



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

**Análisis de la actividad antiinflamatoria de tres
formulaciones de uso tópico elaboradas a partir de
extractos de la especie *Galphimia glauca* Cav.
(Malpighiaceae).**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRA EN INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO
DE PLANTAS MEDICINALES**

PRESENTA:

BIOL. ITZEL ROMÁN SÁNCHEZ

DIRECTORA DE TESIS

MARÍA LUISA TERESA VILLAREAL ORTEGA

CUERNAVACA, MORELOS

ENERO 2020

Pon todo lo que hagas en manos del SEÑOR, y tus planes tendrán éxito.

Prov. 16:3 NTV

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB) y la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) por abrirme sus puertas en el programa de Maestría en Investigación y Desarrollo de Plantas Medicinales.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-México) por la beca otorgada durante la maestría.

Este trabajo de tesis es un esfuerzo, en el cual directa o indirectamente, participaron distintas personas, con su paciencia, correcciones, ánimo, provisión y acompañamiento, a algunas de estas personas quiero agradecer en este apartado.

A mi directora de tesis la Dra. María Luisa Teresa Villareal Ortega, por recibirme como parte de su equipo de laboratorio y brindarme las herramientas necesarias para poder trabajar en conjunto.

Al coordinador de este programa de maestría el Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa, por brindarme su conocimiento como profesor, su apoyo como coordinador y su empatía como persona. Gracias por siempre estar al pendiente de mi avance y el de mis compañeros.

Al Dr. Sergio Alcalá Alcalá, por instruirme y permitirme hacer uso del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia UAEM para realizar las formulaciones mencionadas en este trabajo de tesis.

A los demás miembros del jurado por su disposición y tiempo de tutoriales, correcciones de tesis y examen de grado, a la Dra. Verónica Rodríguez López y a la Dra. Anabel Ortiz Caltempa.

Al Dr. Pablo Noé Núñez Aragón, por el apoyo brindado para los ensayos de actividad antiinflamatoria en el Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Medicina, UAEM.

A mis compañeros de Laboratorio de Biotecnología de Plantas medicinales, por hacer cada día de trabajo más ameno.

A mis compañeros de la MIDPM, en especial a la Dra. Gloria Domínguez Patiño que hoy desde el cielo se titula junto con nosotros. Todos logramos formar una bella amistad que espero que nunca termine.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Primeramente, a Dios, que me ha dado la fortaleza, la sabiduría y la capacidad de poder culminar satisfactoriamente una meta más.

A mi esposo Ing. Rashad Isaac Mondragón Álvarez, por haber llegado a mi vida durante esta maestría y siempre brindarme tu amor, apoyo y paciencia cuando más lo necesito.

A mi hija Raquel Fernanda Mondragón Román, aunque aún no naces te has convertido en mi mayor inspiración.

A mis padres Segismundo Román Segura y Rosa Sánchez Fernández, gracias por darme siempre la confianza de poder lograr lo que me proponga y ser mi fuente de apoyo constante durante toda la vida.

A mis hermanos, Ing. Diana, Fernando, Gerardo e Ivonne Roman Sánchez. Compartir parte de mi vida con ustedes es lo mejor que me pudo haber pasado, gracias por siempre estar cerca.

A mi segunda familia Mondragón Álvarez porque con cariño desmedido me han brindado su apoyo y me han hecho parte de ustedes.

A mi gato Mendel, mi fiel amigo y compañero.

CONTENIDO

1. RESUMEN.....	8
2. INTRODUCCIÓN	9
3. MARCO TEÓRICO	10
3.1. Plantas medicinales	10
3.1.1. Descripción y antecedentes de la planta <i>Galphimia glauca</i>	11
3.1.2. Remedio herbolario	17
3.2. Inflamación	18
3.2.1. Proceso inflamatorio	19
3.3. Interacción vehículo-piel.....	25
3.4.Vía de administración topica	26
3.4.1.Formulados usados vía tópica.....	27
3.5. Microemulsiones	28
3.5.1. Estructura y técnicas de caracterización de las microemulsiones	30
3.5.2. Microemulsión base gel.....	31
3.5.3. Diseño de formulación de microemulsión base gel.....	32
3.6. Geles.....	34
3.7. Aerosoles	36
3.8. Antiinflamatorios tópicos naturales en el mercado actual	38
3.9. Investigación de mercado.....	41
4. JUSTIFICACIÓN.....	46
5. HIPÓTESIS.....	46
6. OBJETIVO GENERAL	47
7. OBJETIVOS PARTICUALRES	47
8. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	48
9. MATERIALES Y MÉTODOS	49
9.1. Material vegetal	49
9.2. Extracto etanólico partiendo de hojas de la especie <i>G. glauca</i>	49
9.3. Análisis de compuestos de <i>G. glauca</i> por Cromatografía Gases-Masas.....	50

9.4. Ensayo de actividad antiinflamatoria <i>in vivo</i> usando una suspensión líquida a partir de extractos de <i>G. glauca</i>	50
9.5. Formulación de microemulsión base gel.....	50
9.5.1. Ensayos de solubilidad del extracto.....	51
9.5.2. Diagrama de fase ternario.....	51
9.6. Elaboración de microemulsión base gel y microemulsión base gel con extracto de <i>G. glauca</i>	51
9.6.1. Ensayo de viscosidad	52
9.6.2. Medición del tamaño de gota	52
9.7. Ensayo de actividad antiinflamatoria <i>in vivo</i> utilizando la microemulsión base gel con extractos de <i>G. glauca</i>	52
9.8. Elaboración de gel hidroalcohólico puro y gel hidroalcohólico con extracto de <i>G. glauca</i>	51
9.9. Ensayo de actividad antiinflamatoria <i>in vivo</i> utilizando el gel hidroalcohólico con extractos de <i>G. glauca</i>	52
10. RESULTADOS	54
10.1. Espectro de CG-Masas del extracto etanólico de hojas de <i>G. glauca</i>	53
10.2. Resultados del ensayo de actividad antiinflamatoria <i>in vivo</i> utilizando una suspensión líquida etanólica con extractos de <i>G. glauca</i>	56
10.3. Elaboración de microemulsión base gel con actividad antiinflamatoria.....	55
10.3.1. Ensayo de solubilidad del extracto de hojas de <i>G. glauca</i>	55
10.3.2. Diagrama de fase ternario para la elaboración de la microemulsión base gel	58
10.3.3. Viscosidad de la microemulsión base gel.....	58
10.3.4. Tamaño de gota	59
10.4. Actividad antiinflamatoria <i>in vivo</i> utilizando la microemulsión base gel con extractos de <i>G. glauca</i>	61
10.5. Actividad antiinflamatoria <i>in vivo</i> utilizando el gel hidroalcohólico con extractos de <i>G. glauca</i>	63
10.6. Investigación de mercado de un aerosol con actividad antiinflamatoria elaborado a partir de extractos de <i>Galphimia glauca</i>	63
11. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN	74
12. PERSPECTIVAS	78
13. LITERATURA CITADA	78

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Imagen ilustrativa de plantas medicinales	6
Figura 2. <i>Galphimia glauca</i>	8
Tabla 1. Usos etnomédicos de <i>Galphimia glauca</i>	9
Tabla 2. Compuestos activos de <i>Galphimia glauca</i> y sus propiedades medicinales.....	10
Tabla 3. Estudios biotecnológicos de <i>Galphimia glauca</i>	11
Tabla 4. Estudios farmacológicos de <i>Galphimia glauca</i>	12
Figura 3. Esquema general del proceso inflamatorio	16
Figura 4. Estructura general de la piel humana	22
Figura 6. Clasificación de formulaciones farmacéuticas tópicas.....	26
Figura 7. Lectura de un diagrama pseudoternario.....	29
Figura 8. Entrecruzamiento en geles poliméricos	34
Figura 9. Elementos de un aerosol.....	36
Tabla 5. Ejemplos de geles y aerosoles con actividad antiinflamatoria y de origen natural en el mercado actual.....	38
Figura 10. Espectro de CG-Masas (A) y análisis de componentes (B, C y D) del extracto de <i>Galphimia glauca</i>	49
Figura 11. Efecto antiinflamatorio de una suspensión líquida etanólica adicionada con extracto de <i>Galphimia glauca</i>	50
Figura 12. Diagrama de fase ternario	52
Figura 13. Tamaño de gota de la microemulsión base gel	53
Figura 14. Tamaño de gota de la microemulsión base gel más extracto de <i>Galphimia glauca</i> al 15%	54
Figura 15. Efecto antiinflamatorio de una microemulsión base gel adicionada con extracto de <i>Galphimia glauca</i>	55
Figura 16. Efecto antiinflamatorio de una microemulsión base gel adicionada con indometacina	56
Figura 17. Efecto antiinflamatorio de un gel hidroalcohólico adicionado con extracto de <i>Galphimia glauca</i> al 15%	57
Tabla 6. Costos de materia prima y empaque por unidad.....	64
Figura 18. Acheflan.....	65

Figura 19. Physiorelax.....	65
Figura 20 Pregunta 1 y las respuestas correspondientes.....	66
Figura 21 Pregunta 2 y las respuestas correspondientes.	66
Figura 22 Pregunta 3 y las respuestas correspondientes	67
Figura 23 Pregunta 4 y las respuestas correspondientes.....	67
Figura 24 Pregunta 5 y las respuestas correspondientes	68
Figura 25 Pregunta 6 y las respuestas correspondientes.....	68
Figura 26 Pregunta 7 y las respuestas correspondientes.....	69
Figura 27 Pregunta 8 y las respuestas correspondientes.....	69
Figura 28 Pregunta 9 y las respuestas correspondientes.....	70

1. RESUMEN

Las plantas medicinales han formado parte de la vida del ser humano desde tiempos inmemoriales, sirviendo de remedio para diversos padecimientos. Hoy en día ese conocimiento sigue vigente gracias a proyectos de investigación como el que se muestra a continuación.

El proyecto involucra el conocimiento adquirido respecto a la planta medicinal *Galphimia glauca* a la cual se le atribuyen diversas propiedades etnómedicas, una de ellas, y de gran importancia es su actividad antiinflamatoria.

Utilizamos las hojas de *G. glauca*, las cuales fueron colectadas en el municipio de Tepoztlán Morelos, secadas y procesadas en el Laboratorio de Biotecnología de Plantas Medicinales CEIB-UAEM. El material liofilizado se utilizó para la creación de tres formulaciones de uso tópico las cuales se prepararon en el Laboratorio de Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia, UAEM. La determinación de la actividad antiinflamatoria de las formulaciones fue evaluada por un ensayo *in vivo*, donde se provoca la inducción de edema agudo en oreja de ratón con acetato de tetradecanoil-forbol (TPA, acrónimo en inglés) en el Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Medicina, UAEM.

En el análisis cromatográfico gases-masas se identificaron derivados del ácido palmítico y ácido α -linolénico (Omega -3) y Vitamina E, sustancias con actividad antiinflamatoria reportada (Seed *et al*, 2012; Tahan *et al*, 2011). Los resultados de las formulaciones de uso tópico fueron los siguientes: La microemulsión y el gel etanólico presentaron baja actividad antiinflamatoria entre el 20% y 30%, en cuanto a la suspensión líquida etanólica presentó una mejor actividad antiinflamatoria (50% al 60%) por ello se sugiere utilizarla en un sistema de aerosol para generar un producto eficaz y funcional.

Por último, se realizó una investigación de mercado que incluyó encuestas a 100 personas, para analizar la situación actual y la aceptación de dicho producto, en esta investigación se obtuvieron resultados satisfactorios los cuales se muestran en la sección de resultados de este escrito.

2. INTRODUCCIÓN

México es considerado un país megadiverso en el cual convergen una amplia variedad de especies de animales y plantas, cada una de estas con una función específica dentro de los diferentes ecosistemas que caracterizan al país.

En particular, la diversidad vegetal en México se estima en aproximadamente 220 familias, 2,410 géneros y 30,000 especies; dentro de las cuales aproximadamente 6,000 plantas son consideradas como medicinales (Osuna Torres *et al.*, 2005; Aguilar *et al.*, 2004).

El uso de las plantas medicinales es históricamente muy antiguo, han sido utilizadas como medicamentos crudos desde hace miles de años en forma de tinturas, tés, cataplasmas, polvos y formulaciones a base de hierbas (Samuelsson, 2004).

Actualmente, su uso e investigación se ha extendido hasta llegar a conocer los componentes activos de diversas especies de plantas de importancia cultural, social y económica., Estos componentes son los metabolitos secundarios los cuales son productos finales de las funciones celulares y sus niveles pueden ser observados como la respuesta de los sistemas biológicos a manipulaciones ambientales o genéticas (Fiehn, 2002).

En el caso particular de las plantas, como sistema biológico y por su naturaleza sésil, ellas han desarrollado múltiples estrategias de respuesta celular específica ejecutando cambios fisiológicos y químicos, ampliando así las posibilidades para realizar investigaciones basadas en el contenido metabólico lo que permite un mejor y más amplio conocimiento de sus funciones y posibles aplicaciones para aliviar padecimientos comunes y no tan comunes de la sociedad actual.

Una especie de gran importancia en la medicina tradicional mexicana es *Galphimia glauca*, la cual cuenta con diversas propiedades y se utiliza como sedante y antiinflamatoria (Gómez-Chong *et al.*, 1985; Ortiz, 1986) por lo que ha sido motivo de estudios científicos a diferentes niveles (fitoquímicos, farmacológicos, biotecnológicos). Los resultados de las investigaciones científicas son importantes y han propiciado la investigación aplicada de esta planta utilizando herramientas farmacéuticas y formulaciones tópicas. Parte de estas investigaciones, se presentan en este proyecto.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Plantas medicinales

Desde tiempos inmemorables, en cada región del mundo los primeros hombres han generado estrategias para prolongar su vida y mejorar la calidad de la misma, buscando recursos que les permitiesen disminuir el dolor físico y evitar la muerte (Avello y Cisternas, 2010). Una parte muy importante de estos recursos son las plantas medicinales con una variedad de usos para curar o disminuir miles de padecimientos.

Las plantas medicinales son consideradas un recurso vegetal muy valioso gracias a su complejo y particular metabolismo. Hoy en día contamos con un muy diverso conocimiento tradicional para su utilización, no solo en México, sino en todo el planeta.

De acuerdo con la OMS (1979) una planta medicinal es definida como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos compuestos activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos una imagen ilustrativa de plantas medicinales se observa en la figura 1.

Las plantas medicinales son la fuente de obtención de muchos agentes terapéuticos que el hombre ha utilizado para el cuidado de la salud. Se estima que más del 80% de los aproximadamente 30,000 productos naturales conocidos son de origen vegetal, y que éstos y sus derivados representan más del 50% de todos los medicamentos de uso clínico (Newman *et al.*, 2000).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que el 80% de los individuos que habitan los países del mundo en vías de desarrollo utilizan las plantas medicinales para tratar sus problemas de salud.



Figura 1. Imagen ilustrativa de plantas medicinales. Imagen de: <https://medicina.usmp.edu.pe/investigacion/centros-investigacion-fmh/medicina-tradicional.html>

3.1.1. Descripción y antecedentes de la planta *Galphimia glauca*

Una planta de importancia médica y tradicional en México para aliviar padecimientos relacionados a la inflamación es *Galphimia glauca* Cav., clasificada en el orden de los Polygalales de la familia Malpighiaceae (Sánchez, 1978). El género neotropical *Galphimia* Cav., contiene más de 26 diferentes especies de hierbas grandes y arbustos, creciendo en hábitats normalmente secos (Anderson, 2007), la mayoría de los cuales existen en México. Estas especies se distribuyen de manera silvestre en pastizales, matorrales y bosques; pero principalmente en áreas con vegetación perturbada. *Galphimia* Cav. se ha caracterizado por ser un arbusto silvestre que alcanza una altura de 1 a 3 metros, con abundantes ramas e inflorescencias dispersas, con hojas membranosas y flores en racimos densos (Estrada, 1985) (Fig.2).



Figura. 2. *Galphimia glauca*. Imágenes ilustrativas de la especie *Galphimia glauca* en época de floración. Fotos de: Cardoso-Taketa A. (2019)

La taxonomía del genero *Galphimia* Cav. presenta confusiones causadas en parte por la mala interpretación de nombres genéricos (*Galphimia* Cav. vs. *Thryallis* L.), y por la aplicación equivocada de diversos nombres adjudicados a las plantas. Por otro lado, la

similitud morfológica superficial de muchas de las especies y las florescencias vistosas que captan la atención de coleccionistas han provocado que todos los especímenes de México se etiqueten como *Galphimia glauca* o *Galphimia gracilis*; en tanto que especímenes suramericanos se clasifiquen como *Galphimia brasiliensis* (Anderson, 2007).

Independiente a la problemática causada por la identificación taxonómica, la especie *Galphimia glauca* durante muchos años ha sido popularmente empleada en la medicina tradicional para el tratamiento de diversos padecimientos. El conocimiento con el cual se cuenta hoy en día es muy antiguo y se ha conservado durante muchas generaciones, siendo que gracias a la experimentación se puede aplicar este conocimiento.

En varios estados de México, *Galphimia glauca* es conocida y empleada con sus nombres comunes. Algunos de los estados donde se utiliza y sus respectivos usos etnomédicos se muestran en la tabla 1., Cabe mencionar que la inflamación es el padecimiento en común a tratar en los estados descritos. Aunado a esto y tomando en cuenta los usos etnomédicos se han publicado diversas investigaciones de estudios fitoquímicos en los cuales se han aislado compuestos con propiedades curativas como antiasmático y antimalárico (Dorsch y Wagner, 1991; Dorsch *et al.*, 1992) También se ha comprobado su eficacia para curar alergias y reacciones bronquiales (Müller *et al.*, 1993; Dorsch *et al.*, 1992), (Tabla 2).

Tabla 1. Usos etnomédicos de *Galphimia glauca*. La presente tabla muestra algunos usos etnomédicos de *Galphimia glauca* relacionados al estado de la República Mexicana en donde se emplea, así como, nombres comunes y autores que han descrito esta evidencia.

Estado	Nombres populares	Usos populares	Referencias
Morelos	“árnica roja” “calderona amarilla”, “flor de muerto”, “ojo de gallina”, “hierba de cuervo”, “flor estrella”, “hierba de desprecio, cola de zorra	heridas , granos, para fortalecer la cintura, y para el relajamiento , rasgaduras del postparto e inflamaciones	Hernández , 1959; Martínez, 1969; Gomez-Chong <i>et al.</i> ,1985; Ortíz, 1986; Argueta <i>et al.</i> , 1994
Guerrero	“cospancololi”, “tespancololi”	antidiarreico, inflamaciones , antidisentérico, antipalúdico, para gastroenteritis y para fortalecer a las parturientas.	Hernández , 1959; Martínez, 1969; Argueta <i>et al.</i> , 1994
San Luis Potosí	“tsalaam kubi”	antidiarreico, inflamaciones , antidisentérico, antipalúdico, para gastroenteritis.	Martínez, 1969; Hernández , 1959; Argueta <i>et al.</i> , 1994
Michoacán	“ huachacata”, “nacachata”, “vacachata” y “flor de diciembre”	antidiarreico, inflamaciones , antidisentérico, antipalúdico, para gastroenteritis y para fortalecer a las parturientas.	Hernández , 1959; Martínez , 1969; Rzedowski y Equigua, 1987; Argueta <i>et al.</i> , 1994;
Jalisco	“ramo de oro”, cola de zorra	antidiarreico, inflamaciones , antidisentérico, antipalúdico, para gastroenteritis y para fortalecer a las parturientas.	Hernández , 1959; Martínez, 1969; Argueta, 1994

Tabla 2. Compuestos activos de *Galphimia glauca* y sus propiedades medicinales.

Compuestos activos	Propiedades medicinales	Autores
Acilflavonoides	Hiperactividad bronquial	Müller <i>et al.</i> , 1993
Polifenoles	Inhibidor hemólisis	Müller <i>et al.</i> , 1998
Derivados del ácido gálico	Alergias Obstrucción bronquial	Müller <i>et al.</i> , 1993
Ácido gálico, quercetina y metil galato	Alergias Reacciones bronquiales	Müller <i>et al.</i> , 1993 Dorsch <i>et al.</i> , 1992
Ácido elágico, ácido quínico y ácido tetragaloilquínico	Antiasmático Reacciones alérgicas	Neszmelyi <i>et al.</i> , 1993 Dorsch <i>et al.</i> , 1992.
Galfiminas C, D, y E,	Antimalárica	Camacho, 1997
Galfiminas A, B y E (GA, GB y GE)	Actividad ansiolítica Actividad antidepresiva	Tortoriello <i>et al.</i> , 2006 Cardoso-Taketa <i>et al.</i> , 2008

Los estudios biotecnológicos (Tabla 3) de *G. glauca* han permitido identificar diversos metabolitos secundarios con efectos farmacológicos; un ejemplo de ello es la identificación

de galfiminas B en cultivos de callos y células en suspensión de *G. glauca*. (Osuna *et al.*, 2002).

