz, para ello se prepararon soluciones adicionando cantidades conocidas de la solución de referencia en las proporciones descritas en la Sección 6.6 y una cantidad fija del producto cosmético elaborado, el resultado muestra un comportamiento lineal que se evidencia con un coeficiente de determinación (cuadrado del coeficiente de correlación de Pearson) de 0,9933 tal y como se muestra en el Gráfico n° 17. En consecuencia, los resultados obtenidos revelan que el valor t estadístico, es significativamente mayor que el valor de t de tabla. Este hallazgo indica que la pendiente del modelo lineal es diferente de cero. Al rechazar la hipótesis nula (H_0) y aceptar la hipótesis alterna (H_1), respaldada además por un valor de p menor a 0,05, se establece la significancia estadística del resultado y de la linealidad de la curva de calibración.

A pesar de lograr la linealidad con este método, el cálculo de la recuperación en la cuantificación del activo cosmético no coincide con las expectativas. Esto se evidencia por la presencia de un valor atípico que surge tras una marcada diferencia de hasta un orden de magnitud en las pendientes de ambos gráficos resultantes: el de la curva de calibración de la solución de referencia (Gráfico n° 16) y el de la curva de adición de estándar (Gráfico n° 17). Estos hallazgos indican claramente la existencia de una interferencia causada por la matriz acompañante de nuestro analito.

Las interferencias en la cuantificación de un analito mediante espectrofotometría UV – VIS pueden inducir errores significativos en los resultados, la identificación de estas interferencias, originadas mayormente por la matriz, puede deberse a diversos factores (27).

En los resultados presentados, una posible causa de estos errores se atribuye a la presencia de grupos cromóforos en algunos componentes de la matriz cosmética, tales como la manteca de karité, aceite de almendras, BHT, vitamina E, estos componentes pueden tener propiedades de absorción que superponen o coinciden con las longitudes de onda utilizadas para medir el activo cosmético conduciendo a la dificultad en la obtención de resultados fiables.

La presencia de partículas en la matriz puede dispersar la luz incidente, afectando en su trayectoria a través de la muestra, además, cuando se prepara la solución de referencia con un solvente predeterminado, como se describe en la Sección 6.3, la solución puede adquirir un color inherente y volverse poco translúcida. La opacidad de la solución afecta la capacidad de la luz en atravesar la muestra, alterando las absorbancias medidas. Estos factores pueden dar lugar a mediciones inexactas y a una sobreestimación de la concentración del analito.

Para abordar una mejor proyección en la cuantificación de este activo cosmético, se debe estudiar la estructura química y las propiedades físicas de cada componente incluido en la formulación de la crema, y así descartar que estos no interfieran en la absorción del analito por espectrofotometría.

Se deben utilizar solventes selectivos para el analito de interés, que minimicen la solubilidad de los componentes de la matriz, lo cual mejora la separación del analito desde la matriz, sabiendo que las técnicas de elección ante tales dificultades son la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y/o la cromatografía gaseosa (GC), para separar el analito de la matriz permitiendo mediciones más específicas y exactas.

Conclusiones

8. CONCLUSIONES

En este trabajo de seminario de título, se logró caracterizar de acuerdo a las siguientes propiedades fisicoquímicas (pH y características organolépticas) de un cosmético de uso tópico con Acetil Hexapéptido – 8 como ingrediente activo anti-edad. Se evaluaron los parámetros analíticos necesarios para la cuantificación de Acetil Hexapéptido – 8 a través de la técnica de espectrofotometría UV-Vis,

Este trabajo experimental permitió reportar los posibles interferentes para la implementación definitiva de una metodología analítica confiable a través de esta técnica.

Durante el desarrollo de la metodología analítica se evaluó la respuesta espectrofotométrica de los ingredientes constituyentes de la forma cosmética, concluyendo que la naturaleza química del solvente utilizado para las mediciones es relevante en la integridad química del analito, considerando la posible hidrólisis de este en condiciones alcalinas.

De acuerdo con los resultados obtenidos con el método de adición de estándar desarrollado, la crema cosmética analizada presenta una matriz interferente que contiene a uno o más ingredientes con los mismos patrones de solubilidad que el activo cosmético.

Se postula entonces que el Acetil Hexapéptido – 8 contenido en una crema cosmética anti-edad podría ser cuantificable a través de la técnica de espectrofotometría UV – Vis utilizando una metodología de derivación química, para generar la transformación del analito a una especie cuyos grupos cromóforos presenten una longitud de onda de máxima de absorción no coincidente con la de aquellos ingredientes que evidenciaron interferencias fotométricas.

Los resultados obtenidos en este trabajo aportan una evidencia cualitativa en la evaluación consistente de la selectividad y de la especificidad de futuros desarrollos metodológicos para esta forma cosmética.