En otro estudio se describió una mezcla de nueve nor-secofriedelanos, denominados genéricamente como galfiminas (A- I), que fueron aislados del extracto con actividad sedante obtenido de partes aéreas de *G. glauca* (Cardoso-Taketa *et al.*, 2004). Más recientemente se identificaron especies de *G. glauca* recolectadas en México utilizando la técnica de códigos de barras de ADN y se determinó su actividad antiinflamatoria (Sharma *et al.*, 2012).

Tabla 3. Estudios biotecnológicos de *Galphimia glauca*.

Estudio	Autores
Producción de triterpeno galfimina B con actividad sedante en cultivos de tejido de <i>G. glauca</i>	Osuna <i>et al.</i> , 1999
Identificación de galfimina B en cultivos de callos y células en suspensión de <i>G. glauca</i> .	Osuna <i>et al.</i> , 2002
Transformación de <i>G. glauca</i> por <i>A. rhizogenes</i> para la producción de norfriedelanos	Náder <i>et al.</i> , 2004
Estudio del perfil metabólicomico de <i>G. glauca</i> demostró que ciertas poblaciones de esta especie en diferentes estados de la República contienen galfiminas.	Cardoso-Taketa <i>et al.</i> , 2008
Identificación de glaucetalina D, con importante actividad sedante.	Ortiz <i>et al.</i> , 2010
Identificación de poblaciones de <i>G. glauca</i> recolectadas en México utilizando la técnica de códigos de barras de ADN.	Sharma <i>et al.</i> , 2012

Algunos de los efectos farmacológicos de distintos metabolitos se encuentran representados en la tabla 4. Un ejemplo claro de estos estudios fue presentado por González- Cortázar en 2014, en esta investigación se identificaron los nor-seco-triterpenos galfimina A y galfimina E como responsables de la actividad antiinflamatoria.

Estudio	Autores
Análisis de efectos ansiolíticos y antidepresivos de un extracto metanólico de <i>G. glauca</i> (estandarizado) administrado por vía oral a ratones.	Herrera-Ruiz <i>et al.</i> , 2006
Evaluación farmacotóxica de extractos estandarizados de <i>Galphimia glauca</i> probados en ratones por 28 y 56 días.	Aguilar-Santamaria <i>et al.</i> , 2007
Identificación de nor-seco-triterpenos galfimina A y galfimina E como responsables de la actividad antiinflamatoria. Aislamiento y elucidación estructural de dos nuevos nor-seco-triterpenos denominados galfimina K y galfimina L, junto con diferentes alcanos, ácidos grasos y tres flavonoides de <i>Galphimia glauca</i> .	Gonzalez-Cortazar <i>et al.</i> , 2014

Tabla 4. Estudios farmacológicos de *Galphimia glauca*. La presente tabla muestra algunos antecedentes de estudios farmacológicos de *Galphimia glauca* y su respectivo autor.

Gracias a las investigaciones realizadas durante años en plantas medicinales como *G. glauca* es como se da paso a estudios preclínicos, clínicos y el desarrollo de nuevos productos naturales.

Las investigaciones mencionadas han permitido determinar que la especie *Galphimia glauca* constituye un recurso medicinal muy valioso por lo cual su estudio científico desde un enfoque multidisciplinario incluyendo estrategias de investigación, no solo químicas sino también farmacológicas han permitido confirmar su efectividad contra diversos padecimientos.

De manera particular este proyecto plantea hacer uso de ese conocimiento de forma aplicada y ser un compromiso creciente en cuanto a la investigación, la innovación y desarrollo de productos medicinales a base de plantas.

Los antecedentes de la actividad antiinflamatoria amplían un panorama favorable para la experimentación como primer paso en busca del mejor vehículo para la futura creación de un remedio herbolario en forma tópica

3.1.2. Remedio herbolario

Para el alivio de diversos padecimientos de la piel entre otros órganos, la medicina tradicional mexicana hace uso de remedios de tipo herbolario los cuales son altamente eficaces, pero pocos estandarizados y registrados.

El reglamento de insumos para la salud en su artículo 88 considera Remedio Herbolario al preparado de plantas medicinales, o sus partes, individuales o combinadas y sus derivados, presentado en forma farmacéutica, al cual se le atribuye por conocimiento popular o tradicional, el alivio para algunos síntomas participantes o aislados de una enfermedad. La industria farmacéutica internacional ha dado paso a una novedosa línea de productos, basada en extractos estandarizados de especies vegetales, respondiendo a la búsqueda de medicamentos naturales por parte de los consumidores, pero deben considerarse también pruebas de seguridad ya que se pretende que la persona pueda usarlo sin riesgo aparente. En muchos países existen formas de curación tradicionales o indígenas firmemente arraigadas en sus respectivas culturas e historias. Algunas formas de medicina tradicional, por ejemplo, ayurveda, medicina tradicional china y unani, que son populares en el ámbito nacional, se practican también en todo el mundo. Al mismo tiempo, se utilizan ampliamente algunas formas de medicina complementaria, a saber, medicina quiropráctica, homeopatía, naturopatía y osteopatía. En los sistemas de salud de todo el mundo, los niveles de enfermedades crónicas y los costos de atención sanitaria son cada vez más elevados. Tanto los pacientes como los dispensadores de atención de salud están exigiendo la revitalización de los servicios de salud y haciendo hincapié en la atención individualizada centrada en la persona (Sarsina, P. *et al.*, 2012). La creación de remedios herbolarios debidamente

registrados, estandarizados y eficaces potencializa el uso de las plantas medicinales en todo el mundo incentivando la economía de cada región, al ser un producto natural y accesible a cualquier nivel social, y, lo que es más importante, con una eficacia comprobada para aliviar enfermedades o padecimientos de salud.

3.2. Inflamación

Uno de los múltiples padecimientos que a lo largo de la historia se han tratado con plantas es la inflamación.

La inflamación es un proceso tisular constituido por una serie de fenómenos moleculares, celulares y vasculares, de finalidad defensiva frente a agresiones físicas, químicas o biológicas. (Roitt, *et al.*, 1992).

De manera muy general, una vez desencadenado el proceso inflamatorio aumenta el diámetro de los vasos sanguíneos (vasodilatación), que causa aumento del flujo sanguíneo, que a su vez es causa de rubor, calor y un incremento de la permeabilidad vascular, lo que ocasiona escape de líquido desde los vasos sanguíneos, y da como resultado la acumulación de líquido (edema). En pocas horas en la región inflamada se adhieren leucocitos a las células endoteliales y atraviesan la pared de los capilares para ingresar en los espacios tisulares, un proceso llamado extravasación (Roitt *et al.*, 2008).

La inflamación puede ser aguda o crónica. Es aguda cuando presenta un período de hinchazón, dolor e incapacidad crecientes, que luego disminuyen en poco tiempo.

Es crónica cuando se prolonga durante meses o años, presentando períodos de mayor o menor intensidad, de acuerdo con factores como la humedad, la dieta o el estado del propio sistema inmunitario.

La gravedad, la duración y las características peculiares de cada respuesta inflamatoria dependen del área afectada, de su estado previo y de la causa que la provoca, es decir, los agentes inflamatorios los cuales intervienen pueden ser los siguientes:

- Agentes vivos: bacterias, virus, parásitos, hongos.
- Agentes físicos: radiaciones, frío, calor, rayos ultravioletas.

- Agentes químicos: venenos, toxinas.
- Traumatismos y cuerpos extraños.
- Alteraciones vasculares que producen isquemia.
- Agentes tumorales.

3.2.1. Proceso inflamatorio

El proceso inflamatorio es una respuesta inespecífica frente a las agresiones del medio, y está generado por agentes inflamatorios, ocurre solo en tejidos conectivos vascularizados y surge con el fin defensivo de aislar y destruir al agente dañino, así como reparar el tejido u órgano dañado (Roitt *et al.*, 2008) (Fig. 3)

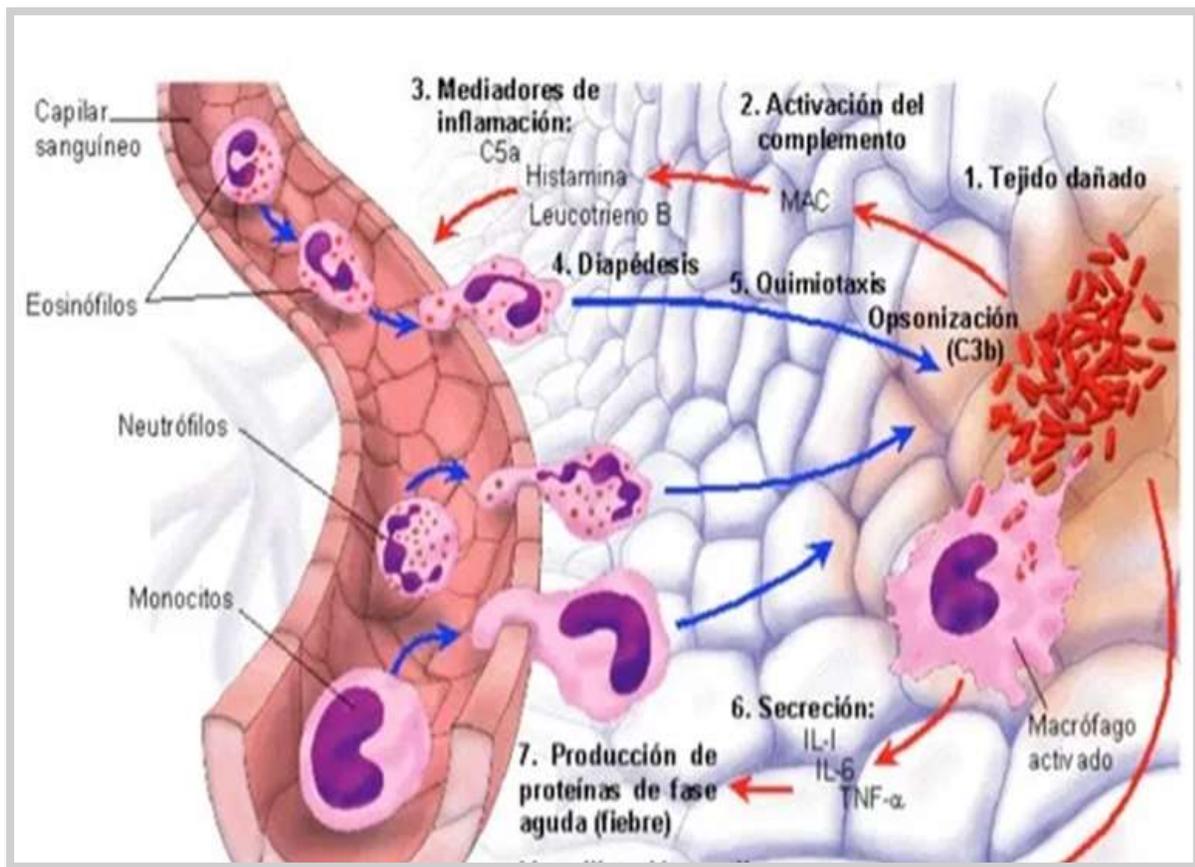


Figura 3. Esquema general del proceso inflamatorio. El proceso inflamatorio inicia cuando un tejido se ve dañado por algún agente interno o externo (1). Posteriormente se activa el sistema del complemento (2) y se liberan los mediadores de la inflamación (3) los cuales activan la diapédesis de glóbulos blancos (4). Posteriormente ocurre la quimiotaxis y opsonización celular (5) una vez que ocurre la fagocitosis se secretan citosinas (6) y se producen proteínas de fase aguda (7)

De forma esquemática podemos dividir el proceso inflamatorio en cinco etapas:

- 1.-Liberación de mediadores. Son moléculas, la mayor parte de ellas, de estructura elemental que son liberadas o sintetizadas por el mastocito bajo la actuación de determinados estímulos.
- 2.-Efecto de los mediadores. Una vez liberadas, estas moléculas producen alteraciones vasculares y efectos quimiotácticos que favorecen la llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio.
- 3.-Llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio, proceden en su mayor parte de la sangre, pero también de las zonas circundantes al foco.
- 4.-Regulación del proceso inflamatorio. Como la mayor parte de las respuestas inmunes, el fenómeno inflamatorio también integra una serie de mecanismos inhibidores tendentes a finalizar o equilibrar el proceso.
- 5.-Reparación. Fase constituida por fenómenos que van a determinar la reparación total o parcial de los tejidos dañados por el agente agresor o por la propia respuesta inflamatoria.

Liberación de mediadores.

Aunque todos los tejidos al lesionarse van a liberar mediadores de la inflamación, la fuente principal de los mismos es el mastocito. Esta es una célula inmune inespecífica que también procede de la médula ósea, aunque los mecanismos de su diferenciación no son bien conocidos. El mastocito contiene en el citoplasma gránulos con mediadores de la inflamación preformados. Cuando se activa, libera estos factores, junto con otros de carácter lipídico que son sintetizados de *novo*. El mastocito se detecta en casi todos los tejidos, siendo localizado principalmente alrededor de los pequeños vasos, sobre los que actuarán los mediadores una vez liberados (Roitt *et al.*, 2008).

La liberación de mediadores ocurre por distintas causas, pero quizás la más frecuente sea la lesión directa de la célula por el agente agresivo. Otro mecanismo de activación se desarrolla mediante la IgE que es captada en la membrana del mastocito, ya que éste

presenta receptores para la porción Fc de esta inmunoglobulina (FcεR). El antígeno activa al mastocito cuando conecta específicamente con dos IgE contiguas sobre la membrana (Koo CH., 1989). Los mecanismos bioquímicos que subyacen a este proceso no son aún bien conocidos. Parece que el proceso se inicia en la membrana con activación de adenilato-ciclase y de fosfolipasa A2. La adenilato-ciclase determina un incremento inicial de la concentración intracitoplasmática de cAMP, mientras que la fosfolipasa ataca a los lípidos de membrana produciendo ácido araquidónico (Martínez B., 1992). También aumenta la permeabilidad de membrana al Ca⁺⁺, con lo que se incrementa la concentración de este ion en el citoplasma (Martínez B., 1992). El aumento de la concentración de Ca⁺⁺ y el del cAMP determinan la formación de microtúbulos en el mastocito, así como el movimiento de gránulos citoplasmáticos hacia la membrana celular, produciéndose posteriormente la fusión de los gránulos con ésta y la liberación de mediadores al espacio extracelular. Estos mediadores, que se encontraban preformados en los gránulos, son principalmente histamina, enzimas proteolíticas, el factor quimiotáctico del eosinófilo, factor quimiotáctico del neutrófilo y heparina. El ácido araquidónico formado puede seguir dos vías metabólicas, la de la enzima ciclooxygenasa, que determina la producción de prostaglandinas (PG) y tromboxanos y la de la lipooxygenasa, que conduce a la formación de leucotrienos (LT) (Martínez B., 1992). Todas estas sustancias de carácter lipídico, sintetizadas de *novo* por el mastocito, son un segundo grupo importante de mediadores de la inflamación.

El basófilo es una célula preponderantemente sanguínea, acude a los tejidos durante el proceso inflamatorio y supone un refuerzo en la liberación de mediadores ya que se activa por los mismos mecanismos que el mastocito y libera mediadores equivalentes a los de esta célula (Roitt *et al.*, 2008).

Efectos de los mediadores

Mediadores preformados:

- Histamina. Es un mediador ampliamente distribuido por el organismo, aunque se detecta principalmente en el mastocito y basófilo. Actúa sobre los receptores H1 (histamina 1) de los vasos, produce vasodilatación e incremento de la

permeabilidad. Cuando la histamina actúa sobre receptores H₂ (histamina 2) produce efectos inhibidores o reguladores de la inflamación (Gallin JL., 1988; Gallin JL., 1989).

- Enzimas proteolíticas. De las distintas enzimas proteolíticas liberadas por el mastocito, quizás la más interesante sea la kininogenasa, que actúa sobre las proteínas procedentes de la sangre y denominadas kininógenos, produciendo su ruptura en péptidos más pequeños denominados kininas. Las kininas inducen vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular y estimulan las terminaciones nerviosas del dolor (Gallin JL., 1988).
- Factores quimiotácticos. El ECF-A (Factor quimiotáctico de eosinófilos) incluye dos tetrapéptidos de alrededor 500 Da. de peso molecular que atraen eosinófilos al foco inflamatorio, induciendo simultáneamente la activación de estas células. El NCF (factor citosólico de neutrófilos) es una proteína de un peso molecular superior a 750.000 Da. con capacidad de atraer y activar al neutrófilo (Snyderman R., 1984).

Mediadores sintetizados de *Novo*:

- PGE₂. Es la prostaglandina más importante en el proceso inflamatorio. Produce vasodilatación y dolor. En coordinación con el factor C5a y LTB₄ aumenta la permeabilidad vascular. El efecto antiinflamatorio de la aspirina se debe a que al bloquear la vía de la ciclooxigenasa impide la formación de esta prostaglandina (Larson GL., 1983).
- LTB₄. Es un factor quimiotáctico para eosinófilos, neutrófilos, mastocitos y macrófagos.
- PAF (Factor activador de plaquetas). Este factor tiene varias propiedades. Activa las plaquetas determinando su agregación, con la liberación de mediadores por parte de estos cuerpos e inicio de los procesos de coagulación. Produce, además, vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular. Es, por otra parte, un potente factor quimiotáctico y activador de neutrófilos (Larson GL., 1983).

Llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio

Desde el punto de vista cronológico, los mediadores de la inflamación van a producir básicamente dos efectos. En una primera fase inicial, alteraciones vasculares que facilitan el movimiento de moléculas desde la sangre al foco inflamatorio, así como la producción de edema. En una segunda fase, más tardía, las propias alteraciones vasculares, así como la liberación en el foco de factores quimiotácticos, determinan la llegada de células inmunes procedentes de la sangre y de los tejidos circundantes (Roitt *et al.*, 2008)

Fase inicial. Llegada de moléculas

- **Inmunoglobulinas.** Los anticuerpos se unen y bloquean el germen y sus toxinas. La IgM e IgG activan el complemento por la vía clásica. La IgG, a su vez, se une a los receptores por la porción Fc (FcR) que presentan los fagocitos en su membrana, potenciando la fagocitosis (Roitt *et al.*, 2008)
- **Factores del complemento.** Además de la activación de la vía clásica indicada anteriormente, el complemento se puede activar por la vía alternativa, por productos liberados directamente por el germen. Cuando el complemento, siguiendo una u otra vía, alcanza la vía común produce la lisis del germen o la célula extraña inductora de la inflamación. Los factores C3a y C5a, actuando sobre receptores de membrana, activan al mastocito y basófilo induciendo la liberación de mediadores y amplificando, de esta forma, el fenómeno inflamatorio. El C5a es un potente factor quimiotáctico, mientras que el C3b, uniéndose a receptores de membrana de los fagocitos, potencia la fagocitosis (Gallin JL., 1989).
- **Kininógenos.** Sobre estas moléculas actúan las kininogenasas liberadas por el mastocito y basófilo dando lugar a las kininas.
- **Proteínas de la fase aguda.** Destacaremos entre ellas a la proteína C Reactiva (PCR) que tiene la capacidad de fijar determinados gérmenes como el neumococo y de activar el complemento por la vía clásica (Roitt *et al.*, 2008).

Fase tardía. Llegada de células

- Basófilo. Contribuye, junto con el mastocito, a la liberación de mediadores.
- Neutrófilo. Es de las primeras células en llegar al foco inflamatorio. Elimina al germen mediante fagocitosis o liberando factores tóxicos que contiene en sus gránulos citoplasmáticos y produciéndole, así, una muerte extracelular.
- Monocito/Macrófago. Procedente de la sangre el monocito, y de los tejidos cercanos el macrófago, llegan al foco más tardíamente. El monocito, en los tejidos, se diferencia en macrófago. Esta célula presenta idénticas funciones a las señaladas para el neutrófilo.
- Linfocitos T y B. Potenciados por el macrófago inician la respuesta específica. Las células B procedentes de los tejidos linfoides asociados a tejidos o mucosas sintetizan IgE, que unidas al mastocito o basófilo pueden potenciar la inflamación. Por otra parte, las células T comienzan a producir linfoquinas que prolongan la inflamación en una respuesta inmune más elaborada (Roitt *et al.*, 2008).
- Eosinófilo. Aunque es una célula citotóxica en las infecciones parasitarias, parece además tener en la inflamación una función reguladora.

Regulación de la respuesta inflamatoria

Como la mayor parte de las respuestas inmunes, el fenómeno inflamatorio se encuentra estrechamente regulado, evitando, así una respuesta exagerada o perjudicial. Algunos de los mediadores que producen activación, al variar su concentración o actuar sobre distintos receptores, van a producir inhibición, consiguiendo, de esta forma, un equilibrio o modulación de la respuesta inflamatoria. Los siguientes factores intervienen en esta regulación:

- Histamina. Actuando sobre receptores H₂, induce en el mastocito y basófilo una inhibición de la liberación de mediadores, inhibe la actividad del neutrófilo, inhibe la quimiotaxis y activa las células T supresoras.

- PGE. Produce en el mastocito y basófilo una inhibición de la liberación de mediadores y sobre los linfocitos una inhibición de la proliferación y diferenciación.
- Agonistas autonómicos. El mastocito y basófilo parecen presentar receptores α y β -adrenérgicos que sugieren que la liberación de mediadores podría estar sometida a una regulación autonómica. La activación del receptor β -adrenérgico produce una inhibición, mientras que la activación del α -adrenérgico inducen la estimulación
- Heparina. Inhibe la coagulación y la activación de los factores del complemento.
- Eosinófilo. Esta célula, atraída por el ECF-A, acude al foco inflamatorio donde libera una serie de enzimas que degradan determinados mediadores potenciadores de la inflamación. (Gallin JI., 1989; Roitt *et al.*, 2008).

Reparación

Cuando las causas de la agresión han desaparecido o han sido eliminadas por la propia respuesta inflamatoria, se inician los procesos de reparación. Estos procesos integran la llegada a la zona de fibroblastos que van a proliferar y sintetizar colágeno, proliferación de células epiteliales y proliferación de vasos dentro de la herida (Gallin JL., 1989). No se conocen bien los mediadores responsables de estos fenómenos, parece ser que la IL-1 es la responsable de la activación de los fibroblastos.

3.3. Interacción vehículo-piel

La piel está formada por tres capas que son la epidermis, dermis y tejido subcutáneo. Contiene además glándulas sebáceas, sudoríparas y folículos pilosos. La superficie de la piel esta normalmente cubierta por una emulsión epicutánea o manto hidrolipídico que se forma a partir de los ácidos grasos de las secreciones sebáceas de los queratinocitos y el agua que proviene de las glándulas sudoríparas. Este coadyuva al mantenimiento de su función protectora y flora cutánea (Katzung BG., 2007).

Dadas las propiedades de barrera de la piel, se requieren de sistemas efectivos para hacer que un compuesto aplicado tópicamente pueda atravesar la barrera del estrato córneo y retenerse en el sitio donde va a ejercer su efecto terapéutico. Un factor muy importante es la hidratación de la piel esta juega un papel decisivo en el vehículo ya que el nivel de hidratación puede aumentar o disminuir la efectividad del vehículo y por tanto la acción terapéutica. De manera general la hidratación es un factor considerable para la penetración de cualquier fármaco y la penetración del propio vehículo (Barry B., 1983).

La difusión de un fármaco a través de la piel se realiza mediante un proceso de difusión pasiva, por lo tanto, es proporcional a su concentración, peso molecular, vehículo, coeficiente de reparto del fármaco a través del estrato corneo, así como el coeficiente de difusión del fármaco que se encuentra en estrato corneo. La importancia del coeficiente de reparto radica en la retención del fármaco en el vehículo, y es determinante para la liberación del medicamento desde el vehículo hacia la piel. El coeficiente de difusión es considerado una magnitud con la cual la piel se impone al paso del fármaco y determina la difusión del principio activo a través de las capas de la piel. Los fármacos lipofílicos no ionizados y de bajo peso molecular suelen atravesar con mayor facilidad el estrato corneo (Piñeiro G., 2011). Los vehículos usuales generalmente no son capaces de penetrar por sí mismos en el estrato corneo de la piel, Lo que hacen es ceder el fármaco que transportan a la superficie de la piel y una vez liberado el principio activo, la penetración del mismo depende de su coeficiente de reparto, estrato corneo y agua superficial.

Lo antes mencionado ha dado paso a que durante varios años se trate de buscar vehículos capaces de penetrar por sí mismos y de transportar cualquier fármaco a las capas más internas de la piel en donde es de gran interés que actué.

3.4. Vía de administración tópica

La piel ofrece sitios ideales y múltiples para administrar agentes terapéuticos tanto para acciones locales como sistémicas, la piel humana también es una barrera autorreparable

altamente eficiente diseñada para mantener en estado óptimo el interior y el exterior (Mehta D. *et al.*, 2015).

La vía tópica hace referencia a la aplicación sobre la piel o sobre las mucosas. Es decir, no debe identificarse esta vía exclusivamente, con la administración sobre la piel, sino que la administración sobre las diferentes mucosas del organismo (como la mucosa oftálmica, ótica o nasal) constituyen igualmente vías tópicas de administración.

La gran mayoría de los formulados tópicos están destinados a ejercer una acción local sobre zonas más o menos cercanas al lugar de aplicación. La piel es la barrera que impide que el medicamento pueda penetrar hasta la sangre, por esta razón, los fármacos por vía tópica pueden ser administrados a concentraciones superiores a los utilizados por otras vías.

En la actualidad, existe mucho interés en la utilización de la piel como vía de administración de fármacos, con el objetivo de obtener una acción efectiva y local.

3.4.1. Formulados usados vía tópica

Muchas formas farmacéuticas de uso tópico son ampliamente usadas y se pueden clasificar en diferentes grupos: un ejemplo de ello son las formas líquidas y sólidas, así como las formas semisólidas, que constituyen el grupo más amplio dentro de las formulaciones aplicadas sobre piel y mucosas (Vila-Jato, J.L., 2001); las formulas gaseosas, que contienen el compuesto activo en un líquido y que esté combinado con una forma gaseosa; y algunas otras formas más novedosas con tecnologías modernas (Fig. 6).

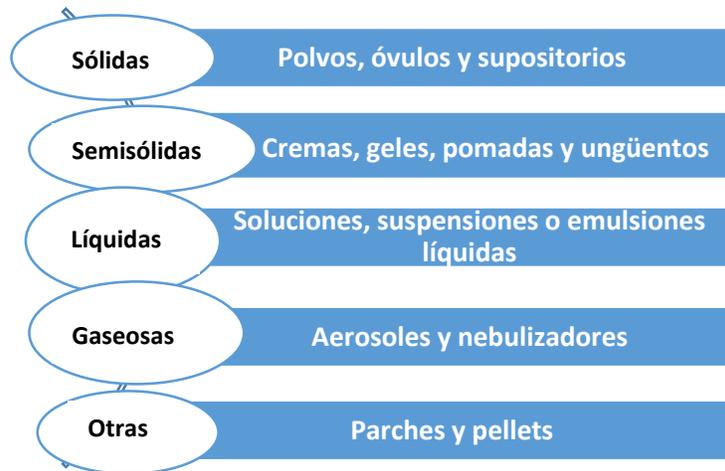


Figura 6. Clasificación de formulaciones farmacéuticas tópicas

3.5. Microemulsiones

Hoy día gracias a diversos experimentos y pruebas se han mejorado los productos tópicos para la eficiente aplicación de fármacos vía tópica. El resultado de este mejoramiento son las microemulsiones.

Una microemulsión (ME) se define como un sistema coloidal de aceite, agua y surfactantes que forman una sola emulsión ópticamente transparente.

Las microemulsiones son termodinámicamente estables en un amplio rango de temperaturas debido a sus gotas muy finas que normalmente varían entre 20 y 200 nm.

Las microemulsiones se ha convertido en un vehículo prometedor para la administración tópica de fármacos, su potencial para el suministro percutáneo se atribuye principalmente a la excelente capacidad solubilizante y potencial de penetración. (Wan T. *et al.*, 2015). Las microemulsiones (Mes) ayudan a solubilizar fármacos lipofílicos y muestran una penetración rápida y eficiente en la piel. Por lo tanto, es beneficioso para la administración tópica de medicamentos.

Los ingredientes utilizados para la preparación de las microemulsiones deben ser seguros, no tóxicos y no irritantes, según los que aparecen en la lista de componentes generalmente reconocidos como seguros (Generally Regarded As Safe, GRAS) (Wu y cols., 2001). Es de especial interés la elección del surfactante, ya que suelen ser los compuestos más irritantes, y se encuentran en una relativamente elevada concentración, necesaria para la

estabilización del sistema coloidal. La formulación de las microemulsiones implica normalmente la combinación de cuatro componentes: una fase acuosa, una fase oleosa, un tensoactivo y un co-tensoactivo.

Fase acuosa. El componente más utilizado es el agua, pero si es necesario puede sustituirse por una solución salina o una solución glucosa para algunas aplicaciones específicas.

Fase oleosa. La fase oleosa es la responsable de la solubilización de fármacos hidrófobos. En este caso es conveniente seleccionar el aceite en el cual el fármaco presente una mayor solubilidad. Así pues, para la selección de esta fase, se realiza un *screening* de aceites. Para evaluar la solubilidad en éstos, se disuelve un exceso de fármaco en un volumen determinado.

Tensoactivo. Tras la selección de la fase oleosa se ha de seleccionar el tensoactivo apropiado. Con el fin de racionalizar el comportamiento de los tensoactivos se determina su balance hidro lipofílico (HLB). En general, se eligen tensoactivos no iónicos (ésteres de glicerol, ésteres de ácidos grasos, alcoholes grasos), por su buena tolerabilidad biológica, así como por su habilidad para formar microemulsiones independientemente del pH y a la concentración de electrolitos en la fórmula (Djordjevic y cols., 2004). Normalmente las microemulsiones presentan considerables cantidades de tensoactivo, lo hace que posean una muy baja tensión interfacial, facilitando la obtención de tamaños de gota nanométricos que asegura una excelente superficie de contacto entre la piel y el vehículo (Kreilgaard, 2002).

Para seleccionar el tensoactivo específico se pueden seguir dos procedimientos:

- 1.- Se seleccionan los tensoactivos y co-tensoactivos en los cuales el fármaco sea más soluble (Zhu y cols., 2008).
- 2.-Selección del tensoactivo que mayor solubilidad tenga en la fase oleosa (Shakeel y Ramadan, 2010). La separación de fases es la forma más común de desestabilización de las emulsiones. Los tensoactivos se utilizan con el fin de estabilizar el sistema.

Co-tensioactivos. Los co-tensioactivos, son tensioactivos generalmente formados por alcoholes o ésteres alcohólicos de cadena corta, que se añaden con el fin de reducir aún más la tensión interfacial, facilitando la emulsificación del sistema (Devarajan y Ravichandran, 2011). La adición de un co-tensioactivo generalmente aumenta la estabilidad del sistema y la solubilidad del compuesto en el mismo (Lu y Gao, 2010).

3.5.1 Estructura y técnicas de caracterización de las microemulsiones

Como resultado de las investigaciones que se han realizado en los últimos años, se puede afirmar que las microemulsiones no se ajustan a un solo modelo estructural. La estructura está muy influenciada por las propiedades físico-químicas y la proporción de los componentes usados (Kreilgaard, 2002). Las estructuras más conocidas son las de microgotas esféricas, entre 10 y 200 nm de tamaño, de una de las fases en el seno de la otra, ya sea de tipo directo (O/A), como de tipo inverso (A/O). La caracterización de la estructura de las microemulsiones se realiza mediante diversas técnicas experimentales, entre las que destacan el diagrama de fases, conductancia, espectroscopia de correlación fotónica y la microscopía de transmisión electrónica.

Los diagramas pseudo-ternarios o diagramas de fases se utilizan para determinar con exactitud los componentes de la microemulsión y representan una unión de fase acuosa, oleosa y mezcla de tensioactivos/cotensioactivo. Cada vértice del triángulo representa el 100% de uno de los compuestos, mientras que la arista opuesta representa el 0% del mismo (Fig. 7).

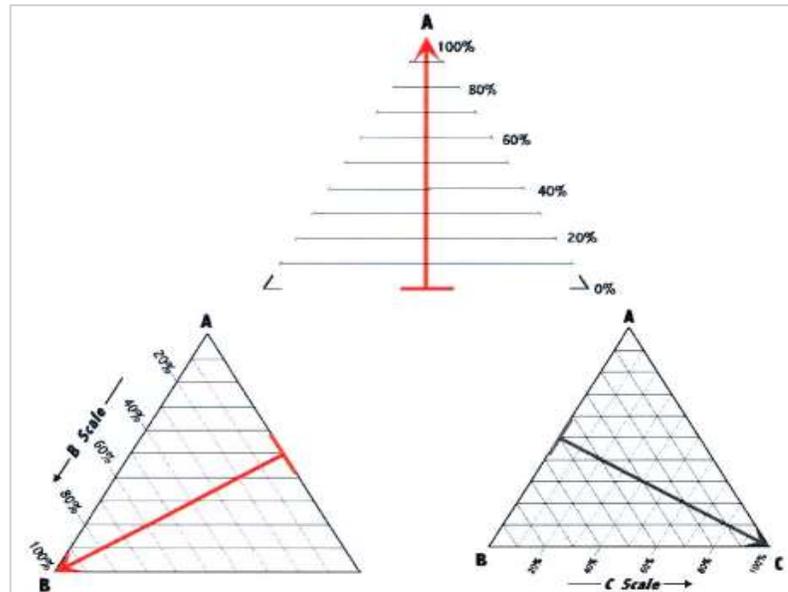


Figura 7. Lectura de un diagrama pseudo-ternario. Los tres diagramas que se muestran en la imagen representan la instrucción de lectura de un diagrama pseudo-ternario en las cuales cada vértice (A, B o C) representa el 100% de cada fase. Imagen de: <https://docplayer.es/78794690-Aportacion-al-estudio-de-permeacion-transdermica-de-cetirizina.html>

Para determinar la región de formación de microemulsión en primer lugar se seleccionan las mezclas que hayan resultado ser monofásicas y transparentes. A estas se les determina el tamaño de gota y se dibujan entonces en el triángulo aquella que hayan tenido un tamaño adecuado, generalmente ente 20 y 200 nm. Estos puntos se unen y esa área comprende la composición que delimita la región de formación de microemulsión.

3.5.2. Microemulsión base gel

El uso de geles transparentes ha aumentado tanto en cosméticos como en preparaciones farmacéuticas. Un gel es un coloide que típicamente contiene 99% en peso de líquido, que se inmoviliza mediante la tensión superficial entre él y una red macromolecular de fibras

construidas a partir de una pequeña cantidad de una sustancia gelatinosa presente. Los geles son una clase relativamente nueva de forma de dosificación creada por el atrapamiento de grandes cantidades de líquido acuoso o hidroalcohólico en una red de partículas sólidas coloidales. Las formulaciones en gel generalmente proporcionan una liberación de fármaco más rápida en comparación con ungüentos y pastas cremas. A pesar de las muchas ventajas de los geles, una limitación importante es su incapacidad para administrar fármacos hidrofóbicos. El fármaco insoluble en agua no se incorpora directamente en un sistema de base de gel. Por tanto, para superar esta limitación, se usa un enfoque basado en emulsión, de modo que un resto terapéutico hidrofóbico se puede incorporar y administrar con éxito a través de geles. En primer lugar, la emulsión o microemulsión preparada se evalúa y se incorpora en un agente gelificante adecuado. Cuando se usan geles y emulsiones en forma combinada, las formas de dosificación se denominan microemulsión base gel. De hecho, la presencia de un agente gelificante en la fase acuosa convierte una microemulsión clásica en una microemulsión base gel.

El sistema directo de aceite en el agua se usa para atrapar fármacos lipofílicos mientras que los fármacos hidrofílicos se encapsulan en el sistema inverso de agua en aceite. Las microemulsiones poseen un cierto grado de elegancia y se lavan fácilmente cuando se desee. También tienen una gran capacidad para penetrar en la piel (Mehta D. *et al.*, 2015).

3.5.3. Diseño de formulación de microemulsion base gel

Mehta y colaboradores (2015) describen que para la formulación base debemos considerar los siguientes componentes básicos:

1.- Fármaco. Un fármaco es una sustancia que sirve para curar o prevenir una enfermedad, para reducir sus efectos sobre el organismo o para aliviar un dolor físico. La elección juiciosa del fármaco juega un papel importante en el desarrollo exitoso de un producto tópico. En este caso el fármaco que usaremos es de origen vegetal y es el extracto de *Galphimia glauca* el cual ya cuenta con actividad antiinflamatoria probada.

2.-Vehículo. Existen seis consideraciones principales que guían el desarrollo de un vehículo.

El vehículo debe:

- Entregar el fármaco al sitio objetivo.
- Liberar el fármaco para que pueda migrar libremente al sitio de acción.
- Depositar eficientemente el medicamento en la piel con distribución homogénea.
- Mantener un nivel de fármaco terapéutico en el tejido un tiempo suficiente para proporcionar un efecto farmacológico.
- Estar formulado adecuadamente para el sitio anatómico a tratar.
- Sea cosméticamente aceptable para el paciente.

a. Material acuoso. Esta forma la fase acuosa de la microemulsión. comúnmente, el agua se usa como fase acuosa. El pH de la fase acuosa siempre necesita ajustarse debido a su considerable impacto en el comportamiento de fase de la microemulsión. Los agentes comúnmente usados son agua, alcoholes, etc.

b. Aceites: Los aceites son usados para la preparación de microemulsiones ya que algunos tienen la capacidad de solubilizar el fármaco. Para las microemulsiones aplicadas externamente, los aceites minerales, ya sea solos o combinados con parafina blanda o dura, son ampliamente utilizados tanto como vehículo para el fármaco por sus características oclusivas y sensoriales.

3.-Emulsionantes: el agente emulsionante consiste en surfactante y cotensioactivo, su concentración debe usarse en diferentes proporciones. Los agentes emulsionantes se usan tanto para promover la emulsificación en el momento de la fabricación como para controlar la estabilidad durante un tiempo de conservación que puede variar desde días para microemulsiones preparadas extemporáneamente hasta meses o años para preparaciones comerciales (por ejemplo, estearato de polietilenglicol 40, mono oleato de sorbitán, Span 80, TWEEN 80, ácido esteárico y estearato de sodio).

4.-Potenciadores de la penetración: estos son compuestos que promueven la permeabilidad de la piel al alterar la piel como una barrera para el flujo de la penetración deseada y se consideran parte integral de la formulación más tópica. Por ejemplo, agua, aceites esenciales, urea y sus derivados, etc.

5.- Agentes gelificantes: estos son los agentes utilizados para aumentar la consistencia de cualquier forma de dosificación y también se pueden usar como agentes espesantes. Un ejemplo muy común es el Carbopol.

6.- Conservadores: se usan para resistir el ataque microbiano. Ejemplos: metilparabeno y propilparabeno.

7.- Tensioactivos: Diversos tensioactivos no iónicos tales como TWEEN, labrasol, labrafac CM 10, cromóforo, etc. Se prefieren los emulsionantes de origen natural debido a su perfil de seguridad en comparación con los emulsionantes sintéticos.

8.- Co-surfactantes: en la mayoría de los casos, los surfactantes de cadena simple solos son incapaces de reducir la tensión interfacial O/W lo suficiente para formar una microemulsión. Debido a su naturaleza anfifílica, un cotensioactivo se acumula sustancialmente en la capa de interfaz, aumentando la fluidez de la película interfacial al penetrar en la capa de tensoactivo. Los alcoholes de longitud de cadena corta a media generalmente se agregan como tensioactivos auxiliares que ayudan a aumentar la fluidez de la interfaz (OM. *et al* 1998). Entre los alcoholes de cadena corta, el etanol se usa ampliamente como potenciador de la permeación. En alcoholes de cadena media se sabe que el 1-butanol es un potenciador más eficaz. La relación surfactantes y co-surfactante es un factor clave para las propiedades de fase.