Es importante mencionar que en estos desarrollos, existen limitaciones en el método analítico, debido a las interferencias fotométricas de algunas especies involucradas.

Con esta investigación se confirma que es crucial la labor del Químico farmacéutico para asegurar y garantizar la calidad del análisis cuantitativo de activos cosméticos en la industria farmacéutica y cosmética.

Referencias Bibliográficas

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Codina A. Preparados anti-edad. Offarm [Internet]. 2005 [citado 2023 Mar 31]. Volumen 24 (7) pág.: 60-66. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-preparados-antiedad-13078223>
2. Castaño Amores Celia, Hernández Benavides Pablo José. Activos antioxidantes en la formulación de productos cosméticos antienvjecimiento. Ars Pharm [Internet]. 2018 jun [citado 2023 Mar 31]. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.30827/ars.v59i2.7518>
3. Ministerio de Salud Pública. Decreto 725. Código Sanitario. 1968. [citado 2023 Abr 01].
4. Draelos Z.D. The Art and Science of New Advances in Cosmeceuticals. ClinicalKey [Internet]. 2011. [Citado 2023 Abr 01]. Volumen 38 (3) pág.: 397-407 Disponible en: <https://doi:10.1016/j.cps.2011.02.002>
5. Ramos Silva M, Celem LR, Ramos Silva S, Fucci-da-Costa AP. Anti-aging cosmetics: facts and controversias. Clinics in Dermatology [Internet]. 2013. [citado 2023 Abr 03]. Volumen 31 (6) pag: 750–758 Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2013.05.013>
6. Husein El Hadmed H, Castillo RF. Cosmeceuticals: peptides, proteins, and growth factors. J Cosmet Dermatol. [Internet]. 2016. [citado 2023 Abr 04]. Volumen 15 (4) pág.: 514-519. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/jocd.12229>
7. Calderon Sierra A. Desarrollo histórico y perspectivas de la síntesis de péptidos en fase sólida. [Tesis de pregrado]. Bogotá D.C, Colombia. 2017. Recuperado a partir de: <https://repository.udistrital.edu.co/bitstream/handle/11349/5616/SierraCalder%C3%B3nAnderson2017.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
8. Gorouhi, F., Maibach, H. Role of topical peptides in preventing or treating aged skin. International Journal of Cosmetic Science. [Internet]. 2009. [citado 2023 Abr 03]. Volumen 31 (5) pág.: 327–345. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2009.00490.x>
9. Silke K., Schagen. Topical Peptide Treatments with Effective Anti-Aging Results. Cosmetics [Internet]. 2017. [citado 2023 Abr 03]. Volumen 4, 16. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/cosmetics4020016>
10. Chair, Wilma F. Bergfeld, M.D., F.A.C.P.; Donald V. Belsito, M.D.; Curtis D. Klaassen, Ph.D.; Daniel C. Liebler, Ph.D.; James G. Marks, Jr., M.D.; Lisa A. Peterson, Ph.D.; Ronald C. Shank, Ph.D.; Thomas J. Slaga, Ph.D.; and Paul W. Snyder, D.V.M., Ph. Safety Assessment of Acetyl Hexapeptide-8 and Acetyl Hexapeptide-8 Amide as Used in Cosmetics. Cosmetics Ingredient Review. [Internet]. 2020. [citado 2023 Jun 18]. Disponible en: <https://www.cir-safety.org/sites/default/files/AcetylHexapeptide-8.pdf>.