9. Agente quelante: las bases y los medicamentos en geles son sensibles a los metales pesados, por lo tanto, se añaden para proteger. Ejemplo: E.D.T.A., ciclodextrina metilada.

3.6. Geles

En el año 2014 la F.E.U.M. en su octava edición define un gel como "una preparación semisólida que contiene el o los principios activos o aditivos constituidos por lo general por macro células dispersas en un líquido que puede ser agua, alcohol o aceite que forma una red que atrapa al líquido y que le restringe su movimiento, por lo tanto, son preparaciones viscosas".

Otra definición es la publicada en la International Journal of Farmaceutics, volumen 295, en el año 2005, donde un gel es considerado un semisólido que contiene un agente gelificante que le proporciona rigidez a la solución o dispersión coloidal para la aplicación externa en

la piel. El gel puede contener partículas suspendidas, así como contener un vehículo acuoso o alcohólico, siendo que el agente gelificante puede ser un almidón derivado de la celulosa, carbomero, poloxámeros, silicatos de aluminio o magnesio, goma xantana o silica coloidal, el cual puede presentar una apariencia generalmente clara o translucido, proporcionando una sensación de enfriamiento al ser aplicado en la piel (Bohse y Westenberger, 2005).

Una de las principales características de un gel está dada por su formación en presencia de agua, así como en otros disolventes como pueden ser el alcohol, aceites, etc. La extensión de la formación está determinada por la naturaleza del polímero, hidrofóbicos o hidrofílicos y por la densidad de sus entrecruzamientos (Speiling L.H., 1992).

Los geles poliméricos son producto del entrecruzamiento de cadenas poliméricas, por la formación de enlaces covalentes (entrecruzamiento químico) o enlaces no covalentes (entrecruzamiento físico) (Hålggerstrôm, 2003), como lo podemos ver en la figura 8.

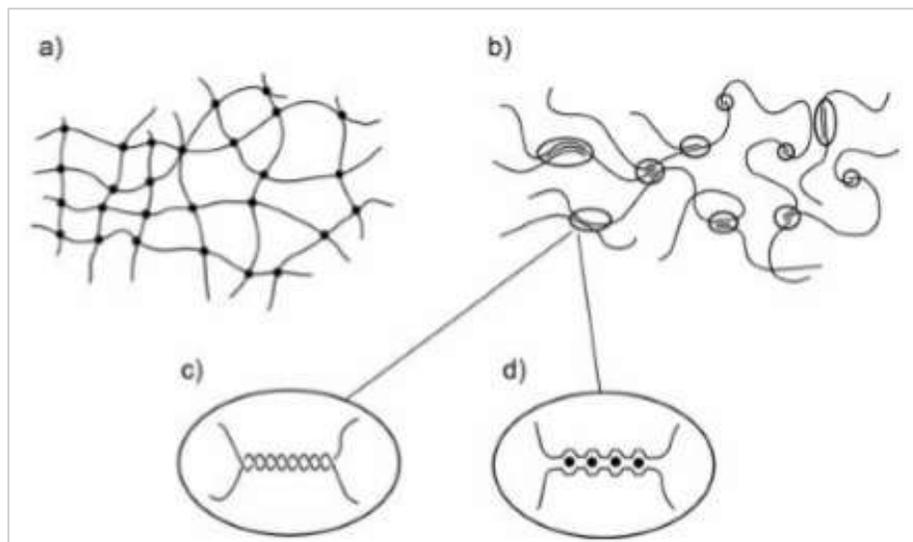


Figura 8. Entrecruzamiento en geles poliméricos. Ilustración esquemática de entrecruzamiento químico o covalente (a) y entrecruzamiento físico o no covalente en geles poliméricos(b). Ejemplos de entre cruzamientos físicos y formación de hélice por enlaces de hidrógeno (c) y quelación de cationes (•) (d) (Hålggerstrôm, 2003)

Excipientes

Los excipientes son un componente básico en la fabricación de geles o algún medicamento, su función es servir como soporte del principio activo brindando propiedades como: estabilidad perfil biofarmacéutico, aceptación por el paciente y aspecto estético, así como facilitar la fabricación del gel.

La liberación del principio activo depende de la fase predominante. Las fases acuosas predominan cuando queremos que el fármaco actúe a nivel externo, es decir en las capas superficiales de la piel. Si se necesita que el fármaco sea de acción prolongada se buscan excipientes grasos que formen una película oclusiva sobre la piel. Un gel es considerado una estructura polimérica entrecruzada que por acción de un líquido experimenta hinchamiento permaneciendo insoluble sin perder su forma original. La conservación de la forma es el resultado de un balance entre las fuerzas intermoleculares dispersivas y cohesivas, dentro de las cuales se incluye la absorción del disolvente.

Si el hinchamiento se produce por acción del agua se obtienen los denominados hidrogeles, los cuales poseen un carácter hidrófilo por la presencia en su estructura molecular de grupos afines al agua (-OH-COOH, -CONH₂, -CONH, -SO₃H), (Insón y Perilla, 2002).

Un gel puede contener partículas suspendidas, así como un vehículo acuoso o alcohólico y también un agente gelificante que puede ser algún derivado de celulosa, carbómeros, poloxámeros, silicatos de aluminio o magnesio, goma de xantana, entre otros (Almdal, *et al* 1993).

3.7. Aerosoles

Se estima que alrededor del año 1920 se dieron los inicios de la industria del aerosol por parte de una industria francesa dedicada a la fabricación de perfumes. Sin embargo, hasta la década de los cincuentas en el mercado europeo ya se encontraban los primeros productos en esta forma de envasado, principalmente insecticidas y desodorantes ambientales, los cuales continuaron teniendo buena aceptación por parte del público gracias a sus características novedosas, y sobre todo por su rapidez y comodidad de uso hoy en día se siguen usando con una adecuada regulación ambiental.

De acuerdo a la definición de la Farmacopea de los Estados Unidos, USP 36, los aerosoles son preparaciones envasadas a presión y que contienen agentes terapéuticos y un propelente que se liberan al activar un sistema de válvula apropiado. Al momento de activar el sistema de válvula, el ingrediente activo es liberado como una nube de partículas finas o gotitas. En el caso de productos tópicos, y dependiendo de la naturaleza del API y de las condiciones que se estén tratando, la activación de la válvula puede resultar en una liberación fija de una cantidad controlada de formulación o la liberación continua mientras la válvula esté siendo presionada (Sierra, 2013).

En lo que corresponde a su contenido y estructura los aerosoles contienen un gas comprimido disuelto a presión o licuado llamado comúnmente propelente o dispersor y un líquido, pasta o polvo llamado principio activo o componente principal. Un aerosol también está equipado con un dispositivo disperso (válvula) que permite la expulsión del contenido en forma de partículas sólidas o líquidas en suspensión en el gas o en forma de espuma, pasta, polvo o en estado líquido o gaseoso. Deben estar provistos de un elemento protector (tapa) o sistema que impida la descarga accidental (Figura 9).



Figura 9. Elementos de un aerosol. La imagen muestra el modelo general de un envase de aerosol y sus elementos básicos. Imagen tomada y modificada de: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/rccquifa/rt/printerFriendly/54212/53494>

El proceso de envasado para los aerosoles de manera general se lleva a cabo de la siguiente manera: se inicia con un envase previamente aprobado al cual se le añade el producto que contendrá (el granel ya probado para su uso). Posteriormente se coloca la válvula ajustándola bien al bote de esta forma se asegura el llenado, enseguida viene la inyección del gas propelente a través de la válvula, dotando al recipiente de presión.

Una vez concluidas las anteriores actividades se sumerge el recipiente en agua caliente (50°C – 60°C). Esto para verificar que el producto esté libre de anomalías en cuanto a la presión interna del envase, en el caso de que todo salga bien se seca y se coloca el activador seguido de la tapa y al finalizar se marca el envase con los datos correspondientes a la fecha y el lote (Rodríguez, 2012).

3.8. Antiinflamatorios tópicos naturales en el mercado actual

En el tratamiento del dolor y de la inflamación en alguna lesión se usan ampliamente y de forma casi exclusiva los antiinflamatorios de uso tópico. La eficacia por vía tópica de cada principio activo en concreto no dependerá exclusivamente de su potencia farmacológica intrínseca, sino también de su capacidad para ser absorbido y alcanzar la lesión. Cada vez está más claro el papel relevante que desempeña la formulación a la hora de facilitar esta capacidad. Es fácil de entender, por tanto, que el mismo principio activo pueda tener una actividad claramente distinta al estar formulado en vehículos diferentes.

En la antigüedad, los productos para tratar los golpes y los problemas musculares solían presentarse en forma líquida: se trataba de las clásicas tinturas de romero, alcanforados, etc. Algunos de estos productos aún subsisten en el mercado, pero han sido poco a poco desplazados por medicamentos con formas farmacéuticas de uso más cómodo como las espumas y los *sprays*, o también por formulaciones galénicas en forma de geles o emulsiones especialmente diseñadas para lograr la máxima penetración de sus principios activos en la zona afectada. (Prats, 2001). También existen formulaciones que combinan las tecnologías farmacéuticas actuales con los principios activos de origen natural, dando una

excelente alternativa para el alivio de padecimientos tan importantes como lo es la inflamación. Algunos ejemplos representativos de estos en forma de geles y aerosoles se muestran en la tabla 5.

La lista de productos de origen natural es mucho menor en comparación con los de origen sintético, sin embargo, actualmente se siguen investigando alternativas naturales efectivas y que reduzcan los efectos secundarios de todo medicamento.

Tabla 5. Ejemplos de geles y aerosoles con actividad antiinflamatoria y de origen natural en el mercado actual

Forma farmacéutica	Nombre comercial	Principio activo	Laboratorio
<p style="text-align: center;">Gel</p> 	<p style="text-align: center;">Fisiocrem</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Árnica (<i>Árnica montana</i>) • Hipérico (<i>Hypericum perforatum</i>) • Caléndula (<i>Caléndula officinalis</i>) • Melaleuca (<i>Melaleuca alternifolia</i>) • menta (<i>Mentha arvensis</i>) 	<p style="text-align: center;">Uriach</p>
<p style="text-align: center;">Aerosol</p> 	<p style="text-align: center;">Physiorelax</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Árnica, (<i>Árnica montana</i>) • Harpagofito (<i>Harpagophytum procumbens</i>) • Caléndula (<i>Caléndula officinalis</i>) • Menta (<i>Mentha arvensis</i>) • Hipérico (<i>Hypericum perforatum</i>) • Rosa mosqueta (<i>Rosa rubiginosa</i>) • Centella asiática (<i>Centella asiática</i>) 	<p style="text-align: center;">Grupo farmacéutico D.F.T</p>
<p style="text-align: center;">Gel</p> 	<p style="text-align: center;">Silicium G5</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Pomelo (<i>Citrus grandis</i>) 	<p style="text-align: center;">Institut d'Expertise Clinique</p>

<p>Aerosol</p> 	<p>Acheflan</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Cordia verbenacea</i> 	<p>Silanes</p>
<p>Gel</p> 	<p>RELAX GEL ULTRA</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Marihuana (<i>Cannabis sativa</i>) • Castaño de indias (<i>Aesculus hippocastanum</i>) • <i>Centella asiática</i> • arnica (<i>Arnica montana</i>) • hamamelis (<i>Hamamelis virginiana</i>) • <i>Aloe vera</i> 	<p>VITA LITÉ</p>
<p>Aerosol</p> 	<p>Aromalgic</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Gaultheria procumbens</i> • Menta (<i>Mentha arvensis</i>) • Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>) • Alcanfor (<i>Cinnamomum camphora</i>) • Eucalipto azul (<i>Eucalyptus globulus</i>) • Verbena (<i>Verbena officinalis</i>) • Lavandin (<i>Lavandula hybrida</i>) • Pino silvestre (<i>Pinus sylvestris</i>) • Canela (<i>Cinnamomum verum</i>) 	<p>Pranarōm</p>

3.9. Investigación de mercado

El estudio o investigación de mercado es una herramienta de mercadeo que permite y facilita la obtención de datos, resultados que de una u otra forma serán analizados mediante herramientas estadísticas para obtener como resultados la aceptación o no y las complicaciones de un producto o servicio dentro del mercado (Sapag N., 2001). Ciertos autores concuerdan que el estudio de mercado surge a partir de un problema del marketing que no podemos resolver por medio de otro método. Los estudios de mercado contribuyen a disminuir el riesgo que toda decisión lleva consigo, pues permiten conocer mejor los antecedentes del problema y el panorama histórico, actual y futuro del producto o servicio dentro del mercado.

Pasos a seguir para realizar una investigación de mercado

La metodología para llevar a cabo una investigación de mercado puede constar de los siguientes 5 pasos:

Paso 1: Formulación del problema.

La formulación del problema consiste en la definición de los objetivos o de las preguntas de la investigación. El problema es el desconocimiento de la demanda de mercado del bien o servicio evaluado en el proyecto.

El proceso de determinación del problema también involucra identificar el grado de precisión que se desea alcanzar en la proyección del patrón del comportamiento, que hace que los consumidores demanden un determinado producto.

Una vez tomada la decisión de que investigar, las características del problema determinarán el diseño de investigación a utilizar.

Paso 2: Diseño de la investigación.

El diseño de la investigación, es el plan de acción que guía la recolección y análisis de los datos, para asegurarse que la investigación sea adecuada al proyecto y que se utilicen procedimientos económicos y eficientes.

Existen tres tipos básicos de diseño de investigación:

- Investigación exploratoria. El mayor énfasis está en descubrir ideas, hipótesis o explicaciones sobre un problema. Se le denomina también investigación cualitativa.
- Investigación descriptiva. Se preocupa de determinar la frecuencia con que un comportamiento ocurre o la relación entre dos variables. Normalmente una investigación descriptiva es guiada por una o más hipótesis iniciales. Se le denomina también investigación cuantitativa. Los objetivos de este tipo de investigación son describir:

- Situaciones o mercados;
- Población y segmentos de mercado;
- Características de los canales de distribución;
- Tendencias y realizar predicciones;

Los principales métodos y fuentes de datos analizables son:

- Estudios con datos secundarios;
- Entrevistas y encuestas con expertos;
- Encuestas a consumidores;
- Investigación causal. Se preocupa de establecer relaciones de causa y efecto o de causalidad. Normalmente toma la forma de experimentos y por ello se le puede denominar también investigación experimental.

El diseño experimental comprende la especificación de los siguientes pasos:

- Tratamientos a manipular;
- Unidades de prueba a usar;
- Variables dependientes a medir;

Paso 3: Desarrollo del plan de investigación para la recopilación de datos.

Los objetivos de la investigación guiarán la identificación de las necesidades de información específica. Se debe desarrollar un plan para recoger información en forma eficiente, para esto se debe reunir toda la información secundaria que sea de interés para la investigación. Cuando no existen datos secundarios para un problema en particular se debe generar un plan para obtener información primaria.

Lo importante es que la información debe ser relevante, confiable, imparcial y actualizada.

Paso 4: Diseño muestral y recopilación de datos.

El procedimiento de selección muestral consiste en seleccionar un segmento de la población que represente la población como un todo. Este conjunto de todos los individuos o entidades de las cuales se requiere información se denomina muestra.

Se debe tener en cuenta:

-Unidad de la muestra: Se refiere a las personas a quienes se les va a preguntar. Se debe determinar qué información se necesita y quien posee esta información.

-Tamaño de la muestra: Es la cantidad de personas que van a formar parte de la muestra.

-Procedimiento de la muestra. Es la forma en que se van a escoger las personas que forman parte de la muestra.

Paso 5: Preparación del informe de investigación.

El informe final de una investigación de mercado debe incluir los siguientes contenidos:

- Resumen ejecutivo;
- Objetivo de la investigación;
- Metodología de la investigación. Que debe incluir:
 - Diseño de investigación;
 - Método de recolección de datos;

- Medio de administración;
- Tipo de muestra y tamaño muestral;
- Equipo de terreno y supervisión;
- Análisis de resultados;
- Conclusiones y recomendaciones;

La información obtenida a través de una investigación científica de mercado suele ser confiable para proyectar la demanda y ayudar a identificar oportunidades de mercado minimizando riesgos.

4. JUSTIFICACIÓN

México es un país que reporta una gran diversidad de especies de plantas medicinales, sin embargo, no todas se han estudiado en forma científica. Son pocos los estudios que proporcionan información, no solo básica, sino también aplicada, respecto al uso etnomédico de plantas medicinales mexicanas.

Galphimia glauca es una especie que tiene una gran importancia medicinal. Más allá del planteamiento experimental contemporáneo que involucra la selección etnobotánica de las plantas y el descubrimiento de sus propiedades curativas, este proyecto se centra en el empleo de una estrategia para la identificación fitoquímica de compuestos con función antiinflamatoria a partir de hojas de ejemplares silvestres de *G. glauca*, y la elaboración de tres vehículos de uso tópico con efecto antiinflamatorio, lo que permitirá facilitar la administración de estos compuestos, abriendo una propuesta de investigación para futuros medicamentos, aplicando el conocimiento científico acumulado a través de años de estudio de esta planta.

5. HIPÓTESIS

La identificación fitoquímica de compuestos activos y uso aplicado de extractos con actividad antiinflamatoria de *Galphimia glauca* colectados en el municipio de Tepoztlán Morelos permitirá por primera vez comprobar su efectividad en tres vehículos de uso tópico; una suspensión líquida, una microemulsión base gel y un gel hidroalcohólico.

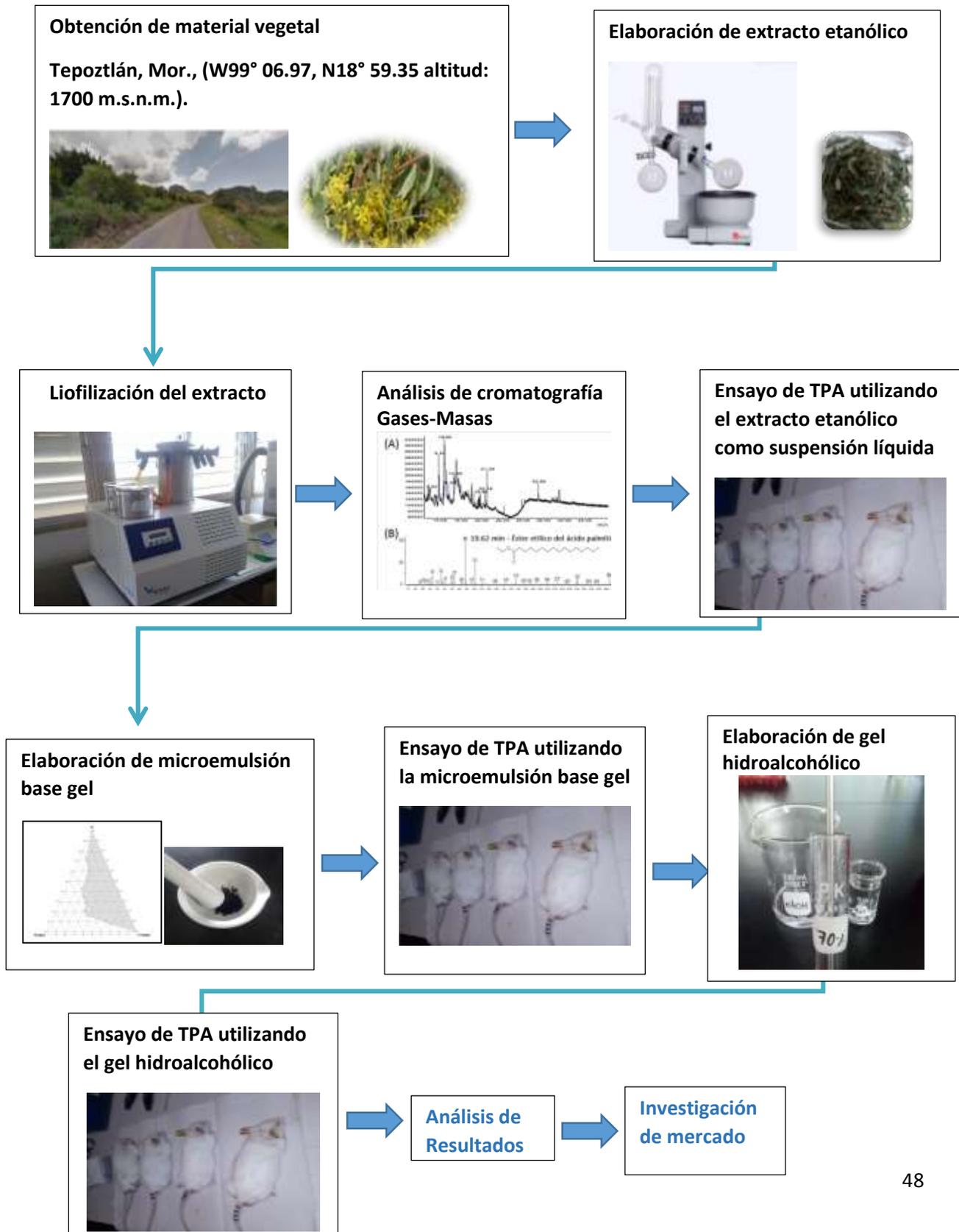
6. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar tres vehículos de uso tópico, una suspensión líquida, una microemulsión base gel y un gel hidroalcohólico con actividad antiinflamatoria a partir de extractos de la especie *Galphimia glauca* colectada en Tepoztlán Mor.,

7. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Realizar la identificación fitoquímica y análisis de los extractos de *Galphimia glauca* utilizando técnicas de cromatografía de gases masas.
2. Comprobar y comparar la efectividad antiinflamatoria de una suspensión líquida etanólica elaborada a partir de extracto de *Galphimia glauca* con el ensayo de TPA de edema de oreja de ratón.
3. Elaborar una microemulsión base gel a partir de extracto de *Galphimia glauca* y comprobar su actividad antiinflamatoria con el ensayo de TPA de edema de oreja de ratón.
4. Elaborar un gel hidroalcohólico a partir de extracto de *Galphimia glauca* y comprobar su actividad antiinflamatoria con el ensayo de TPA de edema de oreja de ratón.
5. Realizar una investigación de mercado considerando la futura elaboración de un nuevo vehículo en forma de aerosol de uso tópico.

8. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



9. MATERIALES Y METODOS

9.1. Material vegetal

El material vegetal (hojas) de *Galphimia glauca* se colectó en el mes de noviembre 2017, en la población de Tepoztlán Morelos (W99° 06.97, N18° 59.35 altitud: 1700 m.s.n.m.). La muestra fue autenticada en el herbario HUMO de la UAEM, con el número de depósito 35896.

Este material vegetal, una vez autenticado, fue sometido a un proceso de extracción para la obtención del extracto etanólico.

Una vez autenticada la especie se utilizaron los extractos etanolicos de hojas, para análisis cromatográficos que servirán como estándares para la elaboración de una solución líquida, una microemulsión base gel y un gel hidroalcohólico y sus respectivas pruebas antiinflamatorias.

9.2. Extracto etanólico partiendo de hojas de la especie *G. glauca*.

Las hojas se trataron de acuerdo al protocolo reportado por Sharma *et al.*, 2012 con algunas modificaciones. Una vez secas las hojas, se trituraron hasta quedar un polvo fino al cual se le realizó una extracción de compuestos utilizando como solvente etanol (10ml OH/ 1 g), agitando de continuo, posteriormente se sonicó y pasados 7 días a temperatura ambiente el solvente se filtró, para posteriormente evaporar el solvente con ayuda de un rotavapor, los extractos se dejaron evaporando en una campana de extracción 20 días, transcurrido este tiempo se guardaron las muestras a -20 °C. Se liofilizaron para obtener el extracto seco con el cual se trabajó.

9.3. Análisis de compuestos de *G. glauca* por cromatografía Gases-Masas

La identificación de los compuestos presentes en el extracto etanólico liofilizado de *G. glauca* se realizó a través del análisis por cromatografía de gases acoplado a masas (CG-EM) en un equipo JMS-700 JEOL.

9.4. Ensayo de actividad antiinflamatoria *in vivo* usando una suspensión líquida a partir de extractos de *G. glauca*.

Para la elaboración de la suspensión líquida se preparó una mezcla entre el extracto seco y etanol puro a una concentración de 15% (3mg/20µl) correspondiente a lo reportado por Sharma en el 2012, y esta se usó para el ensayo de actividad antiinflamatoria con sus respectivos controles.

El ensayo de edema de oreja de ratón inducido con 12-*O*-tetradecanoilforbol acetato (TPA) se realizó según la metodología descrita por Rao *et al.*, (1993). Se emplearon ratones macho (n=5) los cuales se colocaron en cajas de acrílico transparente a temperatura constante de 24°C, con un fotoperiodo de 12/12 horas luz/oscuridad, con agua y alimento *ad libitum*. Se manipularon ratones bajo anestesia general con pentobarbital sódico (3.5 mg/kg, IP), en la oreja derecha se aplicaron 20 µl de una suspensión etanólica de TPA (0.25 mg/ml). Diez minutos después, en la misma oreja se aplicó la solución de *G. glauca* (3mg/20 µl) a una concentración de 15%. La oreja izquierda (control) recibió solamente 10 µL de etanol y 20 µL del vehículo compuesto por indometacina. Cuatro horas después a la aplicación del TPA, los animales fueron anestesiados con éter y sacrificados por dislocación cervical para toma una muestra de 7 mm de diámetro en ambas orejas. El incremento del peso de la muestra derecha con respecto a la izquierda representa el edema. La inhibición del edema se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = [(C-E) / C] 100$$

En donde: C= edema del grupo control (tratado con TPA), E= edema del grupo experimental (TPA más el compuesto). Los resultados obtenidos se analizaron en gráficos comparativos.

9.5. Formulación de microemulsión base gel

Para determinar la formulación de la microemulsión base gel con propiedades antiinflamatorias realizamos diversas pruebas para localizar las mejores fases, las que más se adecuaron al extracto y a la aplicación que se pretende dar al gel.

9.5.1. Ensayos de solubilidad del extracto

Una vez identificada la actividad antiinflamatoria del extracto, se procedió a ensayar este mismo en diferentes vehículos:

fase oleosa: Miristato Isopropil, Isopropil Palmitato, Aceite de ricino y Ácido oleico puro.

fase acuosa: H₂O a PH normal, H₂O a Ph 5.5.

Tensoactivos: surfactantes: Tween 20 Y Span 80 y cosurfactantes: Transcutol y etanol.

El procedimiento fue el mismo para todos los disolventes, Se prepararon tubos debidamente marcados cuyo contenido será de 1mg de extracto vegetal y se fueron agregando de 100µL en 100µL del disolvente hasta que el extracto quedara completamente disuelto y se observara translucido el líquido dentro del tubo.

9.5.2. Diagrama de fase ternario

Con ayuda del Software ProSim realizamos un diagrama de tres dimensiones o diagrama de fase ternario, el cual representa gráficamente en un triángulo equilátero la mezcla de tres componentes, específicamente para nuestro proyecto son; fase oleosa (FO Tensoactivos (TS) y fase acuosa (FA) representadas de manera porcentual. La función principal del uso de este diagrama fue conocer los puntos de fusión de la composición de nuestra microemulsión.

9.6. Elaboración de microemulsión base gel y microemulsión base gel con extracto de *G. glauca*.

Una vez realizados estos ensayos y elaborado un diagrama ternario se probaron algunas formulaciones hasta llegar a la microemulsión que presentara la mejor condición.

Se realizó la microemulsión con una concentración de 2:7:1 de fase oleosa, tensoactivos y fase acuosa respectivamente.

Para gelificar se utilizó Carbopol al 1.5% disolviendo con ayuda de un Vórtex y espátula, dejando reposar el gel 24 horas antes de realizar las siguientes pruebas.

Por último, a una parte del gel se agregó el extracto liofilizado de *G. glauca* al 15% (150mg/ml).

9.6.1. Ensayo de viscosidad

La viscosidad es una propiedad física muy importante que caracteriza la resistencia para ciertos fluidos, la viscosidad es constante y solo depende de la temperatura y presión.

La viscosidad de la microemulsión base gel y la microemulsión base gel más el extracto añadido fue medida con ayuda de un viscosímetro Brookfield (Mod. DV3T)

9.6.2. Medición del tamaño de gota

El tamaño de gota se midió en la microemulsión y en la microemulsión con el extracto, con ayuda de un equipo Zetasizer Nano ZS que es un eficiente analizador de tamaño de partículas.

9.7. Ensayo de actividad antiinflamatoria *in vivo* utilizando la microemulsión base gel con extractos de *G. glauca*.

El ensayo de edema inducido con 12-*O*-tetradecanoilforbol acetato (TPA) se realizó la metodología descrita por Rao *et al.*, (1993) modificada y de la misma manera descrita anteriormente, pero utilizando la microemulsión base gel y la microemulsión base gel con extractos de *G. glauca*.

9.8. Elaboración de gel hidroalcohólico puro y gel hidroalcohólico con extracto de *G. glauca*.

Para la elaboración del gel hidroalcohólico consideramos los siguientes módulos: Líquido a gelificar, polímero gelificante y base neutralizante o acidificante en caso de que la

gelificación dependa del pH, electrolitos y agitación. La correcta formulación nos dará como resultado la buena estabilidad del gel.

Para la elección de los excipientes comprobamos que estuvieran de acuerdo a lo recomendado por el manual de excipientes farmacéuticos, mientras que las concentraciones del extracto antiinflamatorio se decidieron con base en la respuesta antiinflamatoria previamente reportada y corroborada en los ensayos mencionados anteriormente.

Mezcla 1: Se midieron los componentes a usar, en un tubo de cristal de 10ml se agregó 2.5ml de agua destilada y 0.5ml de glicerina, se mezclaron con una espátula

Mezcla 2: En un mortero se pesaron y colocaron 1.5g de extracto y se disolvieron con 7 ml de etanol.

Las dos mezclas se unieron en el mortero eliminando cualquier grumo o resto de extracto, para finalizar se agregó Carbopol al 1.5% esto es 0.15g en 10ml. Para finalizar se utilizó trietanolamina (TEA) y con apoyo de un potenciómetro se equilibró en pH a 5.5, que se sugiere recomendado para uso tópico.

9.9. Ensayo de actividad antiinflamatoria *in vivo* utilizando el gel hidroalcohólico con extractos de *G. glauca*.

Este ensayo de edema inducido con 12-*O*-tetradecanoilforbol acetato (TPA) se realizó la metodología descrita por Rao *et al.*, (1993) modificada y de la misma manera descrita anteriormente, pero con el gel hidroalcohólico y el gel hidroalcohólico con extractos de *G. glauca*.

10. RESULTADOS

Los extractos liofilizados de *G. glauca* se utilizaron en los ensayos y formulaciones antes mencionadas.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos.

10.1. Espectro de CG-Masas del extracto etanólico de hojas de *G. glauca*

Con el extracto de *G. glauca* liofilizado se logró obtener el espectro de CG-Masas e identificar en el extracto derivados de ésteres etílicos del ácido palmítico y α -linolénico (un omega-3), así como de la vitamina E. Se identificó la presencia de ácidos grasos en el extracto etanólico de hojas de *G. glauca* que poseen actividad antiinflamatoria reportada en diversos modelos farmacológicos, que involucran los mecanismos de inhibición de IL-1 β , IL-8 y óxido nítrico sintasa (Seed *et al.* 2012). La vitamina E también posee acción antiinflamatoria conocida (Tahan *et al.* 2011). Estas evidencias soportan el uso de un extracto de *G. glauca* en una formulación tópica antiinflamatoria.

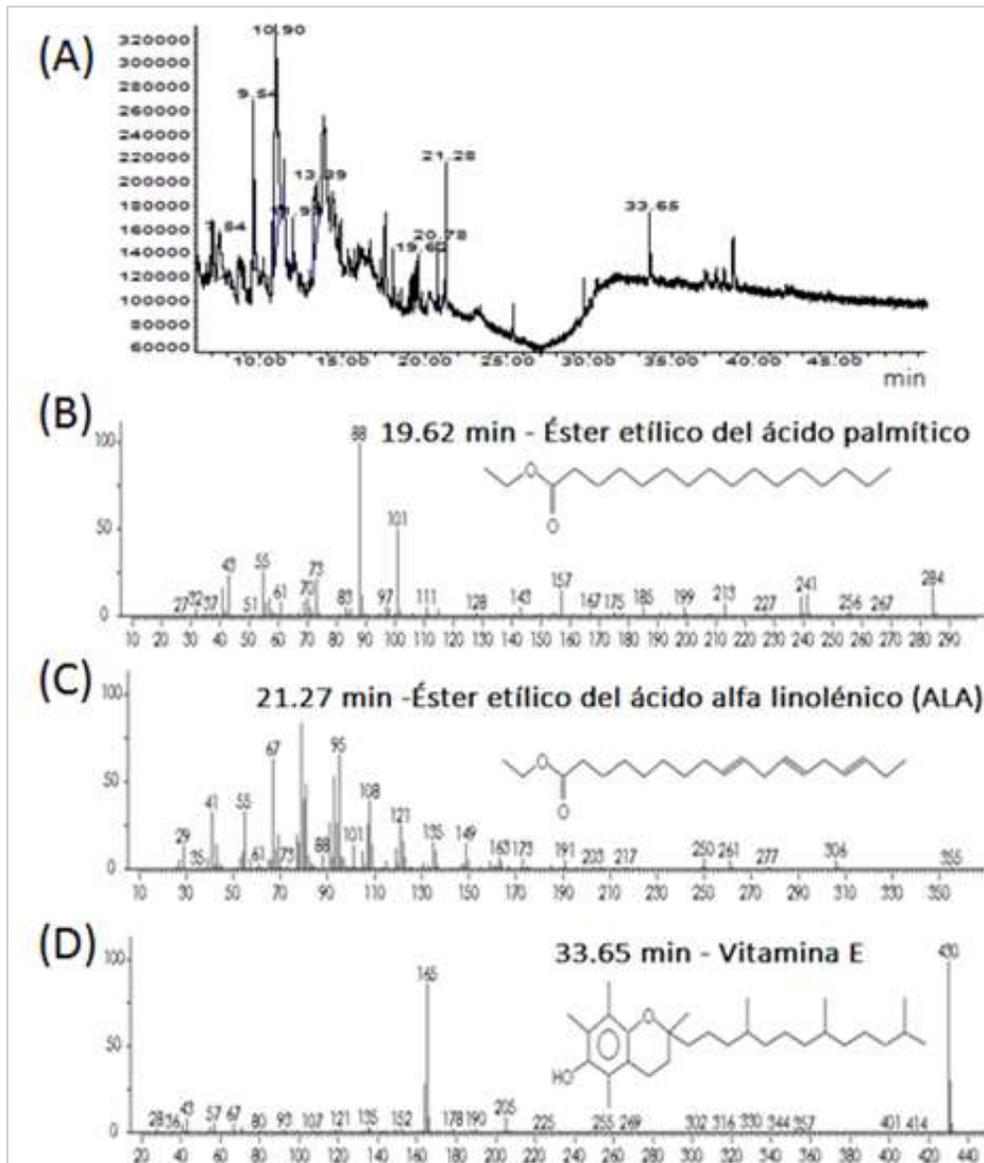


Figura 10. Espectro de CG-Masas (A) y análisis de componentes (B, C Y D) del extracto de *G. glauca*. En la siguiente imagen representativa del Cromatograma Gases Masas (CG-MS) se Identifican derivados del ácido palmítico (B), ácido α -linolénico (C) y vitamina E (D).

10.2. Resultados del ensayo de actividad antiinflamatoria *in vivo* utilizando una suspensión líquida etanólica con extractos de *G. glauca*.

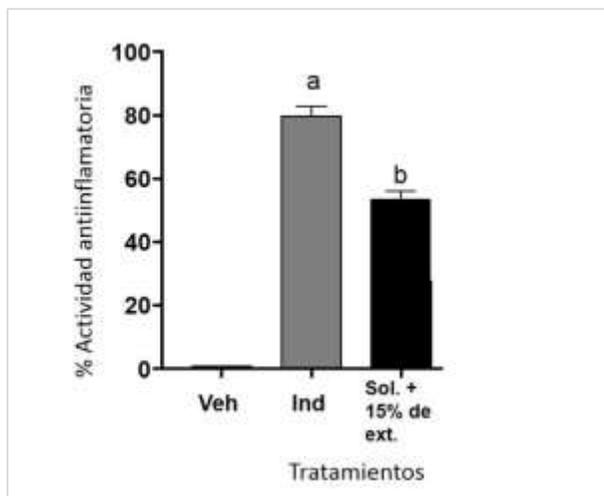


Figura 11. Efecto antiinflamatorio de una suspensión líquida etanólica adicionada con extracto de *Galphimia glauca*. La presente grafica que muestra el efecto de la suspensión líquida etanólica (Susp. +15% de ext.) en la prueba de inflamación inducida por TPA descrito de manera porcentual. Cada punto representa una n=5. Ind: indometacina (1 mg/oreja); ANOVA de una vía seguida de prueba de Dunnett con respecto al Vehículo (Veh) * $P < 0.05$.

10.3. Elaboración de microemulsión base gel con actividad antiinflamatoria

10.3.1. Ensayo de solubilidad del extracto de hojas de *G. glauca*

Para todos los disolventes se utilizó 1mg del extracto etanólico liofilizado y se fueron añadiendo desde 100 μ l hasta 5ml en algunos casos.

Los resultados muestran que en algunos casos el extracto no solubilizo por ello se decidió utilizar como fase oleosa Isopropil palmitato, como tensoactivos Transcutol y Tween 20 y como fase acuosa H₂O a pH 5.5.

FASE OLEOSA	Miristato Isopropil	Isopropil Palmitato	Aceite de ricino	Ácido oleico puro
	Se usaron hasta 5ml. Sí solubilizó	Se usaron hasta 5ml. Sí solubilizo	Se usaron hasta 5ml. no solubilizó	Se usaron hasta 5ml. no solubilizó
FASE ACUOSA	H₂O	H₂O Ph 5.5		
	Se usaron hasta 600 µl. Sí solubilizó	Se usaron hasta 500 µl. SÍ solubilizó		
COSULFACTANTE	Transcutol	Etanol		
	Se usaron hasta 400 µl. Sí solubilizó	Se usaron hasta 400µl. Sí solubilizó		
SULFACTANTE	TWEEN 20	Span 80		
	Se usaron hasta 300 µl. SÍ solubilizó	Se usaron hasta 300 µl y SÍ solubilizó		

10.3.2. Diagrama de fase ternario para la elaboración de la microemulsión base gel

Se realizó un diagrama de fase ternario en el cual se ubicó la zona óptima en donde se forma la microemulsión. Se probaron varios puntos hasta encontrar la formulación en la cual se homogenizaban las tres fases, la cual fue 1:2:7.

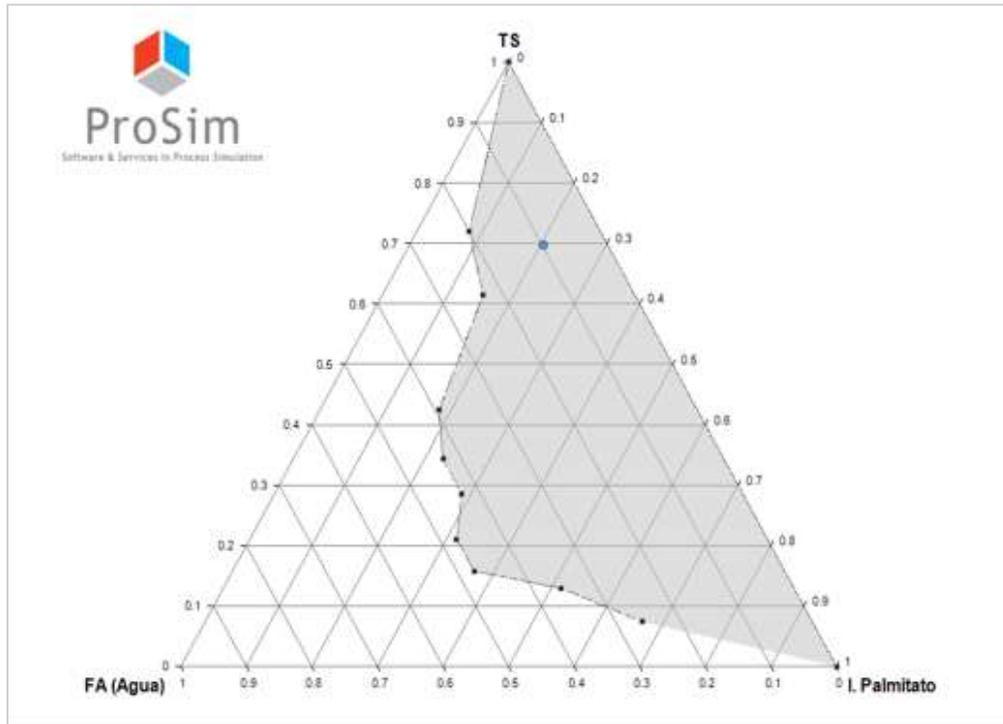


Figura 12. Diagrama de fase ternario. En el siguiente diagrama se muestra la curva de miscibilidad, de color gris las probables regiones de microemulsión y en un punto azul la fórmula utilizada para la elaboración de nuestra microemulsión.

TS: Tensoactivos (Tween 20 Y Span 80), FA: Fase acuosa (Agua a pH 5.5), FO: Fase oleosa (Isopropil palmitato)

10.3.3. Viscosidad de la microemulsión base gel

Con ayuda de un viscosímetro rotatorio se logró determinar la viscosidad de la microemulsión con 1.5% de Carbopol añadido, la cual fue de 1,722 cps sin el extracto; y de

1,594 cps para la microemulsión con extracto; al 15%. Estos rangos están dentro de lo ideal para una microemulsion base gel.

10.3.4. Tamaño de gota

Como anteriormente se mencionó, el tamaño de gota fue medido con la ayuda de un equipo Zetasizer Nano ZS, el cual nos dio como resultados los que se muestran en las figuras 13 y 14 para la microemulsion base gel y la microemulsion base gel con extracto de *G. glauca* (15%) con un tamaño promedio de gota es de 158.1 nm y 156.4 nm respectivamente, el cual entra en un buen rango respecto al tamaño esperado para una microemulsion base gel (10-200nm). Considerando estos resultados podríamos decir que las emulsiones presentan una buena permeabilidad cutánea.

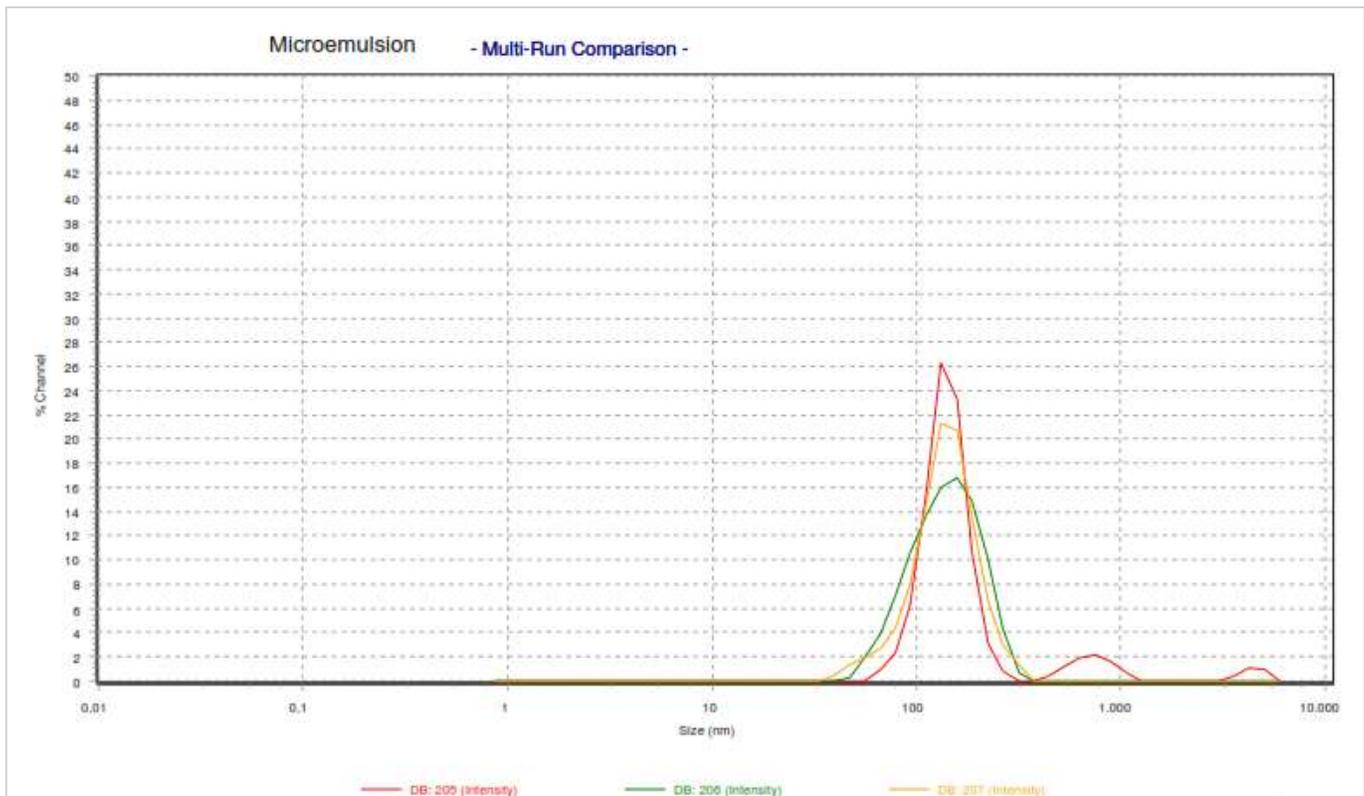


Figura 13. Tamaño de gota de la microemulsión base gel. Gráfica en la cual se muestra el rango aproximado en 10 percentiles con respecto al tamaño de gota en nm para la microemulsión base gel. Utilizando un equipo Zetasizer Nano ZS.

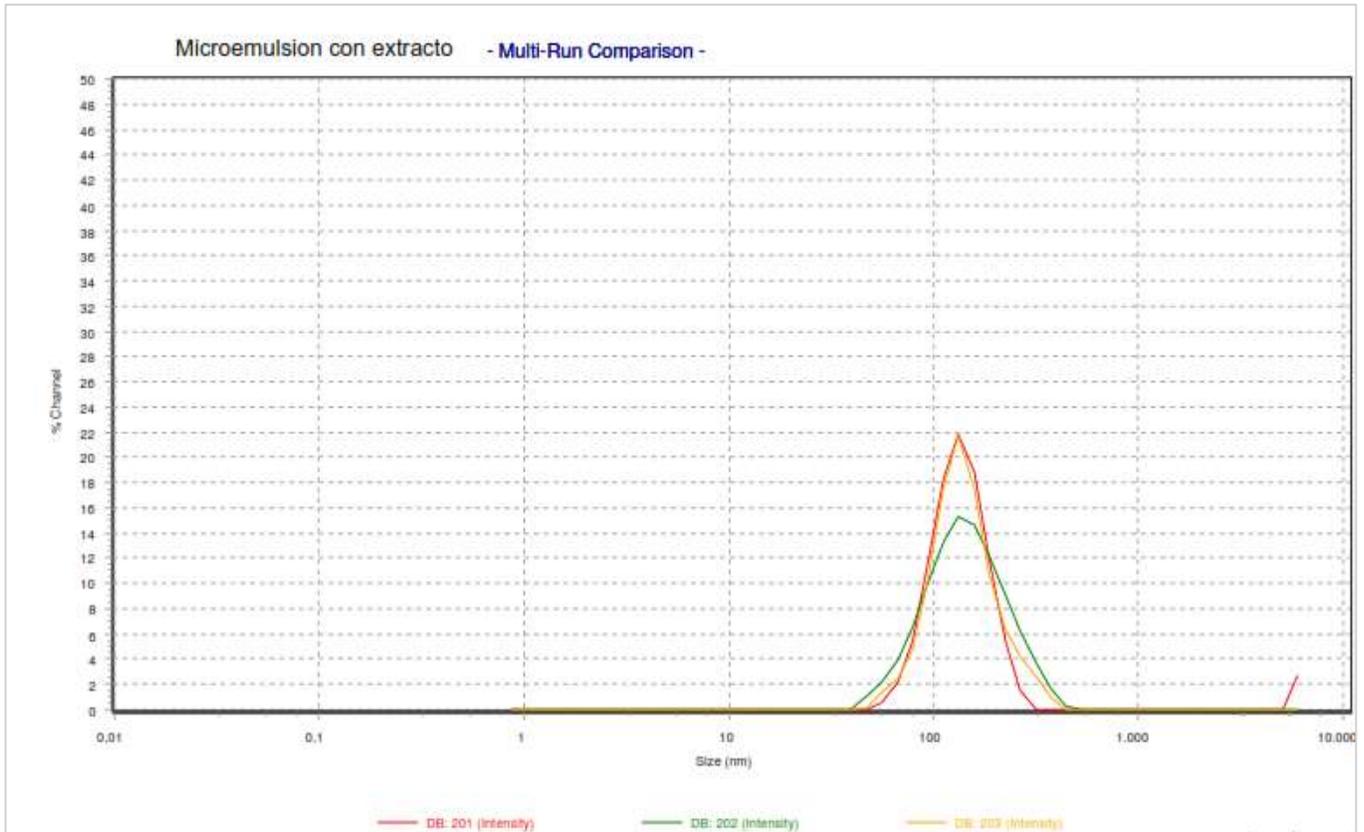


Figura 14. Tamaño de gota de la microemulsión base gel más extracto de *Galphimia glauca* al 15%. Gráfica en la cual se muestra el rango aproximado en 10 percentiles con respecto al tamaño de gota en nm para la microemulsión base gel con extracto *G. glauca* al 15%. Utilizando un equipo Zetasizer Nano ZS

10.4. Actividad antiinflamatoria *in vivo* utilizando la microemulsión base gel con extracto de *G. glauca*

Se realizaron los ensayos de actividad antiinflamatoria utilizando la microemulsión base gel más extracto de *G. glauca* al 1%, 10% y 15% y como control la microemulsión base gel.

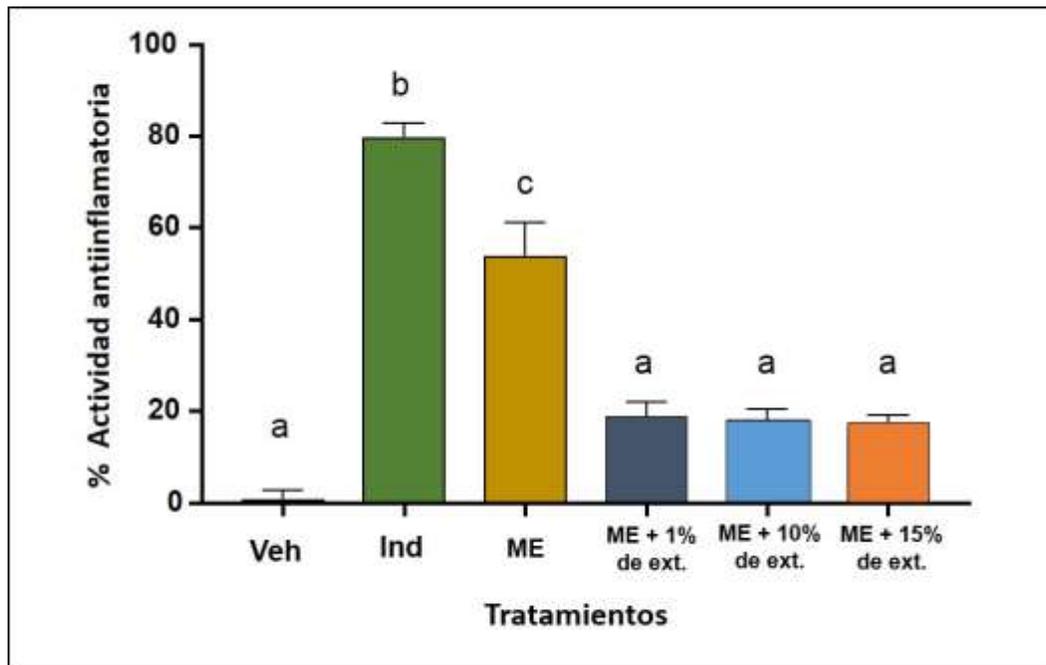


Figura 15. Efecto antiinflamatorio de una microemulsión base gel adicionada con extracto de *Galphimia glauca*. La presente gráfica muestra el efecto de una microemulsión base gel adicionada con extracto de *G. Glauca* en porcentajes de 1%, 10% y 15%. Como controles se usaron el vehículo puro (Veh), Indometacina (Ind) 1 mg/oreja y la microemulsión base gel (ME). El ensayo es una prueba de inflamación inducida por TPA descrito de manera porcentual. Cada punto representa una $n=5$. ANOVA de una vía seguida de prueba de Dunnet con respecto al Vehículo (Veh), * $P < 0.05$.

Se demostró que la microemulsión por si sola presentaba actividad antiinflamatoria un poco mayor a la de la microemulsión mas el extracto a las diferentes concentraciones, esto pudiera explicarse porque al ser una microemulsion la piel es muy sensible a sus componentes, por ejemplo, el Transcutol tiene la capacidad de dilatar los poros de la piel;

y en segundo lugar porque el formulado contiene Isopropil palmitato el cual tiene actividad antiinflamatoria registrada.

Teniendo en cuenta los resultados que se obtuvieron nos planteamos evaluar lo siguiente:

1.- Se evaluó la microemulsión base gel con indometacina al 1% y 10% para dilucidar si el bajo efecto antiinflamatorio era por esta diferencia de concentración. (Figura 16) donde se mostró que la Indometacina reduce su actividad antiinflamatoria considerablemente.

2. Se evaluó otro vehículo que fue un gel hidroalcohólico con extracto al 15% (Figura 17)

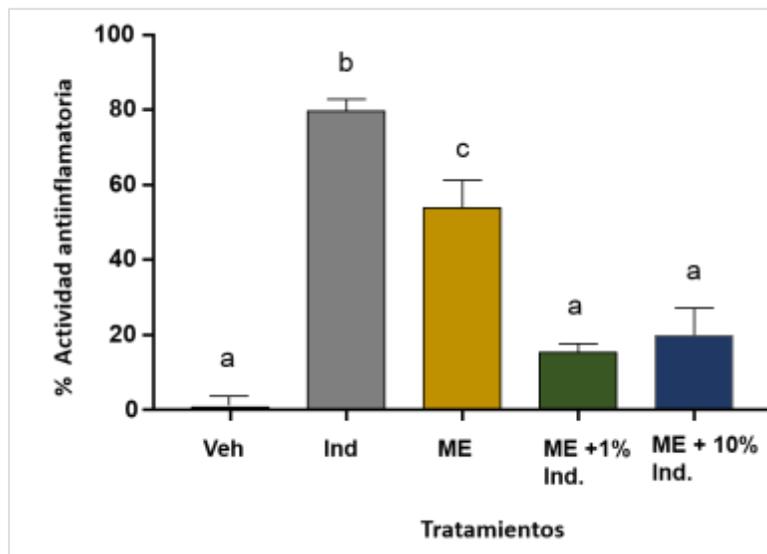


Figura 16. Efecto antiinflamatorio de una microemulsion base gel adicionada con indometacina.

La presente grafica muestra el efecto de una microemulsión base gel adicionada con indometacina a 1% y 10%. Como controles se usaron el vehículo puro (Veh), Indometacina (Ind) 1 mg/oreja, y la microemulsión base gel (ME). El ensayo es una prueba de inflamación inducida por TPA descrito de manera porcentual. Cada punto representa una n=5 con un ANOVA de una vía seguida de prueba de Dunnet con respecto al Vehículo * $P < 0.05$.

10.5. Actividad antiinflamatoria *in vivo* utilizando el gel hidroalcohólico con extractos de *G. glauca*.

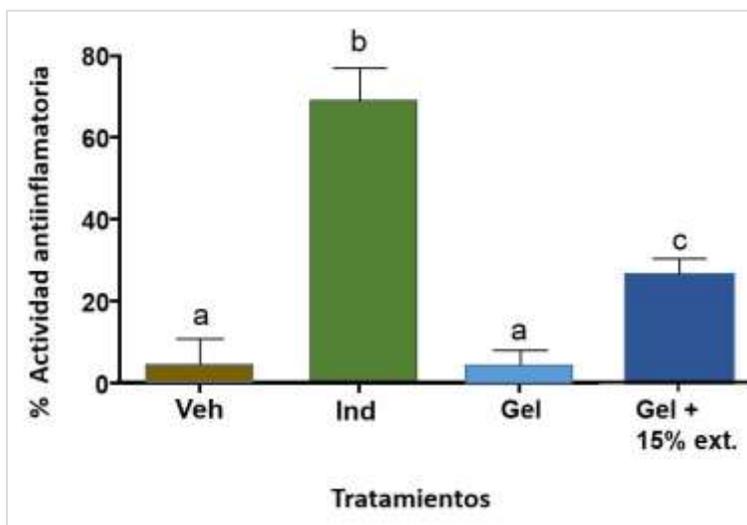


Figura 17. Efecto antiinflamatorio de un gel hidroalcohólico adicionado con extracto de *Galphimia glauca* al 15%. La presente gráfica muestra el efecto antiinflamatorio de un gel hidroalcohólico adicionado con 15% (150mg/ml) de extracto de *G. glauca*. Como controles se usaron el vehículo puro (Veh), Indometacina (Ind) 1 mg/oreja, y el gel hidroalcohólico. (gel). El ensayo es una prueba de inflamación inducida por TPA descrito de manera porcentual. Cada punto representa una n=5 con un ANOVA de una vía seguida de prueba de Dunnet con respecto al Vehículo (Veh) * $P < 0.05$.

El gel hidroalcohólico con extracto de *G. glauca* presenta una actividad antiinflamatoria un tanto mayor en relación a la de la microemulsión base gel y a la del gel sin extracto, sin embargo, esta actividad aun es menor comparada con la de la solución etanólica con extracto.

10.6. Investigación de mercado de un aerosol con actividad antiinflamatoria elaborado a partir de extractos de *Galphimia glauca*.

En base a los resultados obtenidos nos hemos planteado la siguiente investigación de mercado, tomando como producto un aerosol y proponiendo en su forma líquida el extracto de *Galphimia glauca* previamente evaluado.

A partir de la necesidad de conocer el mercado actual y posible aceptación de este producto realizamos la siguiente investigación de mercado.

Objetivo

Evaluar la aceptación de un aerosol antiinflamatorio de origen natural elaborado a partir de extractos de *G. glauca* y su mercado potencial.

Metodología

Esta es una investigación de metodología mixta la cual dividimos en tres partes:

- 1.-Gastos de producción;
- 2.- Productos como posibles competidores en el mercado actual;
- 3.-Encuestas a posibles consumidores de diferentes edades.

Antecedentes

Actualmente el campo exploratorio hacia los productos naturales ha ido en aumento, al buscar alternativas novedosas y naturales para el alivio de ciertos padecimientos a nivel mundial.

México es uno de los países con mayor diversidad de especies de plantas medicinales, una de ellas es la especie *Galphimia glauca*, la cual durante muchos años ha sido popularmente empelada en la medicina tradicional para el tratamiento de diversos padecimientos uno ellos de gran importancia es la inflamación. El conocimiento con el cual se cuenta hoy en día sobre el uso de plantas medicinales es muy antiguo y se ha conservado durante muchas generaciones, gracias a la experimentación se puede validar el conocimiento etnomédico y

hacer uso para la elaboración de productos novedosos con eficacia comprobable. Otro aspecto importante a considerar es la cuestión económica, ya que se pretende que la atención a la salud de la población tenga una amplia cobertura. En este sentido los aerosoles representan una alternativa interesante, ya que poseen medidas de seguridad y sustentabilidad correctas, por lo que prometen ser excelentes vehículos.

Evaluación aproximada de gastos de producción.

Considerando que el producto aún se encuentra en un planteamiento teórico de investigación, algunos gastos tienden a ser aproximados. En el mismo sentido, se visualizan algunos proveedores potenciales

Tabla 6. Costos materia prima y empaque por unidad

Material	Cantidad	Proveedor	Costo aproximado
Extracto seco	1.5 g /10ml	Cultivo propio	\$20
Etanol	10 ml	SILEII™	\$0.70
Envase	1	Propysol S.A.de C.V.	\$10.6
Gas propelente	-	Propysol S.A.de C.V.	*Después de pruebas de campo
Etiqueta	1	INTERLABEL	*Dependiente del diseño
Empaque	1	INTERLABEL	*Dependiente del diseño

Gastos directos

Los gastos directos involucran el costo de la fuerza laboral, como personal en línea, control de calidad, energía y transporte. Estos no son contables para una primera unidad piloto, pero sí en un futuro para un volumen considerable de producto.