11. Ministerio de Salud. Decreto Supremo 239/02. Reglamento del Sistema Nacional de Control de Cosméticos. 2003. [citado 2023 Abr 03]. Disponible en: <https://www.bcn.cl/leychile/navegar?idNorma=211455>
12. Guía Técnica de Buenas Prácticas de Manufactura (GMP) para la Industria de Productos cosméticos. Instituto de Salud Pública de Chile. [Internet]. [citado 2023 Abr 04]. Disponible en: https://www.ispch.cl/sites/default/files/u24/Guia_tecnica_GMP_Cosmetico.pdf
13. Ministerio de Salud; Instituto de Salud Pública. Resolución 6444 Exenta. Determina como Especificaciones de producto terminado para Productos Cosméticos las especificaciones técnicas mínimas que indica. [Internet]. 2005. [Citado 2023 Abr 04]. Disponible en: <https://www.bcn.cl/leychile/navegar?idNorma=241261>
14. Parlamento Europeo y del Consejo de la Unión Europea. Reglamento (CE) N° 1223/2009 sobre Productos cosméticos. Diario Oficial de la Unión Europea. [Internet]. 2009. [Citado 2023 Jul 19]. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:342:0059:0209:es:PDF>
15. Pérez Miro J. Desarrollo y aplicación de métodos para el control de calidad de principios activos en cosmética y parafarmacia. [Tesis de pregrado]. España: Universidad Politécnica de Valencia: 2015. Recuperado a partir de: <https://m.riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/54998/Mir%C3%B3-Desarrollo%20y%20aplicaci%C3%B3n%20de%20m%C3%A9todos%20para%20el%20control%20de%20calidad%20de%20principios%20activos%20en%20cos....pdf?sequence=1&isAllowed=y>
16. Raikou, V., Kalogria, E., Varvaresou, A., Tsirivas, E., Panderi, I. "Quantitation of Acetyl Hexapeptide-8 in Cosmetics by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Coupled to Photo Diode Array Detection. Separations [Internet]. 2021. [Citado 2023 Jul 20]. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/separations8080125>
17. Saldaña. I. M. Interference in the determination of 24 biochemical constituents in the ADVIA 1800 autoanalyzer caused by in vitro addition of commercial emulsion used in parenteral nutrition to a sera pool. An Fac med. [Internet]. 2016. 77(2). Pag. 147-52 [Citado 2023 Jul 20]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.15381/anales.v77i2.11820>
18. Douglas A. Skoog, Donald M. West, F. James Holler y Stanley R. Crouch. "Fundamentos de Química Analítica". Novena edición. Cengage Learning. 2015. [Citado 2023 Ago 01]. Pág.: 650 – 654 / 669 – 672 / 723-725
19. Douglas A. Skoog, F. James Holler, Stanley R. Crouch. Principios de Análisis instrumental. Sexta edición. Cengage Learning. 2008. [Citado 2023 Ago 10]. Pág.: 298- 299 / 326-329 / 330-332

20. C. Avendaño Lopez. "Introducción a la química farmacéutica". Segunda edición. Mc Graw Hill. 2001. [Citado 2023 Ago 14]. Pag. 128 – 130 /865 – 872.
21. Gary D. C. Química Analítica. Sexta Edición. Mc Graw Hill. 2009. [Citado 2023 Ago 22]. Pag. 483 – 495.
22. Douglas A. Skoog, Donald Weste, F. James Holler, Stanley R. Crouch. Química Analítica. Séptima edición. Mc Graw Hill. 2000. [Citado 2023 Sep 29]. Pag. 608 – 620
23. Roberts, John D., y Marjorie C. Caserio. Basic Principles of Organic Chemistry, Segunda edición. Menlo Park, CA: W. A. Benjamin, Inc. 1977. [Citado 2023 Oct 13].
24. . Leonardi GR, Gaspar LR, Campos PMBGM. Study of the variation in the pH of human skin exposed to the cosmetic formula, whether or not it contains vitamins A, E or ceramide, by non-invasive methodology. An Bras Dermatol [Internet]. 2002. [Citado 2023 Nov 18].;77(5):563–9. Disponible en: <https://doi.org/10.1590/S0365-05962002000500006>
25. K. P. Ananthapadmanabhan. The Importance of pH in Cosmetic Formulation. J Cosmet Sci. 2015. DOI: 10.1111/j.1467-2494.2012.00711.x
26. Mujica V., Delgado M., Ramirez M., Velasquez I., Perez C., Rodreiguez C. M. Formulación de un producto cosmético con propiedades antiarrugas a partir del aceite de semilla de merey (Anacardium Occidentale L). Rev. Fac. Ing. UCV. [Internet]. 2010. [Citado 2023 Nov 20]. vol.25, n.2, pág. 119 -131. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-40652010000200013&lng=es&tlng=es.
27. S. K. Yorston, J. G. Heng. "The Importance of pH and Solvent in Peptide Hydrolysis." J Pharm Sci. 2001. DOI: 10.1021/js0010a004.
28. Celeiro, M., Guerra E., Lamas, J.P., Lores, M., Garcia-Jares, C., Llombart, M. Development of a multianalyte method based on micro-matrix-solid-phase dispersion for the analysis of fragrance allergens and preservatives in personal care products, J. Chromatogr. [Internet]. 2014. [Citado 2023 Nov 20]. Vol 1344. pág. 1 -14. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.03.070>
29. A.R Maurí, M Llobat, D Adriá. Detection and correction of interferences in spectroscopy techniques. Analytica Chimica Acta. [Internet]. 2001. [Citado

- 2023 Nov 20]. Vol. 426, pág. 135-146. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)01166-1](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)01166-1).
30. Celeiro, M., Guerra E., Lamas, J.P., Lores, M., Garcia-Jares, C., M. New Advances in the Analysis of Cosmetics Using Chromatographic Techniques. *Scientia Chromatographica*. [Internet]. 2016. [Citado 2023 Nov 20]. Vol. 8(3). pág. 171 - 179 Disponible en: <https://doi.org/10.4322/sc.2016.030>
31. Chen, D., Hu, B., Shao, X. et al. Removal of major interference sources in aqueous near-infrared spectroscopy techniques. *Anal Bioanal Chem*. [Internet]. 2004. [Citado 2023 Nov 20]. Vol. 379, pág. 143- 148. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00216-004-2569-2>.
32. Giannakou, M.; Varvaresou, A.; Kiriazopoulos, E.; Papageorgiou, S.; Kavvalou, E.; Tsirivas, E.; Panderi, I. Quantification of oligopeptide-20 and oligopeptide-24 in cosmetic creams using hydrophilic interaction liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry. *Sci. Plus*. [Internet]. 2018. [Citado 2023 Nov 20]. Vol. 1, pág. 159 - 167. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/sscp.201800016>
33. Papagianni, P.; Varvaresou, A.; Papageorgiou, S.; Panderi, I. Development and validation of an ion-pair RP-HPLC method for the determination of oligopeptide-20 in cosmeceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2011. [Citado 2023 Nov 20]. Vol. 56: (3), pág. 645 - 649. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.07.001>
34. Quinteros, J. Zapata E. J. Optimización de la Extracción del Colágeno Soluble en Ácido de Subproductos de Tilapia Roja (*Oreochromis spp*) mediante un Diseño de Superficie de Respuesta. *Información tecnológica*. 2017. [Citado 2023 Nov 27]. Vol. 28: (1), pág. 109 - 120. Disponible en: <https://doi.org/10.4067/S0718-07642017000100011>

ANEXO

1. Evaluación estadística del valor de t – Student como indicador de la Linealidad

Se calcula un valor de t con $n-2$ grados de libertad y se compara con el valor tabulado de t para el nivel de confianza requerido ($\alpha = 0.05$), dos-colas, en este caso para un “ n ” que depende de los niveles de calibración.

El valor de t crítico para 3 grados de libertad, con un $\alpha = 0,05$ y 2 colas es:

2 colas $\alpha/2$	80% 0.10	90% 0.05	95% 0.025
1	3.078	6.314	12.706
2	1.886	2.920	4.303
3	1.638	2.353	3.182
4	1.533	2.132	2.776

t crítico: 3,18

Referencia tomada de: Guía Técnica n° 1 de Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: Aspectos generales sobre la validación de métodos. Instituto de Salud Pública 2010. [Citado 2023 Dic 05]. Disponible en:
https://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2010/12/Guia%20T%C3%A9cnica%201%20validaci%C3%B3n%20de%20M%C3%A9todos%20y%20determinaci%C3%B3n%20de%20la%20incertidumbre%20de%20la%20medici%C3%B3n%20Aspectos%20generales%20sobre%20la%20validaci%C3%B3n%20de%20m%C3%A9todos.pdf

2. Análisis de varianza de PRIMERA curva de calibración

ANÁLISIS DE VARIANZA

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	0,003398664	0,003398664	2,466188907	0,191409672
Residuos	3	0,005512416	0,001378104		
Total	4	0,00891108			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>
Intercepción	0,09550137	0,031631332	3,019201643	0,039193983	0,007678713	0,183324027
PENDIENTE	0,074745205	0,047595969	-1,570410426	0,191409672	-0,2068928	0,057402389

3. Análisis de varianza de SEGUNDA curva de calibración

ANÁLISIS DE VARIANZA

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	0,11250511	0,11250511	4,84365774	0,09256686
Residuos	3	0,09290921	0,0232273		
Total	4	0,20541432			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>
Intercepción	0,41404193	0,09399483	4,40494343	0,01164631	0,15307043	0,67501343
PENDIENTE	0,83815173	0,38083418	2,20083115	0,09256686	-0,21921347	1,89551694

4. Análisis de varianza de TERCERA curva de calibración

ANÁLISIS DE VARIANZA

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	0,21804819	0,21804819	378,651093	0,00029648
Residuos	4	0,00172757	0,00057586		
Total	5	0,21977576			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>
Intercepción	0,03949249	0,02758593	1,43161714	0,24765493	0,04829826	0,12728325
PENDIENTE	6,88729116	0,35393934	19,4589592	0,00029648	5,76089822	8,0136841

5. Análisis de varianza de Método de adición de estándar

ANÁLISIS DE VARIANZA

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	0,006679	0,006679	414,6679	0,000259
Residuos	4	4,83E-05	1,61E-05		
Total	5	0,006728			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>
Intercepción	1,307731	0,007818	167,2721	4,71E-07	1,282851
PENDIENTE	0,055458	0,002723	20,3634	0,000259	0,046791