Gastos indirectos

Costo de comercialización del producto, gastos de administración atribuibles a la producción y venta (infraestructura, almacenaje, agua, luz, administración, impuestos, registro sanitario etc.).

Posibles competidores en el mercado actual

Nombre: Acheflan aerosol

Función: antiinflamatoria

Principio activo: Aceite esencial de *Cordia verbenaceae*

Precio: \$361 pesos

Distribuidores: Farmacias del Ahorro, Chedraui y Walmart



Figura 18. Acheflan

Nombre: Physiorelax

Función: Antiinflamatoria

Principio activo: extractos de: Árnica, (*Árnica montana*), Harpagofito (*Harpagophytum procumbens*), Caléndula (*Caléndula officinalis*), Menta (*Mentha arvensis*), Hipérico (*Hypericum perforatum*), Rosa mosqueta (*Rosa rubiginosa*) y Centella asiática (*Centella asiatica*)

Precio: \$187 pesos

Distribuidores: Dos Farmasho on line



Figura 19. Physiorelax

Resultados de encuestas a posibles consumidores

Con ayuda de la aplicación SurveyMonkey® se realizaron 100 encuestas de 9 preguntas a personas de diferentes edades para conocer su aceptación y opinión ante un producto en aerosol de origen natural, elaborado con extractos de *G. glauca* (Calderona amarilla) (Árnica roja). Los resultados se muestran en las siguientes gráficas.

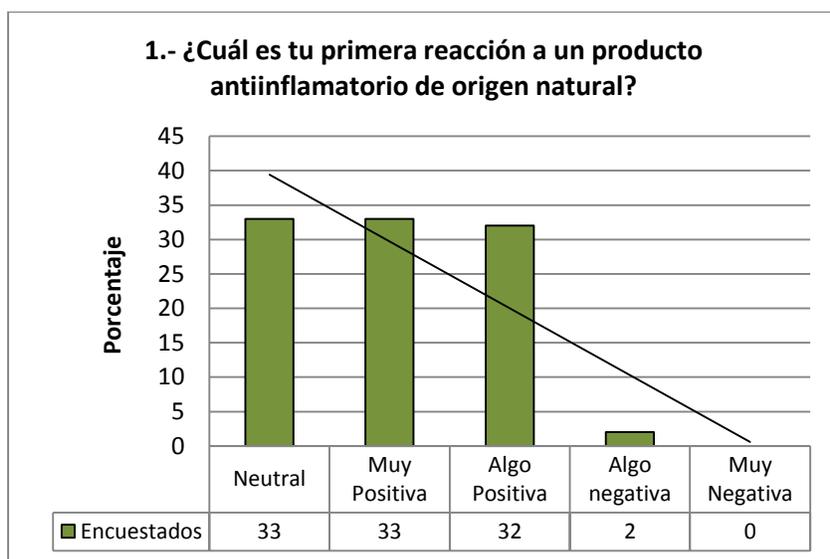


Figura 20. Pregunta 1 y las respuestas correspondientes. Se muestran 5 posibles respuestas y el rango de porcentaje a cada una de éstas.

En esta primera pregunta se pretendió partir de lo general a lo particular, empezando por conocer el pensamiento del encuestado referente a los productos antiinflamatorios de origen natural.

Observamos en particular que las respuestas son en su mayoría de algo positiva a muy positiva y neutral, dejando muy por debajo respuestas que muestren reacciones negativas, esto nos hace pensar que entre los encuestados hay una reacción generalmente positiva ante un producto antiinflamatorio de origen natural.

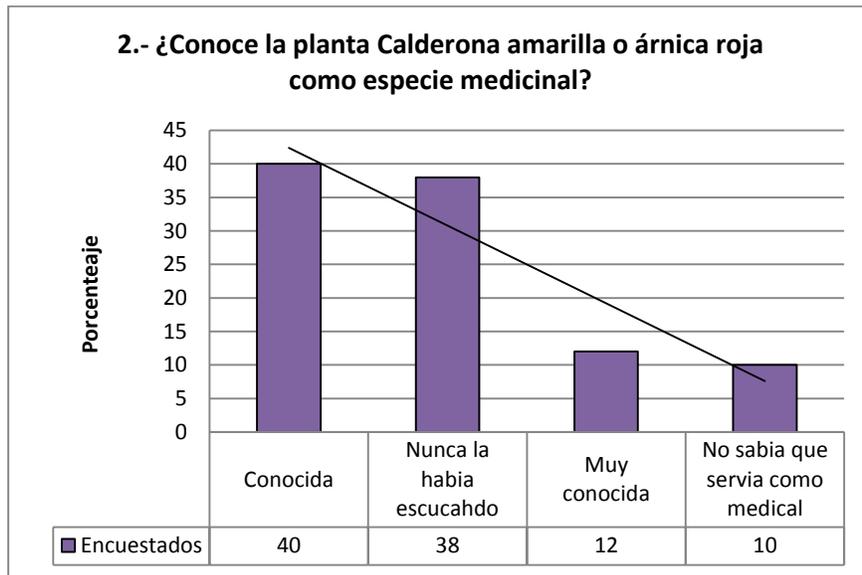


Figura 21. Pregunta 2 y las respuestas correspondientes. Se muestran 4 posibles respuestas y el rango de porcentaje de cada una de éstas.

Esta pregunta fue planteada con la idea de introducir a los encuestados al conocimiento de las plantas medicinales, y en específico para saber el rango de conocimiento que tienen acerca de la planta medicinal que usamos en este proyecto que es *G. glauca*, mencionándola por los dos nombres más comunes que son Calderona amarilla y árnica roja.

En cuanto a las respuestas obtenidas 40 personas nos indicaron que se les hace conocida la planta, pero 38 indicaron que nunca la habían escuchado, 12 muy conocida y 10 no sabían que servía como planta medicinal.

Tomando en cuenta estas respuestas nos damos cuenta que falta difusión de la especie como planta medicinal para crear la confianza de adquirir un producto elaborado a partir de la misma, aun así, el que sea conocida por casi la mitad de las personas es un buen inicio para posteriores proyectos y productos.

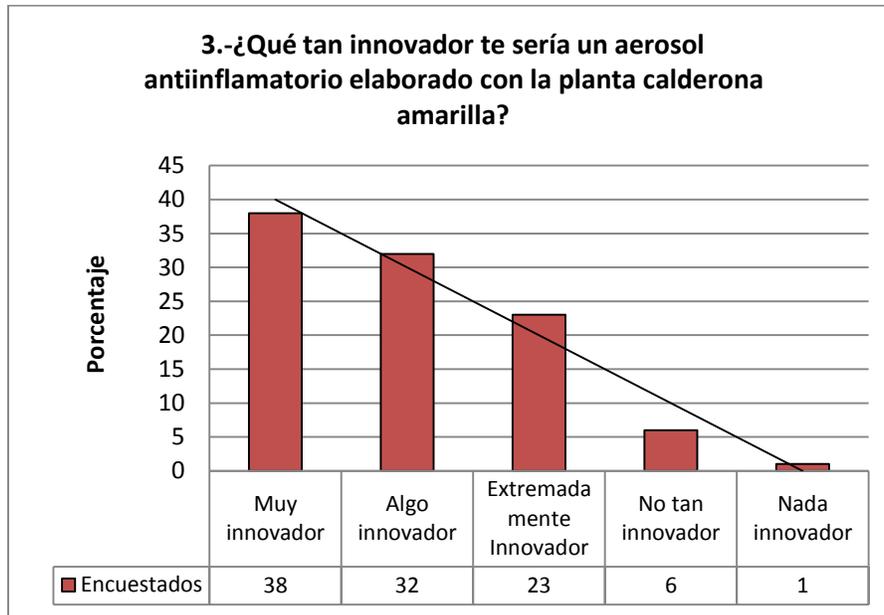


Figura 22. Pregunta 3 y las respuestas correspondientes. Se muestran 5 posibles respuestas y el rango de porcentaje a cada una de éstas.

En esta pregunta se menciona un aerosol como producto portador de los compuestos antiinflamatorios, con la finalidad de conocer cuál sería la aceptación y si es novedoso un producto antiinflamatorio de este tipo.

Para los encuestados el producto es en su mayoría Muy innovador, seguido de Algo innovador y con 23 respuestas Extremadamente innovador. Las respuestas menores fueron no tan innovador (6) y nada innovador (1). Para la mayoría el producto sería innovador en menor o mayor escala. La novedad en un producto es muy importante al momento de querer protegerlo legalmente haciendo uso de la patentabilidad y al querer comercializarlo a pequeña o grande escala ya que se ve favorecida la compra en el mercado y esto asegura la ganancia y permanencia.

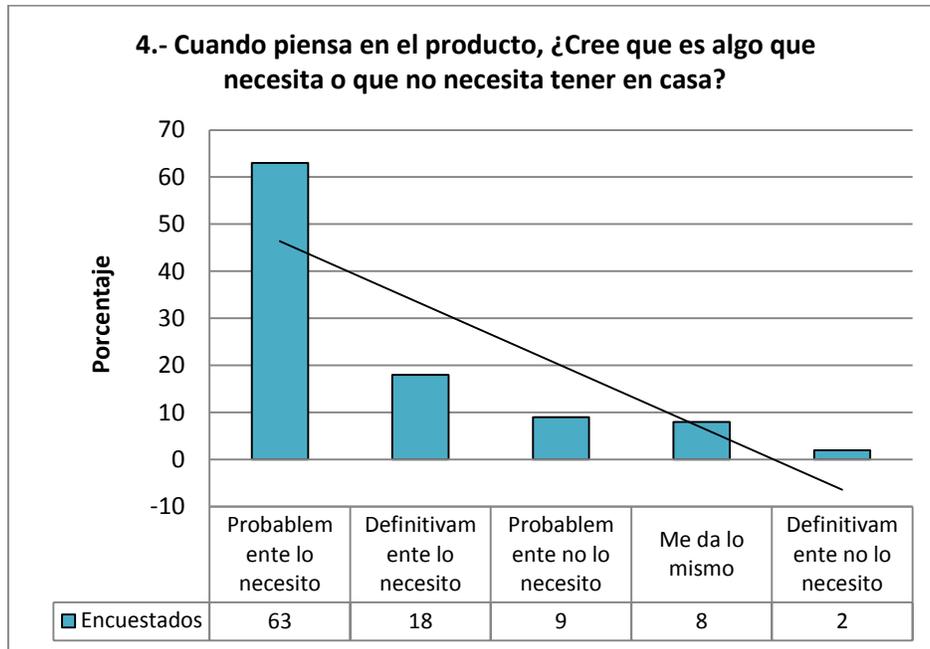


Figura 23. Pregunta 4 y las respuestas correspondientes. Se muestran 5 posibles respuestas y el rango de porcentaje a cada una de éstas.

Esta pregunta es para saber si las personas comprarían el producto antiinflamatorio y si consideran que es importante tenerlo en sus hogares.

Las respuestas indicaron que existe la probabilidad de que los encuestados necesiten el producto en su hogar, pero no es determinadamente necesario tenerlo, tal vez sería un producto más específico para personas con definidas enfermedades antiinflamatorias o personas dedicadas al deporte.

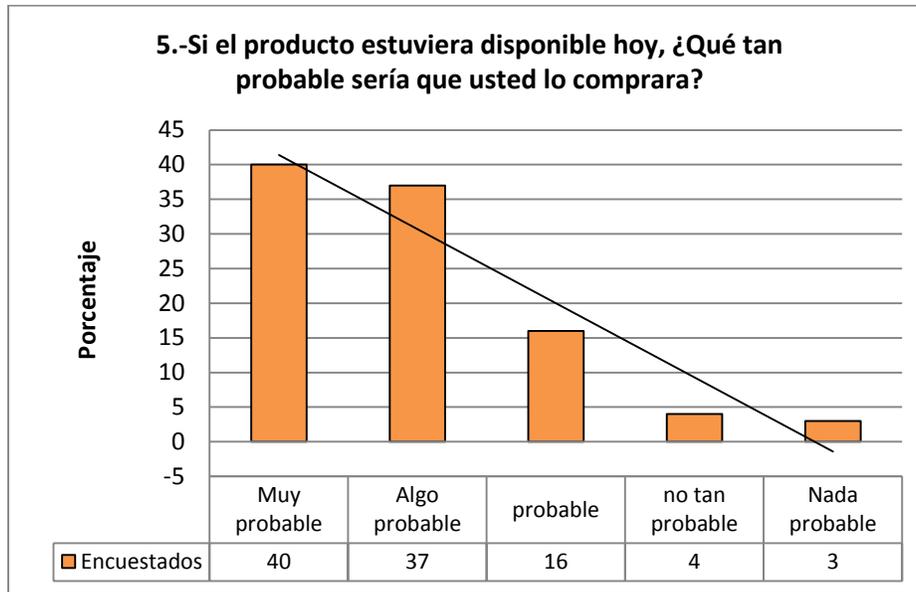


Figura 24. Pregunta 5 y las respuestas correspondientes. Se muestran 5 posibles respuestas y el rango de porcentaje a cada una de éstas.

Esta es una pregunta que al igual que la anterior nos da un indicativo para saber si las personas adquirirían el producto si ya estuviera disponible en el mercado actual.

En cuanto a las respuestas podemos observar que la mayoría de las personas indicaron como muy probable y probable la compra del producto, esto podría mostrarnos que, si bien no es un producto definitivamente necesario tenerlo en casa, si es un producto que en caso de necesitarlo se compraría, posiblemente compitiendo con los productos antiinflamatorios de origen no natural.

Tomando en cuenta la novedad del envase, la efectividad y el origen natural sería un buen competidor una vez realizadas las pruebas y registros correspondientes.

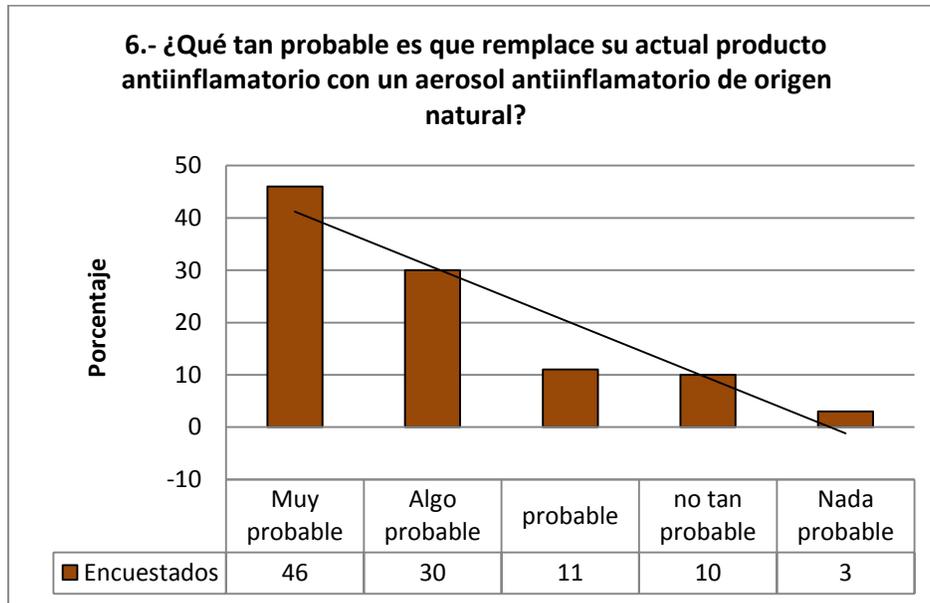


Figura 25. Pregunta 6 y las respuestas correspondientes. Se muestran 5 posibles respuestas y el rango de porcentaje a cada una de éstas.

Esta pregunta fue descrita para darnos un indicativo de competitividad ante los productos que ya se encuentran en el mercado actual y la probabilidad de que se replacen estos productos por un aerosol antiinflamatorio de origen natural.

En cuanto a las respuestas la mayoría indican Algo probable y Muy probable, seguidas de Probable, No tan probable y nada probable. Esto es una ventaja ya que nuestro producto dependiendo de otros factores podría ser un buen competidor en el mercado actual.

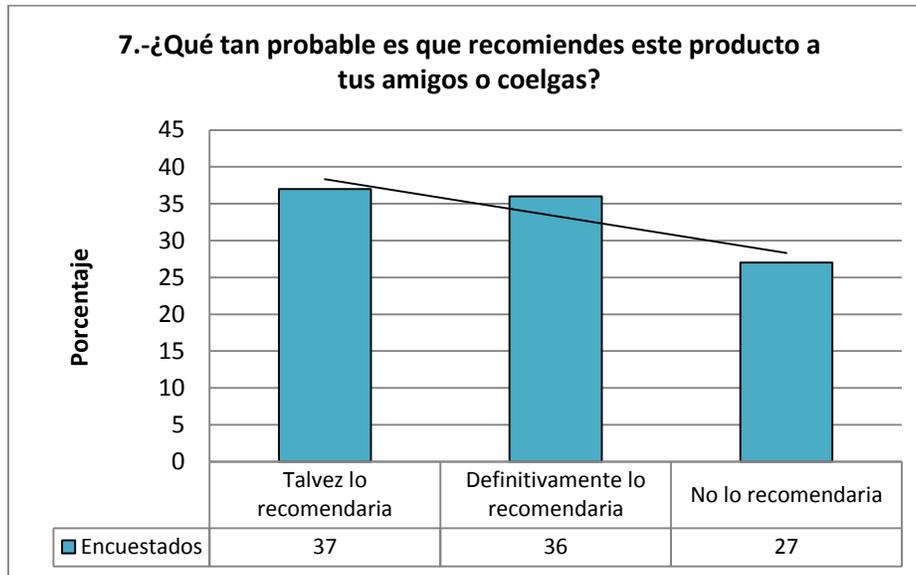


Figura 26. Pregunta 7 y las respuestas correspondientes. Se muestran 3 posibles respuestas y el rango de porcentaje a cada una de éstas.

Esta pregunta fue planteada para saber si las personas estarían interesadas no solo adquirir el aerosol antiinflamatorio sino también en recomendarlo para generar una exitosa difusión, lo cual es vital para cualquier producto recién salido al mercado.

Las respuestas que se recibieron fueron porcentajes muy parecidos, entre las personas que Tal vez lo recomendarían, Definitivamente lo recomendarían y No lo recomendarían. Esto podría ser porque necesitan tener el producto y probar su eficacia antes de poderlo recomendarlo.

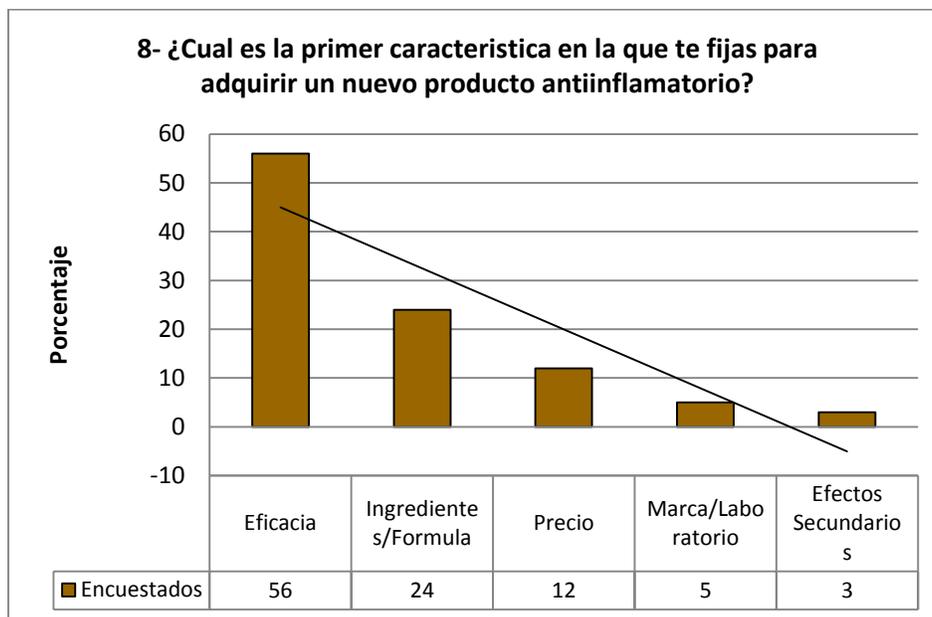


Figura 27. Pregunta 8 y las respuestas correspondientes. Se muestran 5 posibles respuestas y el rango de porcentaje a cada una de éstas.

Esta pregunta es de suma importancia a la hora de realización del producto, ya que nos indica cual es la característica principal en la que el cliente fija y que es lo más importante que el producto debería tener para ser adquirido.

Por mucho la respuesta de más porcentaje fue en la cual se indica que lo mas importante es la eficacia, posterior los ingredientes usados o la formula, el precio del producto y al final algún efecto secundario. Aunque sabemos que todas estas características son de suma importancia al momento de elaborar un producto sin duda alguna la mayoría de nuestros encuestados toman más en cuenta la eficacia en un producto de este tipo

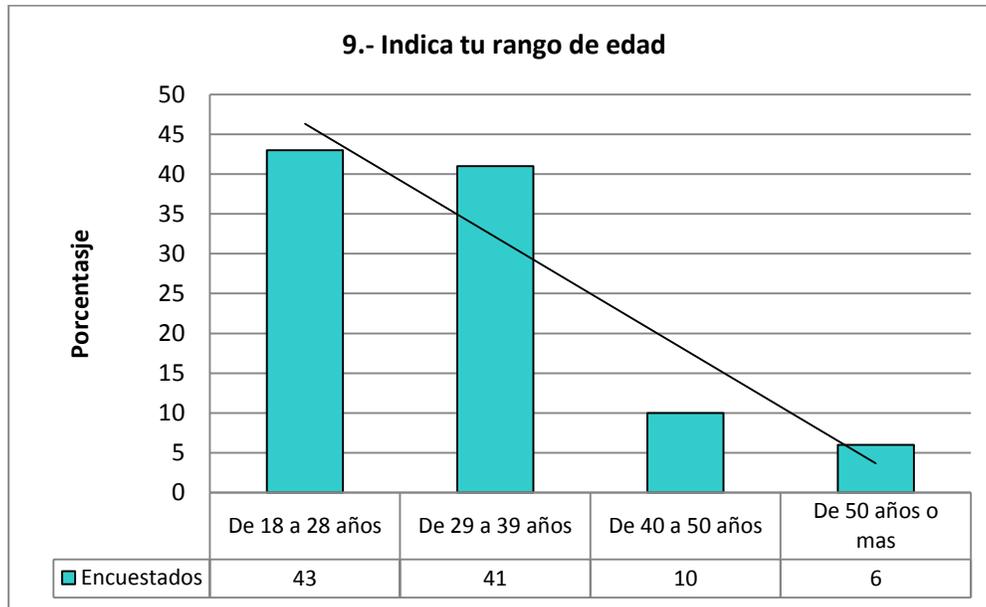


Figura 28. Pregunta 9 y las respuestas correspondientes. Se muestran 4 posibles respuestas y el rango de porcentaje a cada una de éstas.

En esta última pregunta consultamos el rango de edad de nuestros encuestados para tener una relación entre las respuestas obtenidas y el posible público al cual podemos dirigir el producto.

La mayoría de las personas que respondieron la encuesta están en un rango de edad de entre 18 y 39 años, es un buen rango de edad ya que nos indica una edad madura laboralmente en la que pueden disponer sin problema del producto y recomendarlo de acuerdo a su funcionalidad.

11. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Suspensión etanólica antiinflamatoria

La suspensión tópica antiinflamatoria elaborada con extractos de *G. glauca* presentó una considerable actividad antiinflamatoria, entre el 50 y 55%, comparable por lo reportado en 2012 por Sharma. Esta puede ser usada para crear un remedio herbolario, como un aerosol tópico que es ideal para superficies pilosas.

Microemulsión base gel antiinflamatoria

La microemulsión base gel antiinflamatoria sugería un buen vehículo para el transporte del principio activo a través de la piel, así como un novedoso formulado, sin embargo, no fue lo que se esperaba. Por si sola la microemulsión presenta actividad antiinflamatoria, pero al unirse con algún fármaco como la indometacina o el extracto de *G. glauca* esta actividad se pierde.

Gel hidroalcohólico con actividad antiinflamatoria

El gel hidroalcohólico también presenta una baja actividad antiinflamatoria en comparación con la solución etanólica líquida, con lo reportado por Sharma en 2012.

Una vez analizados los anteriores resultados se podría pensar en algunos factores que pudieran estar impidiendo la actividad antiinflamatoria:

En cuanto a los posibles factores de inhibición de actividad antiinflamatoria, el grado de hidratación del estrato corneo de la piel podría ser un factor, ya que, si aumenta el contenido de agua la permeabilidad del extracto y por tanto del principio activo es mayor, cuando el nivel de hidratación es menor al 10% se considera que la queratina está deshidratada, se produce descamación en el estrato corneo y se altera la absorción. Nuestra microemulsión tiene poca cantidad de agua, ya que está compuesta de 70% de tensoactivos, 20% de fase oleosa y solo 10% de fase acuosa. Podríamos pensar en replantear la formulación para aumentar la cantidad de agua.

Otro factor podría ser la estabilidad química del extracto al unirse al vehículo. Se podría pensar que el efecto antiinflamatorio tan bajo en la microemulsión se debe a la interacción del extracto con el vehículo ya que el extracto por si solo tiene actividad antiinflamatoria. La sinergia molecular no es muy común, pero, podría considerarse entre las moléculas del vehículo y las del extracto haciendo una reacción de rompimiento de cadenas poliméricas.

Los vehículos tienen la capacidad de provocar efectos terapéuticos intrínsecos, así una base bien seleccionada podrá una acción curativa y otra mal seleccionada podría agravar el

padecimiento, algunos de estos efectos se pueden prevenir y otros simplemente se ensayan para descubrir y reportar nuevo conocimiento.

Tomando en cuenta los resultados, se sugiere como mejor vehículo para nuevas formulaciones la suspensión etanólica líquida, ya que fue la que presentó mayor actividad antiinflamatoria y utilizarla para crear un nuevo vehículo el cual podría ser un aerosol o bien la reformulación de la microemulsión base gel o el gel hidroalcohólico tomando en cuenta las formulaciones ya evaluadas, así como otros modelos de actividad antiinflamatoria.

Investigación de mercado

Con respecto a la evaluación aproximada de gastos de producción, gastos directos e indirectos, nuestro producto muestra ser rentable para la venta en el mercado. Es importante mencionar que no se anexaron algunos gastos importantes como registro sanitario y registro de patente de uso, nombre y producto los cuales se podrían estimar una vez elaborado el producto y testado.

En comparación con los dos productos antiinflamatorios de origen natural encontrados en el mercado podemos describirlo como un buen competidor, ya que hay pocos que se distribuyen en el país y que demuestran eficacia real y precio accesible.

En cuanto a las encuestas de manera general podemos concluir que sería aceptable en personas de 18 a 39 años, las cuales mencionaron que les es innovador a pesar de que no es muy conocida la planta de *G. glauca* como especie medicinal. Se muestra buena aceptación en general por productos de origen natural. Es importante mencionar que para este público es muy importante la eficacia del producto, así como los ingredientes que contiene. Estos resultados sirven como base para la elaboración de productos y futuras encuestas de aceptación.

12. PERSPECTIVAS

- 1.-Realizar una estandarización analítica de extractos de *G. glauca* con actividad antiinflamatoria para ser usados en otras formas farmacéuticas.
- 2.- Realizar otros ensayos de actividad antiinflamatoria en modelos murino y cobayo, así como evaluaciones toxicológicas.
3. Investigar la actividad antiinflamatoria de extractos de otras especies del género *Galphimia* que ocurren en México.
- 4.- Reformular la microemulsion base gel para mejorar la actividad antiinflamatoria al combinarla con los extractos de *G. glauca*.

13. LITERATURA CITADA

- Almdal K., D.J.H. y Kramer, (1993). Polymer Gels and Network, Ed. HSM Ney York , Pag. 1-4.
- Anderson C. (2007). Revisión of *Galphimia* (Malpighiaceae), Contr. University. Michigan Herbario. 25: 1–82.
- Aguilar A., Camacho JR., Chino S., Jacquez P., Lopez ME., (2004). Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Información etnobotánica IMSS México. p.253.
- Avello L., Cisternas f., (2010) Fitoterapia, sus orígenes, Rev. Med. Chile. 138: 1288-1293.
- Bustamante, P. (1993). Emulsiones en Tratado de Farmacia Galénica. Luzán 5. S.A.Ed.. España. p. 1 - 437.
- Camacho M. (1997). Natural products against protozoal diseases. Tesis de doctorado. Facultad de Medicina. Universidad de Londres. p.136.
- Cardoso-Taketa AT, Lozada-Lechuga J, Fragoso-Serrano M, Villarreal ML, Pereda-Miranda R. (2004) Isolation of nor-secofriedelanes from the sedative extracts of *Galphimia glauca*. J. Nat.67: 644-649.

- Cardoso-Taketa AT, Pereda-Miranda R, Choi YH, Verpoorte, Villarreal ML. (2008) Metabolic profiling of the Mexican anxiolytic and sedative plant *Galphimia glauca* using Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Multivariate Data Analysis. *Planta Med.* 74: 1-7.
- Comission, M. British Pharmacopoeia, Ed. Medicine, U.K., 1999
- David, P; Bailey, PJ; Glodenberg, MM; Ford-Hutchinson, AW. The role of the arachidonic acid products in pain and inflammation. *Ann. Rev. Immunol.* 1984; 335
- Diaz JL. (1976). *Uso de las Plantas Medicinales de México*. Instituto Mexicano para el Estudio de las Plantas Medicinales. Editorial Libros de México, México. p.329.
- Dorsch W., Bittinger M., Kaas A., Kreher B.,Wagner H. (1992). Antiasthmatic effect of *Galphimia glauca*, gallic acid and related compounds prevent allergen and bronchial hiperreactivity in guinea pigs. *Journal of International Archives of Allergy and Applied Immunology.* 97(1):1-7.
- Estrada LE. (1985). *Jardín Botánico de Plantas Medicinales Maximino Martínez (1888-1964)* Universidad Autónoma de Chapingo, México.p.15
- Fiehn O. (2002). Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol. Biol.* 48: 155-171.
- Gallin, JI. Inflammation. En: Paul, WE. (Ed.) *Fundamental Immunology*. Raven Press, New York, 1989: 721-733 3.
- Gallin, JI; Goldstein, IM; Snyderman, R. *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*. Raven Press, New York, 1988
- Gómez L., Chong E. (1985). *Conocimiento y Usos de la Flora de Amatlán, Municipio de Tepoztlán, Morelos*. Tesis, Facultad de Ciencias, UNAM. México. p.91.
- Helene, Hågerström. *Polymer Gels Pharmaceutical Dosage Forms Rheological Performance and Phisicochemical Interactions at The Gel-Mucus interfase (2003)* . *Acta universitatis uppsaiensis*, pag. 9-10
- Herráez, M. y Castellano, A. *Formas de Administración sobre la piel y las Mucosas en Tecnología Farmacéutica*. (1997). Ed. Síntesis S.A. España. Vol. II. P.305-345.
- Herrera Arellano A., Jiménez Ferrer E., Zamilpa A., Morales Valdéz M., García Valencia CE., Tortoriello J (2007) .Efficacy and tolerability of a standardized herbal product from *Galphimia glauca* on generalized anxiety disorder. A randomized, double-blind clinical trial controlled with lorazepam. . *Planta Med.* 73 (713-717).
- Insón Nelson, Espinoza Armando, Perilla Jairo *et al.*, Modelamiento del hinchamiento y difusión de solutos en Hidrogeles, *Revista Iberoamericana de polímeros*, (2002) Vol.3, Pags. 39-40
- Ishizaka, K. Most cell activation an mediator release. *Progress in Allergy*, (1984) vol. 34

-Katzung BG. Farmacología básica y clínica. 10° Edición. Mexico, El Manual moderno, (2007), págs. 312-320, 299-308.

-Kohro T, Tanaka T, Murakami T, Wada Y, Aburatani H, Hamakubo T, Kodama T. A (2004) Comparison of differences in the gene expression profiles of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiated THP-1 cells and human monocyte-derived macrophage. *J.f Atheros. and Thrombosis*. 11, No. 2

- Koo, CH; Sherman, JW; Band, L; Goetzl, E. Molecular diversity of human leukocyte receptors. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leucotriene Res.* (1989); 191 (19)

-Larsen, GL; Herison, PM. Mediators of inflammation. *Ann. Rev. Inmunol.* (1983); 335

-Linda Buhse, R.K., Benjamin Westenberger. Topical Drug Clasification. *International Journal of Pharmaceutics* 295, 101-112. (2005)

-L.h. Sperling. Introduction to Physical Polimer Science, Ed. John Wiley, N.Y. 20-27, (1992)

-Male, DK; Champion, B; Cooke, A; Owen, M. Cell troffic and inflammation. En: *Advance Immunology*. 2ª ed. Ed Gower London-New York (1991)

-Martínez Beltrán, M. Valoración de la lesión medular traumática mediante espectroscopia de RMN de protones (ERMNH1) Estudio experimental. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. Junio, 1992

-México, 8.s.d.s.d. Farmacopea de Los Estados Unidos Mexicanos, Ed. Salud, s.d. Mexico, 2004

-Newman DJ., Cragg GM., Snader KM. (2000). The influence of natural products upon drug Discovery. *Nat. Prod. Rep.* 17:215-234.

-Organización Mundial de la Salud, Organización Mundial de la Propiedad Intelectual y Organización Mundial del Comercio. Promoting Access to Medical Technologies and Innovation – Intersections between public health, intellectual property and trade. Ginebra, OMS-OMPI-OMC, 2012.

-Ortiz SA. (1986). Contribución al conocimiento de las plantas medicinales de Xoxocotla, Morelos. Tesis Facultad de Ciencias Biológicas, UAEM, México.

-Osuna Torres L., Tapia Perez ME., Aguilar Conteras A. (2005). Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales. Publicación i Edicions de la Universitat de Barcelona, Barcelone.p.17.

-Rao TS., Currie JL., Shaffer AF., Isakson P. (1993). Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)- and tetradecanoylphobol acetate (TPA)- induced dermal inflammation. *Inflammation*. 10: 723-741.

-Roberti di Sarsina, P. *et al.* Widening the paradigm in medicine and health: personcentred medicine as the common ground of traditional, complementary, alternative and non-

conventional medicine. En: Health care overview: new perspectives, advances in predictive, preventive and personalised medicine. Dordrecht, Springer Netherlands, 2012, 1: 335–353.

-Rodríguez, T.C., Guía técnica de ainia de envase y embalaje de aerosoles. Valencia España (2012)

-Roitt, IM, inmunología. Fundamentos. Ed. Medica panamericana. (2008)

-Rojas, O. y Briceño, M. Reometría. Cuaderno FIRP924. (1999). Universidad de Los Andes. Mérida.

-Sapag Chain N., (2001). Evaluación de proyectos de inversion en la empresa, primera edición, Buenos aires, Pentice Hall.

-Samuelsson, G., (2004). Drugs of Natural Origin: A Textbook of Pharmacognosy, 5th Swedish Pharmaceutical Press, Stockholm.

-Sánchez SO. La flora del Valle de México. Ed. Herrero. (1978). 233-234.

-Sharma A, Cardoso-Taketa A, Choi YH, Verpoorte R., Villarreal ML. (2012). A comparison on the metabolic profiling of the Mexican anxiolytic and sedative plant *Galphimia glauca* four years later. J. Ethnopharm. doi: 10.1016/j.jep.2012.03.033.-Torres C. Herbolaria Mexicana. Ed.Tomo. (2008)

-I. Sierra, "Desarrollo experimental de una guía de análisis para el control de calidad de envases para aerosol utilizados en la industria farmacéutica", tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia, 2013, pp. 77-108.

-Snyderman, R; Pike, MC. Chemoattractant receptors on phagocytic cells. Ann. Rev. Immunol. 1984; 257 (2). (1984)

-Tortoriello J., Ortega A. (1993). Sedative effect of galphimine B, a norecoterpenoid from *Galphimia glauca*. Planta Med. 59(5): 389-4

-Unidas, N. Sistema globalmente armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos. Nueva York y Ginebra. Nciones unidas (2005)

-Wilkinson JB y Moore RJ. (1990) Cosmetología de Harry ed. Díaz de Santos (1990). 159



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Centro de Investigación en Biotecnología

"1919-2019: en memoria del General Emiliano Zapata Salazar"

Cuernavaca, Mor., a 19 de noviembre de 2019.

Programa:
Maestría en Investigación y Desarrollo de Plantas Medicinales

Título de la tesis: **Análisis de la actividad antiinflamatoria de tres formulaciones de uso tópico elaboradas a partir de extractos de la especie *Galphimia glauca* Cav. (Malpighiaceae).**

Alumno que presenta tesis a revisión: **Itzel Román Sánchez**

Comité de revisión de tesis:
Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega (Tutor)
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
Dra. Verónica Rodríguez López
Dra. Anabel Ortiz Caltempa
Dr. Sergio Alcalá Alcalá

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos académicos para su defensa oral en el examen de grado. Por lo tanto, emito mi **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega

Cuernavaca, Mor., a 19 de noviembre de 2019.

Programa:
Maestría en Investigación y Desarrollo de Plantas Medicinales

Título de la tesis: **Análisis de la actividad antiinflamatoria de tres formulaciones de uso tópico elaboradas a partir de extractos de la especie *Galphimia glauca* Cav. (Malpighiaceae).**

Alumno que presenta tesis a revisión: **Itzel Román Sánchez**

Comité de revisión de tesis:
Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega (Tutor)
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
Dra. Verónica Rodríguez López
Dra. Anabel Ortiz Caltempa
Dr. Sergio Alcalá Alcalá

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos académicos para su defensa oral en el examen de grado. Por lo tanto, emito mi **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE



Dr. Sergio Alcalá Alcalá



Centro de Investigación en Biotecnología

"1919-2019: en memoria del General Emiliano Zapata Salazar"

Cuernavaca, Mor., a 19 de noviembre de 2019.

Programa:
Maestría en Investigación y Desarrollo de Plantas Medicinales

Título de la tesis: **Análisis de la actividad antiinflamatoria de tres formulaciones de uso tópico elaboradas a partir de extractos de la especie *Galphimia glauca* Cav. (Malpighiaceae).**

Alumno que presenta tesis a revisión: **Itzel Román Sánchez**

Comité de revisión de tesis:
Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega (Tutor)
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
Dra. Verónica Rodríguez López
Dra. Anabel Ortiz Caltempa
Dr. Sergio Alcalá Alcalá

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos académicos para su defensa oral en el examen de grado. Por lo tanto, emito mi **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

Dra. Anabel Ortiz Caltempa



Centro de Investigación en Biotecnología

"1919-2019: en memoria del General Emiliano Zapata Salazar"

Cuernavaca, Mor., a 19 de noviembre de 2019.

Programa:
Maestría en Investigación y Desarrollo de Plantas Medicinales

Título de la tesis: **Análisis de la actividad antiinflamatoria de tres formulaciones de uso tópico elaboradas a partir de extractos de la especie *Galphimia glauca* Cav. (Malpighiaceae).**

Alumno que presenta tesis a revisión: **Itzel Román Sánchez**

Comité de revisión de tesis:
Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega (Tutor)
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
Dra. Verónica Rodríguez López
Dra. Anabel Ortiz Caltempa
Dr. Sergio Alcalá Alcalá

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos académicos para su defensa oral en el examen de grado. Por lo tanto, emito mi **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

Dra. Verónica Rodríguez López



Cuernavaca, Mor., a 19 de noviembre de 2019.

Programa:
Maestría en Investigación y Desarrollo de Plantas Medicinales

Título de la tesis: **Análisis de la actividad antiinflamatoria de tres formulaciones de uso tópico elaboradas a partir de extractos de la especie *Galphimia glauca* Cav. (Malpighiaceae).**

Alumno que presenta tesis a revisión: **Itzel Román Sánchez**

Comité de revisión de tesis:
Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega (Tutor)
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
Dra. Verónica Rodríguez López
Dra. Anabel Ortiz Caltempa
Dr. Sergio Alcalá Alcalá

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos académicos para su defensa oral en el examen de grado. Por lo tanto, emito mi **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa