



---

---

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA**

TESIS

Presentada para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS**

por

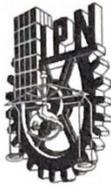
Jonathan Vera Pérez  
Ingeniero en Nanotecnología

Diseño de etosomas como transportadores de metabolitos de *Chenopodium murale* con actividad cicatrizante.

Dirigida por

Dra. Yolanda de las Mercedes Gómez y Gómez  
Dr. n T. A. Genaro Iván Cerón Montes

Ciudad de México, 2018



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

## ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 13:00 horas del día 20 del mes de diciembre del 2017 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de UPIBI-IPN para examinar la tesis titulada:

"Diseño de etosomas como transportadores de metabolitos de *Chenopodium murale* con actividad cicatrizante"

Presentada por el alumno:

Vera  
Apellido paterno

Pérez  
Apellido materno

Jonathan  
Nombre(s)

Con registro: 

A	1	6	0	5	5	7
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

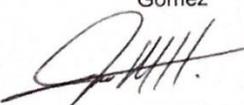
### Maestría en Ciencias en Bioprocesos

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

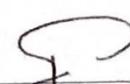
### LA COMISIÓN REVISORA Directores de tesis

  
Dra. Yolanda de las Mercedes Gómez y Gómez

  
Dr. Genaro Ivan Cerón Montes

  
Dr. José Antonio Mondragón Herrera

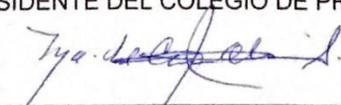
  
Dr. José Luis Castrejón Flores

  
Dr. Gustavo Valencia del Toro



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
UNIDAD PROFESIONAL  
INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA  
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE  
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

### PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

  
Dra. María del Carmen Oliver Salvador

## DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Yo Jonathan Vera Pérez declaro que esta tesis, así como los resultados en ella reportados, son producto de mi trabajo y que hasta donde yo sé no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona, ni tampoco contiene material que haya sido utilizado para obtener algún grado o diploma en alguna otra institución educativa, excepto donde se reconoce como tal. Declaro igualmente que hago justo reconocimiento en la tesis a las personas que contribuyeron con su trabajo y finalmente, declaro que esta tesis es el producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación o a la expresión escrita.



---

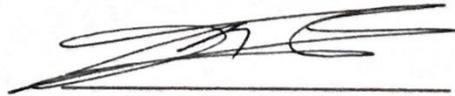
INAN Jonathan Vera Pérez



---

Dra. Yolanda de las Mercedes

Gómez y Gómez



---

Dr. Genaro Ivan Ceron Montes

## Autorización de uso de obra

Instituto Politécnico Nacional  
P r e s e n t e

Bajo protesta de decir verdad el que suscribe Jonathan Vera Pérez, manifiesto ser autor (a) y titular de los derechos morales y patrimoniales de la obra titulada "Diseño de etosomas como transportadores de metabolitos de *Chenopodium murale* con actividad cicatrizante", en adelante "La Tesis" y de la cual se adjunta copia, por lo que por medio del presente y con fundamento en el artículo 27 fracción II, inciso b) de la Ley Federal del Derecho de Autor, otorgo a el Instituto Politécnico Nacional, en adelante El IPN, autorización no exclusiva para comunicar y exhibir públicamente total o parcialmente en medios digitales "Publicación en línea de la tesis en el repositorio institucional" "La Tesis" por un periodo de 2 año contado a partir de la fecha de la presente autorización, dicho periodo se renovará automáticamente en caso de no dar aviso expreso a "El IPN" de su terminación.

En virtud de lo anterior, "El IPN" deberá reconocer en todo momento mi calidad de autor de "La Tesis".

Adicionalmente, y en mi calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de "La Tesis", manifiesto que la misma es original y que la presente autorización no contraviene ninguna otorgada por el suscrito respecto de "La Tesis", por lo que deslindo de toda responsabilidad a El IPN en caso de que el contenido de "La Tesis" o la autorización concedida afecte o viole derechos autorales, industriales, secretos industriales, convenios o contratos de confidencialidad o en general cualquier derecho de propiedad intelectual de terceros y asumo las consecuencias legales y económicas de cualquier demanda o reclamación que puedan derivarse del caso.

Ciudad de México, 10 de enero de 2018.

Atentamente



---

I.NAN. Jonathan Vera Pérez

## RESUMEN

Las heridas siguen siendo un importante problema de salud pública en todo el mundo, actualmente se investigan tratamientos fitoterapéuticos para disminuir el tiempo de cicatrización, debido a sus ventajas respecto a otros tratamientos sintéticos. Actualmente se han desarrollado nuevos sistemas de liberación de metabolitos para obtener un tratamiento final que pueda garantizar calidad, seguridad y eficacia.

En este trabajo se estudió el extracto etanólico de *Chenopodium murale* con la finalidad de evaluar su actividad cicatrizante y se diseñó un vehículo etosomal para su administración tópica. Se obtuvo una caracterización fitoquímica que permitió identificar y cuantificar los metabolitos de interés, actividad antioxidante y la huella digital en IR, además se reportó que el extracto no es citotóxico en fibroblastos (CHO-k1) con un IC50 de  $1.702 \pm 0.251$  mg/mL.

Se diseñaron vehículos para uso tópico, basándose en la estructura, estabilidad, morfología y elasticidad, se seleccionó el vehículo (A0EM) capaz de transportar el extracto etanólico de *Chenopodium murale*, se comprobó el atrapamiento mediante FT-IR, microscopia de fluorescencia y espectrofotometría, se obtuvo una eficiencia de atrapamiento de 63.35%, una permeabilidad alta en piel, una alta estabilidad durante el almacenamiento ( $-45.6 \pm 0.057$  mV) y una baja deformabilidad de  $23.75 \pm 0.986$  %.

Finalmente, se reportó la capacidad cicatrizante que tiene el extracto etanólico microfiltrado de *Chenopodium murale* que es semejante a la de  $\beta$ -sitosterol en el quinto día ( $28.39 \pm 2.89$  % de cierre de herida) y el aumento de está cuando es transportado en transetosomas (A0EM), los cuales pueden contribuir a una reducción del tiempo de cicatrización con un porcentaje de cierre de herida de  $61.40 \pm 3.27$  %, debido a las propiedades fisicoquímicas del vehículo. De manera complementaria mediante histología se comprobó que el proceso de cicatrización se llevó de manera adecuada en todos los tratamientos.

## ABSTRACT

Wounds continue to be an important public health problem throughout the world, currently phytotherapeutic treatments are being investigated to reduce healing time, due to its advantages over other synthetic treatments. Currently, new metabolite release systems have been developed to obtain a final treatment that can guarantee quality, safety and efficacy.

In this work the ethanol extract of *Chenopodium murale* was studied to evaluate its healing activity and an etosomal vehicle was designed for its topical administration. A phytochemical characterization was obtained that allowed to identify and quantify the metabolites of interest, antioxidant activity and fingerprint in IR, in addition it was reported that the extract is not cytotoxic in fibroblasts (CHO-k1) with an IC<sub>50</sub> of  $1.702 \pm 0.251$  mg / mL.

Vehicles were designed for topical use, based on structure, stability, morphology and elasticity, the vehicle (A0EM) capable of transporting the ethanol extract of *Chenopodium murale* was selected, entrapment was proved by FT-IR, fluorescence microscopy and spectrophotometry, an entrapment efficiency of 63.35% was obtained, a high permeability in skin, a high stability during storage ( $-45.6 \pm 0.057$  mV) and a low deformability of  $23.75 \pm .986\%$ .

Finally, the healing capacity the extract microfiltrate ethanolic of *Chenopodium murale* that is like that of  $\beta$ -sitosterol on the fifth day was reported ( $28.39 \pm 2.89\%$  of wound closure) and the increase of this when transported in transethosomes (A0EM), which can contribute to a reduction of the healing time with a percentage of wound closure of  $61.40 \pm 3.27\%$ , due to the physicochemical properties of the vehicle. In a complementary way by histology it was proved that the healing process was carried out in an adequate way in all the treatments.

## DEDICATORIAS

*Esta tesis se la dedico el ser más noble y misericordioso “Dios” que me bendice todos los días y me ha permitido cumplir mis sueños.*

*A mi mamá, que siempre me ha brindado su apoyo.*

*A Dulce por ser mi compañera de vida y ser mi motivación.*

*A mis amigos que me apoyan y me alientan a seguir con mis sueños.*

*A todas las personas que han sido parte de mi formación.*

*“La única limitante para no cumplir tus sueños, es tu propia mente”*

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT, por brindarme el apoyo financiero durante mi posgrado.

Le agradezco al Instituto Politécnico Nacional y a la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, por brindarme la oportunidad de formarme como maestro en ciencias.

Agradezco a la Universidad Tecnológica de Tecámac.

Agradezco a todos los profesores de UPIBI, que me brindaron sus conocimientos y enseñanzas.

Agradezco a todos los integrantes del comité evaluador por haberme orientado y apoyado durante todo el posgrado.

Gracias Dulce, J. Alejandro y Marcos, por ser mis compañeros, amigos y por haberme apoyado durante estos dos años.

Un agradecimiento especial a la Dra. Yolanda, por todo el conocimiento, tiempo, paciencia y apoyo que me brindo durante mi formación. Le agradezco por haber confiado en mí, en mis ideas y por enseñarme a no rendirme ante las adversidades.

# ÍNDICE

INTRODUCCIÓN .....	8
I.- MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES .....	10
1.1. Estructura y función de la piel. ....	10
1.2. Herida.....	11
1.3. Cicatrización de heridas. ....	12
1.4. Tratamiento de heridas.....	14
1.4.1 Opciones de tratamiento según las condiciones de las heridas.....	15
1.4.2. Tratamiento a base de plantas (fitoterapia). ....	15
1.5. Plantas con potencial proangiogénico.....	16
1.6 <i>Chenopodium murale</i> .....	18
1.7. Mejora de tratamientos de heridas mediante sistemas de liberación.....	20
1.8. Transporte de agentes activos de extractos de plantas. ....	20
1.9. Sistemas de transporte o liberación de agentes activos.....	21
1.9.1 Nanoencapsulación .....	21
1.9.2. Encapsulación con sistemas coloidales.....	22
1.10. Generalidades de los liposomas .....	22
1.11. Diseño de etosomas. ....	24
1.11.1. Tipos de etosomas.....	25
II.- JUSTIFICACIÓN.....	27
III.- OBJETIVOS.....	28
3.1 Objetivo general.....	28
3.2 Objetivos específicos .....	28
IV.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
4.0.1. MATERIAL A ENCAPSULAR Y CARACTERIZACIÓN. ....	29
4.1. Material biológico. ....	29
4.1.1. Pulverización de la planta <i>Chenopodium murale</i> .....	29
4.1.2. Extracción de metabolitos.....	29
4.1.3. Clarificación del extracto.....	30
4.2. Métodos de caracterización del extracto de <i>Chenopodium murale</i> .....	30
4.2.1 Determinación de sólidos totales.....	30
4.2.2. Ensayos cualitativos de metabolitos secundarios (Perfil fitoquímico) .....	30
4.2.3. Ensayos cuantitativos de metabolitos secundarios. ....	31
4.2.3.1. Fenoles .....	31
4.2.3.2. Flavonoides.....	31
4.2.3.3 Taninos .....	31
4.2.3.4 Esteroides .....	32
4.2.4. Determinación de la actividad antioxidante.....	32
4.2.5. Análisis mediante espectroscopia infrarroja FT-IR .....	32
4.2.6. Evaluación visual del efecto cicatrizante.....	33
4.2.7 Ensayo de Citotoxicidad. ....	33

4.3.0 DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DEL TRANSPORTADOR.....	34
4.3.1. Diseño de los sistemas etosomales mediante el método de inyección fría. ....	34
4.3.2. Homogenización de tamaño y morfología.....	36
4.4. Métodos de caracterización de los transportadores. ....	36
4.4.1. Análisis mediante espectroscopia infrarroja FT-IR .....	36
4.4.2. Morfología y estructura.....	36
4.4.2.1 Microscopía de contraste diferencial interferencial (DIC, Nomarski).....	36
4.4.2.2 Microscopia MEB .....	36
4.4.3. Distribución de tamaño de glóbulo y polidispersidad.....	36
4.4.4. Potencial $\zeta$ (estabilidad del glóbulo) .....	37
4.4.5. Deformabilidad de liposomas elásticos.....	37
4.5. FORMULACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL ENCAPSULADO. ....	37
4.5.1. Encapsulación de metabolitos.....	37
4.5.2. Homogenización de tamaño y morfología.....	37
4.6. Métodos de caracterización de encapsulados etosomales. ....	37
4.6.1. Capacidad de atrapamiento y eficiencia de atrapamiento.....	38
4.6.2. Comprobación de la encapsulación mediante microscopia de fluorescencia.....	38
4.6.3. Ensayo de permeabilidad en piel mediante microscopia de fluorescencia.....	38
4.6.4. Estabilidad durante el almacenamiento .....	39
4.6.5. Determinación del efecto de cicatrizante. ....	39
4.6.5.1 Análisis estadístico del ensayo de cicatrización. ....	40
4.6.6. Comprobación histológica. ....	40
V.- RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	41
5.1.1 MATERIAL A ENCAPSULAR Y CARACTERIZACIÓN. ....	41
5.1.1.1 Extracción de metabolitos secundarios.....	41
5.1.1.2 Extracto microfiltrado. ....	41
5.1.2 Determinación de sólidos totales.....	41
5.1.3 Determinación de rendimientos.....	42
5.1.4 Análisis preliminar fitoquímico. ....	43
5.1.4.1 Fenoles. ....	44
5.1.4.2 Alcaloides.....	45
5.1.4.3 Flavonoides.....	45
5.5.0 Cuantificación de metabolitos secundarios.....	47
5.1.5.1 Cuantificación de Fenoles totales. ....	47
5.1.5.2 Cuantificación de taninos.....	48
5.1.5.3 Cuantificación de Flavonoides totales.....	49
5.1.5.4 Cuantificación de esteroides. ....	50
5.1.6.0 Determinación de actividad antioxidante. ....	51
5.1.6.1 Actividad antioxidante por el método de DPPH .....	51
5.1.6.2 Actividad antioxidante por el método de ABTS.....	52
5.1.7.0 Análisis estructural mediante FT- IR en el proceso de extracción .....	53
5.1.8.0. Ensayo de cierre de herida visual del extracto total. ....	56
5.1.9.0. Ensayo de citotoxicidad.....	57
5.2.0 DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DEL TRANSPORTADOR.....	59

5.2.1. Morfología y estructura.....	59
5.2.1.1 Microscopía de contraste diferencial interferencial.....	59
5.2.1.2 Microscopia electrónica de barrido.....	63
5.2.2.0 Caracterización de tamaño y distribución de glóbulo.....	66
5.2.2.1 Tamaño de diámetro promedio de la vesícula.....	66
5.2.2.2 Índice de polidispersidad.....	67
5.2.2.3 Distribución de intensidad de tamaño.....	68
5.2.3. Estabilidad de las vesículas, Potencial $\zeta$ y movilidad electroforética.....	70
5.2.4. Deformabilidad de las vesículas lipídicas.....	74
5.2.5 Análisis estructural mediante FT- IR en la formulación de liposomas.....	75
5.3.0 DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DEL ENCAPSULADO.....	79
5.3.2.0 Caracterización de tamaño y distribución de glóbulo.....	79
5.3.2.1 Tamaño de diámetro promedio de la vesícula.....	79
5.3.2.2 Índice de polidispersidad.....	80
5.3.2.3 Distribución de intensidad de tamaño.....	81
5.3.3. Estabilidad de las vesículas, Potencial $\zeta$ y movilidad electroforética.....	82
5.3.4. Deformabilidad de las vesículas lipídicas.....	83
5.3.5. Capacidad de atrapamiento del extracto de <i>Chenopodium murale</i> .....	84
5.3.6. Transetosoma (A0EM) como transportador de <i>Chenopodium murale</i> .....	85
5.3.7. Morfología y estructura.....	86
5.3.8. Análisis estructural mediante FT- IR del encapsulado.....	86
5.3.9. Comprobación de la encapsulación mediante microscopia de fluorescencia.....	89
5.3.10 Ensayo de permeabilidad en piel mediante microscopia de fluorescencia.....	90
5.3.11. Estabilidad durante el almacenamiento.....	91
5.3.12. Ensayo de cierre de herida (cicatrización).....	93
5.3.13. Comprobación histológica del proceso de cicatrización.....	97
VI.- CONCLUSIONES.....	100
VII.- REFERENCIAS.....	101
VIII. - ANEXOS.....	112

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura. - 1 Estructura de la piel.....	11
Figura.- 2 Fases de la cicatrización.....	13
Figura. - 3 <i>Chenopodium murale</i> .....	18
Figura.- 4 Estructura del liposoma.....	24
Figura.- 5 Comparación de los tipos de etosomas.....	25
Figura.- 6 Espectro infrarrojo de <i>Chenopodium murale</i> .....	53
Figura.- 7 Espectro infrarrojo de <i>Chenopodium murale</i> y extracto clarificado.....	55
Figura.- 8 Resultados del efecto cicatrizante de <i>Chenopodium murale</i> .....	56

Figura.- 9 Porcentaje de viabilidad de fibroblastos Cho-k1 .....	58
Figura.- 10 Micrografía de A00M (etosomas) .....	63
Figura.- 11 Micrografía de A0M (Transetosoma).....	64
Figura.- 12 Micrografía electrónica de barrido de B10 % (transetosoma+ colesterol) .....	65
Figura.- 13 Tamaño de diámetro promedio de los vehículos. ....	67
Figura.- 14 Grafica bimodal representativa de las mediciones de las vesículas .....	69
Figura.- 15 Estabilidad de las vesículas medida mediante el potencial Z .....	71
Figura.- 16 Movilidad electroforética de las vesículas. ....	73
Figura.- 17 Espectro infrarrojo de transetosomas A0 .....	76
Figura.- 18 Espectro infrarrojo de etosomas A0 en suspensión y suspensión extruidos A0M, .....	77
Figura.- 19 Espectro infrarrojo de formulaciones en suspensión extruida (A00, A0, B10%) .....	78
Figura.- 20 Tamaño de diámetro promedio de los vehículos. ....	80
Figura.- 21 Grafica bimodal representativa de las mediciones de las vesículas .....	81
Figura.- 22 Movilidad electroforética de las vesículas. ....	83
Figura.- 23 Micrografías de encapsulado A0EM, .....	86
Figura.- 24 Comparación del espectro IR del encapsulado A0E y del espectro IR del extracto.....	87
Figura.- 25 Espectro infrarrojo del extracto de <i>Chenopodium murale</i> antes y después de encapsular. ....	88
Figura.- 26 Microscopia óptica de campo claro (A), de fluorescencia (B) de A0EM.....	89
Figura.- 27 Micrografías de fluorescencia a 40x.....	90
Figura.- 28 Estabilidad durante el almacenamiento. ....	92
Figura.- 29 Progreso de la cicatrización con diferentes tratamientos .....	93
Figura.- 30 Ensayo de cicatrización. ....	94
Figura.- 31 Comprobación histológica durante el proceso de cicatrización.....	98

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla.- 1 Tratamientos usados con mayor frecuencia en heridas.....	14
Tabla.- 2 Grupos y dosis empleadas en el ensayo de cicatrización. ....	33
Tabla.- 3 Formulaciones de vehículos. Las relaciones se hacen en base al peso del lípido.....	35
Tabla.- 4 Tratamientos del ensayo de cicatrización .....	40
Tabla.- 5 Determinación de solidos totales. ....	41
Tabla.- 6 Rendimientos de extracción. ....	42
Tabla.- 7 Análisis preliminar fitoquímico.....	43
Tabla.- 8 Resultados de cuantificación de Fenoles. ....	47
Tabla.- 9 Resultados de cuantificación de taninos. ....	48

Tabla.- 10 Resultados de Cuantificación de Flavonoides totales .....	49
Tabla.- 11 Resultados de cuantificación de esteroides. ....	50
Tabla.- 12 Resultados de la actividad antioxidante por el método de DPPH. ....	51
Tabla.- 13 Resultados de la actividad antioxidante por el método de ABTS. ....	52
Tabla.- 14 Microscopias DIC de las formulaciones de etosomas y transetosomas antes y después del proceso de extrusión observados a 80x y con filtro azul.....	60
Tabla.- 15 Tamaño promedio, Índice de polidispersidad (IPD) y porcentaje de polidispersidad .....	68
Tabla.- 16 Intensidad de la distribución de tamaños .....	70
Tabla.- 17 Potencial Z y movilidad electroforética de las vesículas.....	72
Tabla.- 18 Resultados de deformabilidad en base al tamaño promedio de diámetro.....	74
Tabla.- 19 Deformabilidad en base a la intensidad de tamaño del diámetro A. ....	75
Tabla.- 20 Tamaño promedio, Índice de polidispersidad (IPD) y porcentaje de polidispersidad. ....	81
Tabla.- 21 Potencial Z y movilidad electroforética de las vesículas.....	82
Tabla.- 22 Deformabilidad de vesículas lipídicas. ....	84
Tabla.- 23 Capacidad de atrapamiento de extracto de Chenopodium murale. ....	85
Tabla.- 24 Datos de caracterización del transetosoma A0EM como transportador.....	85

## INTRODUCCIÓN

Las heridas son un problema de salud que afecta a una amplia población de todas las edades (Beaskoetxea *et al.*, 2013). La población sufre constantemente accidentes, y las consecuencias son generalmente graves. Comienzan con el sufrimiento de la persona y la interrupción de las actividades cotidianas; después se agrega la necesidad de atención médica ambulatoria u hospitalaria (Bustos *et al.*, 2014).

Por fortuna los humanos contamos con el proceso de cicatrización ante las heridas, el cual implica una secuencia compleja de procesos celulares y moleculares, incluyendo la inflamación, la proliferación celular, la angiogénesis, la deposición de colágeno, y reepitelización. La alteración en cualquiera de estos pasos puede llevar a un retraso o imposibilidad en la cicatrización de heridas dérmicas (Andrades *et al.*, 2004). Estas alteraciones pueden ser originadas por causas como la insuficiencia vascular (arterial, venosa, linfedema), infecciosas (bacteria, hongos, parásitos), inflamatorias (pioderma gangrenoso, vasculitis) y metabólicas (diabetes, gota) (Süntar *et al.*, 2012).

En la actualidad se han generado tratamientos para ayudar al proceso de cicatrización, como; la ozonoterapia, los apósitos sintéticos, medicamentos compuestos por cloruro de cinc y la fitoterapia (Andrades *et al.*, 2004). Esta última basada en plantas que poseen actividad cicatrizante. Durante siglos, las plantas se han utilizado para tratar varias enfermedades en todo el mundo, y juegan un papel importante en los sistemas de salud en muchos países en desarrollo. La crisis económica, el alto costo de los medicamentos industrializados, el difícil acceso de la población a la asistencia médica y farmacéutica, además de los efectos secundarios causados por las drogas sintéticas son algunos de los factores que han contribuido a recurrir a la fitoterapia (De Melo Junior *et al.*, 2010).

Actualmente se está investigando nuevas plantas como *Chenopodium murale* con la finalidad aprovechar la actividad cicatrización de heridas. Estas plantas deben ser sometidas a estudios en animales y humanos para determinar su eficacia. (Rawat *et al.*, 2012). Las principales razones para usar extractos de plantas son: la sinergia

con diferentes compuestos, la pérdida de actividad después del aislamiento, la inestabilidad química (de aislados), la dificultad en la purificación y la posibilidad de actuar en múltiples objetivos a la vez (Gertsch, 2011; Kim *et al.* Al., 2008; Rando *et al.*, 2009).

Adicionalmente, se han realizado importantes esfuerzos para desarrollar nuevos sistemas de liberación de metabolitos (Gainza *et al.*, 2015). Esto debido a que los metabolitos secundarios pueden ser afectados por efectos adversos, o pueden genera efectos tóxicos. En cuanto a las formas de dosificación farmacéutica, se debe realizar algún proceso tecnológico para obtener un medicamento final que pueda garantizar calidad, seguridad y eficacia (Prista *et al.*, 2011). La encapsulación en sistemas de administración coloidales representa un método eficaz para mejorar la farmacocinética de los metabolitos, además de proteger contra la degradación, sostener la liberación del metabolito, aumentar la comodidad del paciente, evitar inyecciones repetitivas y reducir efectos secundarios. (Vrignaud, *et al.*, 2011).

Dentro de estos sistemas coloidales destacan los liposomas porque se han utilizado como vehículos para suministrar una amplia variedad de compuestos farmacéuticos (hidrofóbicos, hidrofílicos y anfipáticos), debido a que pueden ser formulados y procesados a partir del tamaño, composición, la carga y lamelalidad. En particular los etosomas pueden penetrar las capas de la piel permaneciendo intactos hasta llegar al sistema circulatorio, se ha reportado mejor difusión y penetración en la piel en modelos *in vitro* e *in vivo* en comparación a otros métodos como las inyecciones subcutáneas. (Cevc *et al.*, 2008).

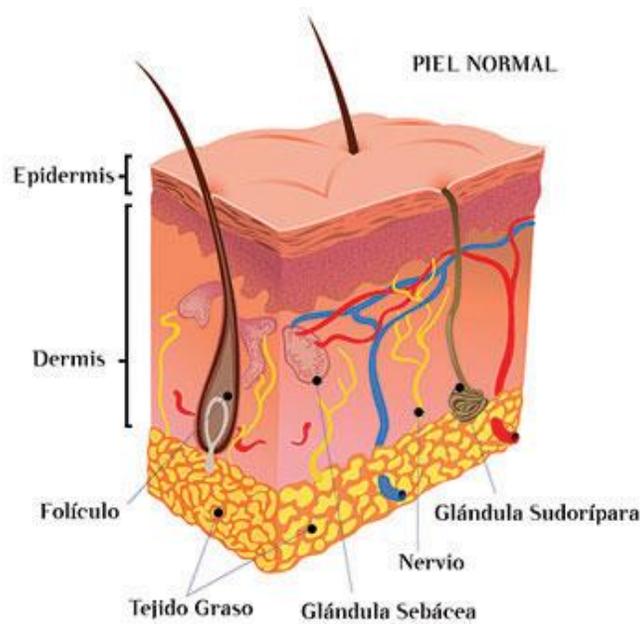
Este trabajo se basó en diseñar etosomas como transportadores de metabolitos con actividad cicatrizante, a partir de la planta "*Chenopodium murale*", con el fin de tener una forma de administración de extractos etanólicos, que asegure el atrapamiento, la preservación, la estabilidad y la liberación de los metabolitos, además de favorecer al proceso de cicatrización.

## I.- MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

### 1.1. Estructura y función de la piel.

La piel es la cubierta externa del cuerpo humano y uno de los órganos más importantes del mismo, tanto por tamaño como por sus funciones. La piel sana funge como barrera contra agresiones físicas y químicas (calor, radiaciones ultravioletas, microorganismos patógenos etc.). Además, la piel es esencial para el mantenimiento del equilibrio de fluidos corporales, el mantenimiento del equilibrio térmico y la transmisión de una gran cantidad de información externa que accede al organismo por el tacto, la presión, temperatura y receptores del dolor (Sánchez, 2017).

La piel se compone de una epidermis externa, una dermis interior, y el tejido subdérmico subyacente. Una membrana basal separa la epidermis de la dermis, mientras que esta última se mantiene continua con los tejidos subcutáneos y adiposos (figura 1). La dermis proporciona soporte fisiológico de la epidermis mediante suministro de los vasos sanguíneos linfáticos y también con las terminales nerviosas (Romero *et al.*, 2002). La epidermis se compone de varios tejidos epidérmicos fisiológicamente activos y del estrato córneo fisiológicamente inactivo. La epidermis fisiológicamente activa contiene queratinocitos como el tipo célula predominante. La piel también tiene otros tipos de células que representan los no queratinocitos. Estos incluyen los melanocitos (formación de pigmento), las células de Merkel y células de Langerhans (Banga *et al.*, 2002; Le, 2008).



**Figura. - 1 Estructura de la piel**

Fuente: [telemedicinayirledyssanguino.weebly.com](http://telemedicinayirledyssanguino.weebly.com)

## 1.2. Herida.

En el año de 1994 se definió el término herida como toda interrupción de estructuras anatómicas y funcionales normales. Sin embargo, existen innumerables clasificaciones de heridas. Lo más importante es determinar si la herida es aguda o crónica basado en los conceptos de orden y temporalidad. Una herida aguda es aquella que sigue un proceso de reparación ordenado, dentro de un tiempo adecuado, que restaura la integridad anatómica y funcional. Por otra parte, una herida crónica es aquella que no sigue un proceso de reparación ordenado o que sigue un proceso de reparación que no restaura la integridad anatómica y funcional. El concepto de orden se refiere a la secuencia de eventos biológicos que ocurren en la reparación de una herida. Esta secuencia de eventos tiene un orden establecido por el proceso de cicatrización y sus distintas fases. El concepto de temporalidad se refiere al tiempo que demora este proceso y es un elemento relativo que va a depender de factores locales y generales de la herida. Se ha establecido arbitrariamente 30 días para diferenciar una herida aguda de una crónica (Lazarus *et al.*, 1994; Jiménez, 2008; Krasner *et al.*, 2012).

### **1.3. Cicatrización de heridas.**

La cicatrización es un proceso biológico mediante el cual los tejidos vivos se reparan, mediante una serie compleja de eventos químicamente interrelacionados y que están mediados por una amplia gama de procesos celulares (Rawat *et al.*, 2012). El proceso de cicatrización (figura 2) se describe generalmente en tres fases:

#### **1.3.1. Fase I - Respuesta Inflamatoria (Día 1 a día 5).**

Fluyen hacia la herida líquidos que contienen proteínas plasmáticas, células sanguíneas, fibrina y anticuerpos. Se forma una costra en la superficie para sellar la salida de líquidos y evitar invasión bacteriana. La inflamación resultante de migración de leucocitos al área ocurre en unas cuantas horas, causa edema localizado, dolor, fiebre y enrojecimiento alrededor del sitio de la herida. Los leucocitos se degradan para eliminar los restos celulares y fagocitar los microorganismos y el material extraño. Los monocitos que llegan posteriormente de la médula ósea más distante se convierten en macrófagos, fagocitan los residuos restantes y producen enzimas proteolíticas. Finalmente, las células basales de los bordes de la piel migran sobre la incisión para cerrar la superficie de la herida. Simultáneamente, los fibroblastos localizados en el tejido conjuntivo más profundo inician la reconstrucción del tejido no epitelial (Arias, 2002; Le, 2008; Dunn & Phillips, 2009).

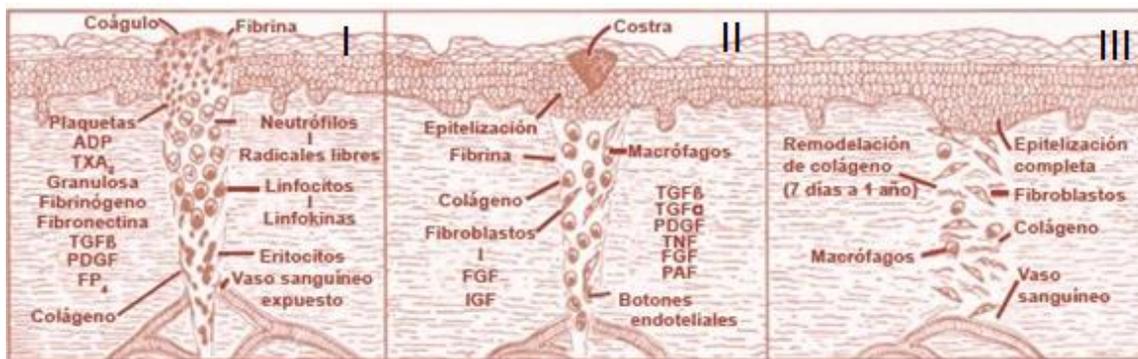
#### **1.3.2. Fase II - Migración/Proliferación (Día 5 a día 14).**

A partir de la primera semana, los fibroblastos (células germinales de tejido fibroso) migran hacia la herida. Con las enzimas de la sangre y de las células del tejido circundante, los fibroblastos forman colágena junto a una sustancia fundamental (fibrina, fibronectina). Estas sustancias adhieren los fibroblastos al sustrato. Los fibroblastos contienen miofibroblastos con características de músculo liso que contribuyen a la contracción de la herida. El depósito de colágena empieza aproximadamente el quinto día y aumenta rápidamente la fuerza de tensión de la herida. Además de la síntesis de colágena, se reemplazan otros componentes

dañados del tejido conjuntivo. Conductos linfáticos se generan, los vasos sanguíneos se propagan, se forma tejido de granulación y se desarrollan numerosos capilares para nutrir los fibroblastos (Salem *et al.*, 2000; Arias, 2002).

**1.3.3. Fase III - Maduración/Remodelación (Día 14 hasta la cicatrización completa)**

No hay distinción precisa entre la fase II y la fase III. La cicatrización empieza rápidamente durante la fase II y luego disminuye progresivamente. La fuerza de tensión continúa aumentando hasta un año después. La piel sólo recupera de 70% a 90% de su fuerza de tensión original, mientras que el intestino puede recuperar 100% de su fuerza original en sólo una semana. El contenido de colágena permanece constante, pero la fuerza de tensión aumenta debido a la formación y entrecruzamiento de las fibras colágenas. El depósito de tejido conjuntivo fibroso tiene como resultado la formación de cicatriz. En la cicatrización normal ocurre contracción de la herida en un periodo de semanas y meses. Al aumentar la densidad colágena disminuye la formación de vasos sanguíneos nuevos y el tejido cicatricial se vuelve pálido (Dunn & Phillips, 2009; Qing, 2017).



**Figura.- 2 Fases de la cicatrización. Fase I respuesta Inflamatoria, fase II, migración/proliferación, fase III maduración/ remodelación.**

Fuente: Porras-Reyes (1992).

#### 1.4. Tratamiento de heridas.

El tratamiento de las heridas es empleado para acelerar y/o llevar a cabo de manera correcta el proceso de cicatrización, ya que mientras más rápido lo hace, disminuye las complicaciones y molestias para el paciente.

Son numerosos los tratamientos existentes para ayudar al proceso de cicatrización, como: sustancias naturales, vendas inteligentes, apósitos interactivos, presión negativa, larvas de moscas, factores de crecimiento, terapia génica entre otros (Rodríguez & González, 2011). Algunos de los tratamientos usados de manera frecuente en heridas se muestran en la tabla 1.

Tabla.- 1 Tratamientos usados con mayor frecuencia en heridas.

Tratamiento.	Descripción general.
Colágeno.	Acelera la reparación tisular disminuye la respuesta inflamatoria local.
Terapia de presión negativa.	Utiliza la aplicación de vacío sobre la lesión para favorecer su curación.
Ozonoterapia.	Efecto bactericida y aumenta la capacidad de la hemoglobina para transportar oxígeno.
Apósitos interactivos.	Tejidos con componentes epidermales o dermales inmunológicamente inertes
Cremas ricas en vitaminas y clorofila.	Tiene acción antiséptica, epitelizante y estimulación tisular.
Dermagran II.	Medicamento compuesto por cloruro de cinc e hidróxido de magnesio, que se usa en forma de nebulizaciones.
Homeopatía.	Fármacos como <i>Antracinum</i> , <i>Ledum Palustre</i> y <i>Staphysagria</i>
Fitoterapia.	Múltiples plantas y sus derivados para la cicatrización.

#### **1.4.1 Opciones de tratamiento según las condiciones de las heridas.**

Debido a la gran cantidad de tratamientos existentes, González *et al.*, (2004) proponen la siguiente clasificación de tratamientos en base al tipo de herida:

- Heridas que comprometen tejidos.
  - Injertos.
  - Colgajos (porción de piel).
- Heridas crónicas que persisten por meses o años.
  - Apósitos o gasas.
  - Parches.
  - Colágena y polivinilpirrolidona.
  - Aplicación de piel cultivada, sintética, animal o humana.
  - Luz polarizada.
- Heridas agudas: Cicatrizan generalmente en 1 – 2 semanas.
  - Sutura.
  - Adhesivos tópicos.
  - Vendoles.
  - Películas de poliuretano.

#### **1.4.2. Tratamiento a base de plantas (fitoterapia).**

La eficacia de varias plantas en la curación de heridas se ha registrado ampliamente en algunas de las modalidades de curación más antiguas como la medicina tradicional china y africana (Biswas & Mukherjee, 2003). Muchas plantas son potentes cicatrizantes porque promueven el mecanismo de reparación de forma natural.

La demanda de medicamentos a base de hierbas está aumentando día a día en los países desarrollados y en desarrollo, porque son más seguros y tolerables en comparación con las drogas convencionales (De Melo *et al.*, 2010).

Actualmente se está investigando nuevas plantas con actividad cicatrizante, sin embargo, estas plantas deben ser sometidas a estudios en animales y humanos para determinar su eficacia (Rawat *et al.*, 2012).

Estudios actuales indican que los antioxidantes derivado de plantas, han demostrado promover la cicatrización de heridas. Varios compuestos naturales como los flavonoides, triterpenos, alcaloides y biomoléculas polifenólicas podrían influir positivamente en una o más fases del proceso de curación. Es conocido que las plantas son ricas en compuestos antioxidantes y antiinflamatorios. Por lo tanto, representan una fuente inestimable de moléculas capaces de tratar enfermedades que implican la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno y procesos inflamatorios, tales como ocurre con lesiones de la mucosa, epitelio y de la piel. De hecho, la propiedad curativa de las plantas, en la mayoría de los casos están asociados con sus actividades antioxidantes (Süntar *et al.*, 2012).

Varios extractos de plantas o sus fracciones enriquecidas en antioxidantes han sido ampliamente investigado para usos terapéuticos, por ejemplo: la quercetina, un generalizado fitoflavonoide en frutas y verduras, es uno de los antioxidantes más potentes y de uso común, otro es el tocoferol, que es un potente antioxidante natural presente en varios alimentos (Ahmad *et al.*, 2013). Por otra parte las fracciones insaponificables de aceites vegetales naturales son particularmente ricos en estos y otros componentes activos, los cuales se han probado para el tratamiento de varias enfermedades que implican acumulación de especies oxidativas. Un claro ejemplo es el aceite de oliva extra virgen, conocido por sus efectos antiateroscleróticos, antioxidantes y antiinflamatorios, los cuales se han demostrado que son originados por la presencia de compuestos fenólicos, tocoferol y otros, mayormente contenidos en su fracción insaponificable (Manca *et al.*, 2015).

### **1.5. Plantas con potencial proangiogénico.**

Aunque la cicatrización de heridas se ha convertido en un gran campo sofisticado de la medicina moderna, las plantas han sido a lo largo de la historia, mediadores naturales que han ayudado a este proceso (Biswas & Mukherjee, 2003).

Aproximadamente 450 especies de plantas se han identificado, con prometedoras propiedades curativas ante heridas. Las plantas promueven la cicatrización por múltiples mecanismos, generalmente promoviendo la angiogénesis (formación de vasos sanguíneos nuevos a partir de los vasos preexistentes). Numerosos estudios

indican que plantas como *Aloe vera*, *ginseng* y *Astragalus membranaceus*, entre otros, tienen un notable potencial proangiogénico (Ghosh & Gaba, 2013).

Durante el proceso de cicatrización de la herida, la mayoría de estas plantas promueve la angiogénesis, principalmente a través de la regulación positiva de la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y / o la activación de la vía proteína quinasas activada por mitógenos (Morgan & Nigam, 2013). Los componentes químicos responsables de la actividad proangiogénica son a menudo polifenoles, esteroides y saponinas (Strodtbeck, 2001). Hasta el momento, casi 41 plantas y sus compuestos aislados tienen propiedades estimulantes de la angiogénesis durante el proceso de cicatrización de heridas, algunos ejemplos se observan en el Cuadro 1. En estudios de evaluación proangiogénica *in vitro* e *in vivo*, se ha encontrado que, extractos botánicos generalmente influyen en la formación de vasos sanguíneos, con especial atención en la expresión de VEGF (Kasote *et al.*, 2015).

**Cuadro 1 Plantas con potencial proangiogénico.**

<b>Especie</b>	<b>Extracto activo / fracción / activo compuestos</b>	<b>Mecanismo de acción</b>	<b>Referencia</b>
<i>Achyranthes aspera</i>	Extracto metanólico de hojas	Regulación de MMP-2 y Expresión MMP-9	Barua <i>et al.</i> , (2012).
<i>Aloe barbadensis</i>	b-Sitosterol	Aumenta la producción de factores angiogénicos y / o la expresión de sus respectivos receptores	Moon <i>et al.</i> , (1999).
<i>Calendula officinalis</i>	Extracto etanolico	Inducción de neovascularización	Parente <i>et al.</i> , (2011).
<i>Hippophae rhamnoides</i>	Extracto acuoso de hojas	Regulac la expresión ión del VEGF	Upadhyay <i>et al.</i> , (2011).
<i>Terminalia chebula</i>	Extracto de taninos de frutas	Expresión modulada del gen VEGF	Li, <i>et al.</i> , (2011).
<i>Uncaria rhynchophylla</i>	extracto de etanólico de raíz	Aumento de la expresión génica de VEGF y bFGF y secreción de proteínas	Choi <i>et al.</i> , (2005).

## 1.6 *Chenopodium murale*.

Conocida comúnmente como “hediondilla, quelite de puerco, pie de ganso, quinua negra, yuyo negro, quelite de perro, hierba del perro” Es una hierba anual, de raíz fibrosa, de consistencia leñosa, presenta un tallo herbáceo cilíndrico de posición erguida. Mide de 20 a 50 cm de alto, por lo general el tallo ramificado de forma simpódica y filotaxia alterna con los peciolos sobre las hojas. El tipo de hojas va desde pecioladas hasta ovaladas y rombicovaladas de 2 a 3.5 cm de largo todas de borde entero con ápices apiculados y base cuneada presentando una nervación pinnatipartida. Inflorescencia simpétala de simetría radial, estambres libres en grupos de 5. Posición del ovario: súpero con el perianto cubriéndolo de manera incompleta con borde atenuado. Posición de las flores tipo racimo. En medicina tradicional se utiliza como antiinflamatorio y cicatrizante (Rzedowski *et al.*, 2005).

Es nativa del Viejo Mundo, ampliamente naturalizada en América. Distribución en México: Se ha registrado en Aguascalientes, Baja California Norte, Baja California Sur, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Distrito Federal, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luís Potosí, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz (Villaseñor y Espinosa, 1998).

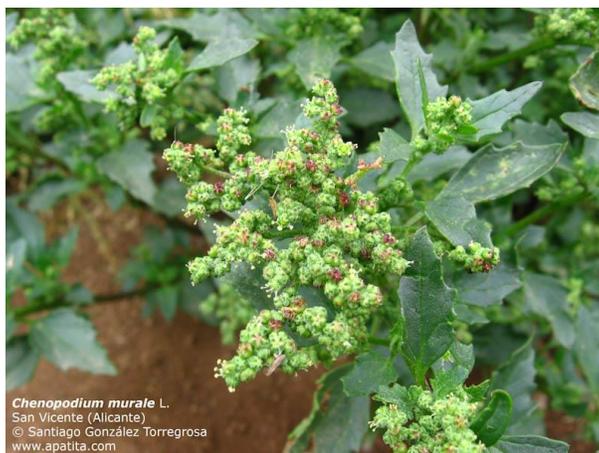


Figura. - 3 *Chenopodium murale*

Fuente: [www.apatita.com](http://www.apatita.com)

Los usos generalizados del género *Chenopodium* en la medicina tradicional han dado como resultado un considerable análisis químico de las plantas y sus principios activos. Las investigaciones fitoquímicas del género *Chenopodium* han proporcionado compuestos con una gran variedad de patrones estructurales. Desde el punto de vista fitoquímico, se informó que los quenopodios contienen: minerales, metabolitos primarios-carbohidratos, aminoácidos, constituyentes no polares, proteínas, citoquininas aromáticas, hormonas y metabolitos secundarios: flavonoides, saponinas, terpenos, esteroides, alcaloides y vitaminas (Kokanova-Nedialkova, 2009).

*Chenopodium murale* se usa como remedio natural ante erupciones cutáneas, salpullido, mezquinos, urticaria, y para lavar heridas. Se ha reportado que extractos etanólicos de *Chenopodium murale* tienen efectos analgésicos en ratas. (Castillo *et al.* 2014). De acuerdo con el estudio de Ibrahi *et al.*, (2007), los extractos etanólicos de *Chenopodium album* y *Chenopodium murale* mostraron actividad antiinflamatoria en el edema de pata de rata y en los modelos de pellets de algodón. Se usó diclofenaco sódico (1 mg / kg de peso corporal) como fármaco de referencia.

Otras plantas del género *Chenopodium* se han utilizado para tratar heridas debido a sus propiedades antimicrobianas como *Chenopodium ambrosioides* Linn. En el trabajo de Tettegah *et al.*, (2009) indican que extractos de hojas de *C. ambrosioides* curaron una herida infectada en ratas winstar en un tiempo medio de  $07.04 \pm 0.245$  días en comparación al grupo de control que se curó en  $12,6 \pm 0,254$  días (sin tratamiento). Otro estudio de TrivellatoGrassi *et al.*, (2013) indican la inhibición de los mediadores (BK, NO, SP, PGE2 y TNF- $\alpha$ ) y la actividad enzimática (MPO y ADA), lo que valida el uso de la planta en estudio para el tratamiento terapéutico de procesos antiinflamatorios y de curación de heridas.

### **1.7. Mejora de tratamientos de heridas mediante sistemas de liberación.**

La cicatrización de heridas es una preocupación mundial con varios desafíos, tan solo en E.U.A., el cuidado de heridas cuesta al sistema de salud 50 mil millones de dólares al año, además de que, las terapias actuales están lejos de garantizar la curación adecuada y la recurrencia es frecuente, lo que aumenta de manera alarmante el gasto total en salud en todo el mundo (Gainza *et al.*, 2015).

De acuerdo con Boateng *et al.*, (2008) el uso de agentes bioactivos tópicos en forma de soluciones, cremas y ungüentos para el suministro de fármacos a la herida no es muy efectivo, ya que se absorbe rápidamente el líquido y en el proceso pierden sus características reológicas.

La comunidad científica se ha centrado no sólo en la búsqueda de nuevos tratamientos para la curación de heridas, sino también en la mejora de la eficacia de las terapias actuales. Boateng & Catanzano, (2015), indican que actualmente se están realizando importantes esfuerzos para desarrollar nuevos sistemas de liberación o transporte para liberar compuestos activos de una manera controlada, como ejemplo se encuentran los liposomas y las nanopartículas de poli (láctico-co-glicólico utilizados para el transporte de factor de crecimiento epidérmico (Chu *et al.*, 2010; Brown *et al* 1988; Pierre *et al* 1997).

### **1.8. Transporte de agentes activos de extractos de plantas.**

La humanidad siempre tuvo una relación cercana con las plantas, usándolas durante miles de años como fuente de posibles medicamentos para aliviar el dolor físico y espiritual. A lo largo de los siglos, las terapias han evolucionado y el uso de mezclas de complejos como extractos de plantas ha sido sistemáticamente reemplazado por terapias que usan un único compuesto aislado (Zorzi *et al.*, 2015). Sin embargo, las plantas siguen siendo una fuente importante de compuestos bioactivos en la medicina moderna (Rates, 2001). Idealmente, se debe usar un compuesto único, puro y aislado en el desarrollo de una formulación, sin embargo, este no es siempre el enfoque más viable o exitoso (Zorzi *et al.*, 2015). Entre las razones para usar mezclas complejas, se podría enfatizar la sinergia con diferentes compuestos, la pérdida de actividad después del aislamiento, la inestabilidad

química, la dificultad en la purificación y la posibilidad de actuar en múltiples objetivos a la vez (Gertsch, 2011; Kim *et al.* Al., 2008; Rando *et al.*, 2009). Sin embargo, rara vez se puede usar un extracto de planta como producto final. En cuanto a las formas de dosificación farmacéutica, se debe realizar algún proceso tecnológico para obtener un medicamento final que pueda garantizar calidad, seguridad y eficacia (Prista *et al.*, 2011). En los últimos años, el número de publicaciones relacionadas con el uso de extractos asociados a sistemas basados en nanotecnología ha ido en aumento y en la actualidad se cuenta con literatura documentada sobre los beneficios de asociar compuestos aislados a sistemas de administración de fármacos (Zorzi *et al.*, 2015). Es de gran interés el uso de sistemas basados en nanotecnología para mejorar las propiedades biofarmacéuticas y tecnológicas de los extractos de plantas (Saraf, 2010; Bonifácio *et al.*, 2014; Zorzi *et al.*, 2015).

### **1.9. Sistemas de transporte o liberación de agentes activos.**

El sistema de liberación, también llamado transporte o vehículo, puede dar origen al proceso de encapsulación, que consiste en atrapar un componente específico dentro de algún tipo de matriz. La matriz puede estar formada por uno o varios componentes (como las proteínas, polisacáridos, surfactantes, lípidos, agua y / o minerales), y puede tener una sencilla o compleja estructura dependiendo de los materiales y procedimientos utilizados para fabricarlo. Varias técnicas de encapsulación se han desarrollado: secado por aspersion, extrusión, recubrimiento en lecho fluidizado, coacervación, el atrapamiento en liposomas, complejos de inclusión, separación por suspensión centrífuga, co-cristalización y emulsiones (Garti & McClements, 2012).

#### **1.9.1 Nanoencapsulación**

Nanoencapsulación se define como una tecnología para encapsular sustancias en miniatura (inferior a 1000 nm.) y se refiere al empaquetamiento bioactivo a nanoescala (Lopez *et al.*, 2006). La encapsulación se ha empleado para proteger compuestos bioactivos (polifenoles, micronutrientes, enzimas, antioxidantes y

nutracéuticos) y en la aplicación final, en última instancia, para protegerlos de factores ambientales adversos y también para la liberación controlada en el sitio objetivo (Gouin 2004; Ezhilarasi *et al*, 2013).

La nanoencapsulación ofrece numerosos beneficios, incluyendo la facilidad de manejo, estabilidad mejorada, protección contra la oxidación, la retención de los ingredientes volátiles, liberación controlada desencadenada por la humedad, liberación controlada activado por el pH, la entrega consecutiva de múltiples ingredientes activos (Shefer 2008; Ezhilarasi *et al* 2013).

### **1.9.2. Encapsulación con sistemas coloidales.**

La mayoría de los ingredientes activos son pequeñas moléculas menores a 500 Da. Sin embargo, estas moléculas se ven afectadas por su eliminación rápida y biodistribución no óptima, resultando efectos secundarios tóxicos (Patel, *et al.*, 2011). Además, la eficacia *in vivo* de los fármacos de alta polaridad puede ser limitada debido a la baja absorción intracelular. La encapsulación en sistemas de administración coloidales es un método eficaz para mejorar la farmacocinética. Estos portadores abarcan una amplia gama de sistemas de liberación que van desde emulsiones coloidales a partículas submicrométricas, tales como nanopartículas poliméricas, micelas de lípidos y liposomas, con el objetivo de proteger el medicamento contra la degradación, sostener la liberación del fármaco, aumentar la comodidad del paciente, evitar inyecciones repetitivas y reducir efectos secundarios (Vrignaud *et al.*, 2011).

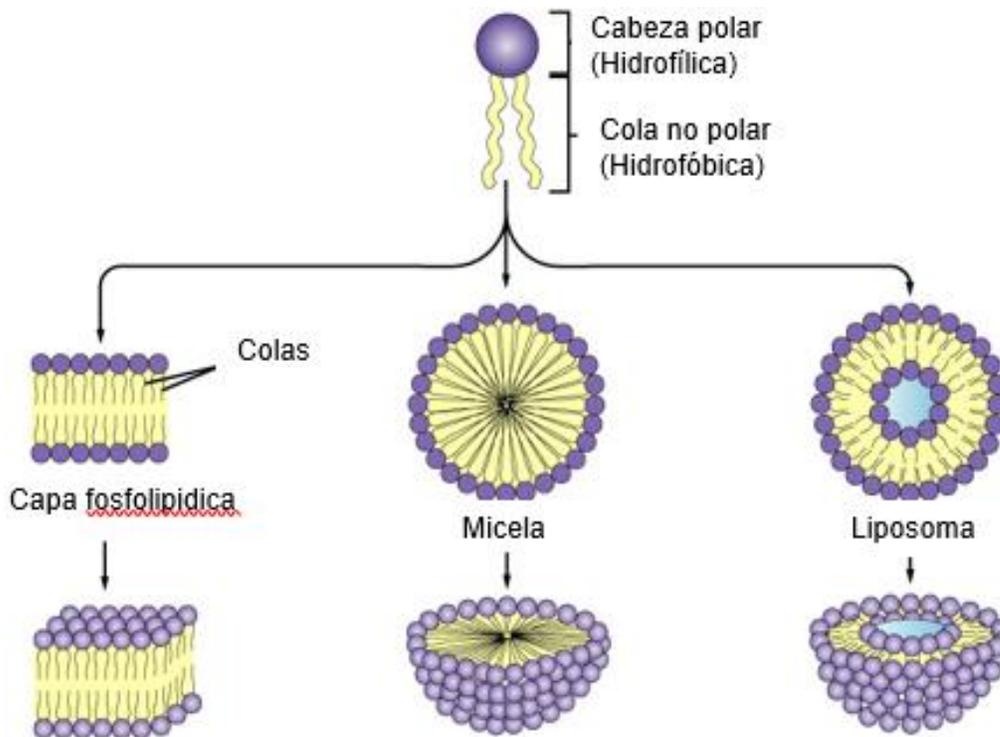
Entre los nanovehículos, los liposomas, que son vesículas compuestas de bicapas de fosfolípidos que rodean un compartimiento acuoso, permiten que la encapsulación de sustancias lipofílicas e hidrofílicas (Torchilin *et al.*, 2005).

### **1.10. Generalidades de los liposomas**

Cuando los fosfolípidos se dispersan en agua, forman espontáneamente una estructura cerrada con interior acuoso delimitado por membranas de fosfolípidos en bicapa, este sistema vesicular se llama liposoma (figura 4). Los liposomas son vesículas de la pequeña forma esférica que pueden ser producidos a partir de

colesteroles, tensioactivos no tóxicos, esfingolípidos, glicolípidos, ácidos grasos de cadena larga e incluso de membranas de proteínas. Los liposomas son el soporte del fármaco cargado con gran variedad de moléculas tales como moléculas pequeñas de fármacos, proteínas, nucleótidos y hasta plásmidos. Los liposomas fueron descubiertos hace unos 40 años por A. D. Bangham, que se ha convertido en la herramienta versátil en la biología, la bioquímica y la medicina actual (Jones *et al.*, 1995). En 1960, los liposomas se utilizaron como un vehículo para suministrar una amplia variedad de compuestos en su compartimiento acuoso. Los liposomas pueden ser diseñados y procesados a partir del tamaño, composición, la carga y lamelaridad. Hasta la fecha se han comercializado las formulaciones liposomales de los fármacos antitumorales y agentes antifúngicos. Hay varios mecanismos por los que los liposomas actúan dentro y fuera del cuerpo que son los siguientes:

- 1- liposomas se une a la membrana celular y parecen fundirse en ellas, la liberación de su contenido en la célula.
- 2- Algunas veces que son absorbidos por la célula y sus fosfolípidos se incorporan en la membrana celular por el que el fármaco se atrapa en el interior.
- 3- En el caso de las células fagocíticas, los liposomas son tomados, las paredes de fosfolípidos son accionados por orgánulos llamados lisosomas y los ingredientes farmacéuticos activos se liberan (Samad *et al.*, 2007).



**Figura.- 4 Estructura del liposoma**

Fuente: Imagen modificada de <http://desdeelconurbano.blogspot.mx>.

### 1.11. Diseño de etosomas.

Los liposomas deformables o elásticos, que actualmente se conocen como transferomas, fueron introducidos por Cevc Blume en 1992 y seguidos por el innovador trabajo de Touitou en 1996 que condujo al descubrimiento de un nuevo sistema lípido-vascular llamado etosomas. Los sistemas etosómicos difieren de los liposomas porque contienen concentraciones relativamente altas de etanol, además de los fosfolípidos y el agua. Se han introducido nuevas generaciones de sistemas etosómicos desde entonces mediante la adición de otros compuestos a la fórmula etosomal básica en un intento por mejorar las características vesiculares y la penetración de la piel (Abdulbaqi *et al.*, 2016).

### 1.11.1. Tipos de etosomas

Etosomas clásicos:

Son una modificación de los liposomas clásicos y están compuestos de fosfolípidos, una alta concentración de etanol y agua de hasta 45% p/p. Se reporta que son superiores a los liposomas clásicos para la administración de fármacos transdermales porque son de menor tamaño, tienen un potencial negativo y una mayor eficiencia de atrapamiento. Además, los etosomas clásicos muestran mejores perfiles de permeabilidad y estabilidad de la piel en comparación con los liposomas clásicos. Los pesos moleculares de los fármacos atrapados en los etosomas clásicos varían de 130,077 Da a 24 kDa (Touitou, *et al.*,2000; Sarwa *et al.*,2014; Mishra *et al.*,2010).

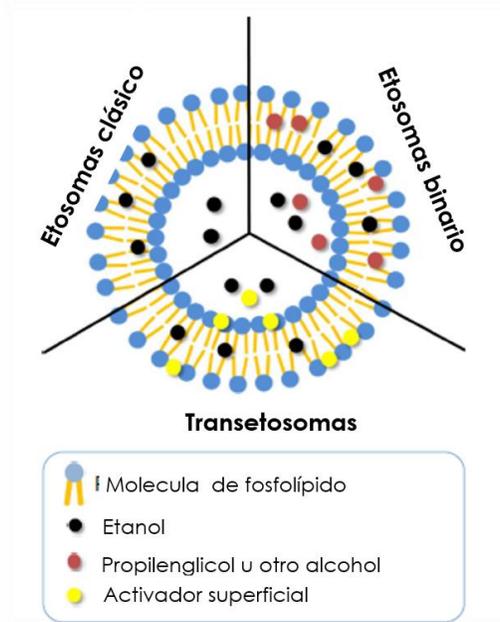


Figura.- 5 Comparación de los tipos de etosomas

Fuente: figura modificada de Abdulbaqi *et al.*,2016

Los etosomas binarios:

Los etosomas binarios fueron introducidos por Zhou *et al.*, (2010). Básicamente, se desarrollaron al agregar otro tipo de alcohol a los etosomas clásicos.

Los transetosomas:

Son la nueva generación de sistemas etosomales y fueron descritos por primera vez por Song *et al.*, (2012). Este sistema etosomal contiene los componentes básicos de los etosomas clásicos y un compuesto adicional, como el potenciador de la penetración o un activador de borde (surfactante) en su fórmula. Estas nuevas vesículas se desarrollaron en un intento de combinar las ventajas de los etosomas clásicos y los liposomas deformables (transfersomas) en una fórmula para producir los transposomas. Muchos investigadores han reportado propiedades superiores de transetosomas sobre los etosomas clásicos. Se han investigado diferentes tipos de activadores de superficie y potenciadores de la penetración para producir sistemas etosómicos con mejores características. Los pesos moleculares de agentes activos oscilan entre 130,077 Da y 200-325 kDa (Song *et al.*, 2012; Bragagni *et al.*, 2012; Ascenso *et al.*, 2015). La figura 5 muestra la comparación de los etosomas, mientras que en el Cuadro 2 se encuentran algunos trabajos de encapsulación mediante etosomas.

**Cuadro 2 Encapsulación de principios activos con etosomas**

<b>Fármaco/agente</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Principal resultado</b>	<b>Referencia</b>
Eritromicina	Eficiencia antibacterial	Sistema etosomal inhibió la infección y detuvo su desarrollo	Godin <i>et al.</i> , (2005)
Felodipino	Liberación de fármacos a través de la piel	Concentración de suministro transdérmico mejorado. Mejora de la biodisponibilidad del fármaco	Mishra <i>et al.</i> , (2012)
Extractos de hoja y corteza de fraxinus angustifolia	Efectos antioxidantes, antiinflamatorios y cicatrizantes	Se obtuvieron mejores efectos antioxidantes y antiinflamatorios a partir de vesículas que contienen etilenglicol en lugar de transcutol.	Moulaoui <i>et al.</i> , (2015)
Griseofulvina	Evaluación de la actividad antifúngica	Curación completa de la infección fúngica en 8 días para etosomas y 14 días para liposomas	Aggarwa <i>et al.</i> , (2005)

## II.- JUSTIFICACIÓN

Alrededor del mundo, millones de personas sufren de lesiones, ocasionadas por quemaduras, armas, accidentes, caídas, golpes, entre otras causas. Las heridas son un problema importante para los sistemas de salud de todo el mundo. En los países industrializados, casi 1,5% de la población tendrá en algún momento de su vida alguna herida crónica. Ante estas lesiones los seres humanos contamos con procesos fisiológicos como la cicatrización, donde el resultado eventual es la preservación de la funcionalidad. Sin embargo, diferentes factores como la diabetes, desnutrición e inmunosupresión inhiben el proceso. A consecuencia de esto se han desarrollado investigaciones con el fin de obtener tratamientos que ayuden al proceso de cicatrización, como; la ozonoterapia, los apósitos sintéticos, medicamentos compuestos por cloruro de cinc y la fitoterapia. Esta última es de gran interés debido a la gran cantidad de metabolitos secundarios con actividad farmacológica presentes en plantas.

En México se usa la herbolaria desde la antigüedad como tratamiento de afecciones en la piel, esto ha originado que en la actualidad exista una gran cantidad de productos naturales como los extractos. Los cuales requieren un método de dosificación farmacéutica, que pueda garantizar calidad, seguridad y eficacia. Los métodos de encapsulación basados en nanotecnología pueden mejorar las propiedades biofarmacéuticas y tecnológicas de los extractos de plantas.

En esta investigación se plantea el uso de la encapsulación, a escala submicrométrica de metabolitos secundarios con actividad cicatrizante, derivados de una planta que se utiliza desde la antigüedad como remedio natural "*Chenopodium murale*". El uso de etosomas de lecitina de soya y colesterol como transportadores, puede favorecer a una mayor difusión de metabolitos hidrofílicos, hidrofóbicos y anfifílicos en la piel, aunado a obtener una mayor preservación, liberación controlada y biodisponibilidad de estos. El desarrollo de nuevos métodos de encapsulación de metabolitos de plantas puede favorecer a la generación de nuevos productos o tratamientos para heridas u otros padecimientos relacionados.

## III.- OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo general

Encapsular metabolitos de *Chenopodium murale* con etosomas para evaluar su efecto cicatrizante.

### 3.2 Objetivos específicos

- Extraer metabolitos de *Chenopodium murale* y clarificar un extracto etanólico.
- Caracterizar mediante ensayos fitoquímicos (cualitativos y cuantitativos) el extracto de *Chenopodium murale*.
- Determinar la capacidad antioxidante de *Chenopodium murale*.
- Evaluar la citotoxicidad del extracto etanólico de *Chenopodium murale*.
- Diseñar etosomas mediante inyección fría y caracterizar vehículos etosomales (tamaño, estabilidad, morfología, estructura, deformabilidad y movilidad electroforética)
- Encapsular y caracterizar etosomas como transportadores de los metabolitos (atrapamiento, almacenamiento, tamaño, estabilidad, morfología, estructura, deformabilidad y movilidad electroforética).
- Estudiar el efecto cicatrizante (extracto y encapsulado).

## IV.- MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.0.1. MATERIAL A ENCAPSULAR Y CARACTERIZACIÓN.

Esta sección describe los métodos y materiales empleados para obtener y analizar los extractos etanólicos de interés. Los puntos 4.1 están relacionados a los métodos de proceso y los 4.2 a los métodos de caracterización.

### 4.1. Material biológico.

*Chenopodium murale* (Hediondilla, pie de Ganso) de la familia de Chenopodiaceae. Se obtuvo del Mercado de Sonora; mercado de plantas, de la Ciudad de México.

#### 4.1.1. Pulverización de la planta *Chenopodium murale*.

De acuerdo con el método modificado de Saini *et al.*, (2016), la planta *Chenopodium murale* (tallos, hojas, flor y raíz) se limpió y se sometió a secado en una estufa a una temperatura máxima de 40 °C durante 48 horas. La planta se molió hasta obtener polvos finos. Estos polvos se emplearon para obtener el extracto total.

#### 4.1.2. Extracción de metabolitos.

De acuerdo con el método modificado de Bakirtzi *et al.*, (2016), 20 g de los polvos finos de la planta se colocaron en contacto con 350 mL de etanol al 96% y se mantuvieron en una incubadora con agitación orbital a 80 rpm y 25°C durante 24 horas. El extracto obtenido se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos. Para el calcular los rendimientos se empleó la siguiente ecuación:

$$Y_{sw} = \frac{Xe * Me}{Mv}$$

Donde :

$Y_{sw}$  = rendimiento en base húmeda (g de sólidos/g de muestra vegetal)

$Xe$  = fracción de sólidos solubles en el extracto

$Me$  = Cantidad de extracto (g)

$Mv$  = Cantidad de muestra vegetal (g)

#### **4.1.3. Clarificación del extracto.**

Se utilizó un proceso de microfiltración para la clarificación de 200 mL del extracto total descrito en el método de Hodúr *et al.*, (2009). Se empleó un sistema compuesto por un motor pump drive (modelo 7591-50), un cabezal (modelo Easy Lead 77-601-10) y un controlador o unidad drive (modelo 7591-50). El módulo de filtración es de la empresa Mintrech (modelo Fiber flow) de 0.05 micrómetros con un arreglo de fibra hueca y tubería (Tygon) que se emplea para conectar entre si los accesorios. Este proceso puede separar compuesto de alto peso molecular, que pueden interferir en el diseño de los encapsulados.

#### **4.2. Métodos de caracterización del extracto de *Chenopodium murale*.**

Estos métodos permitieron obtener información cualitativa y cuantitativa, tanto del extracto etanólico y del extracto clarificado, para su posterior atrapamiento o encapsulación.

##### **4.2.1 Determinación de sólidos totales.**

Se determinó el porcentaje de sólidos totales de la planta, del extracto total y del extracto clarificado de acuerdo Conesa *et al.*, (2001). Se toman 5 g de muestra para realizar la determinación en una termo balanza Sartorius Mark 3, en condiciones de 100 °C y una pendiente de 0.001 %IW.

##### **4.2.2. Ensayos cualitativos de metabolitos secundarios (Perfil fitoquímico)**

Los ensayos del preliminar fitoquímico están basados en el manual de prácticas de productos naturales de Valencia y Garín, (2010). Los cuales se realizaron en el extracto total y clarificado.

Se pesaron 5 g de muestra y se añadieron 40 mL de hexano y 40 mL de solución metanol-agua (9:1). La mezcla se sometió a sonicación durante 15 minutos, se filtró el líquido y se separó el extracto en dos fases una polar (metanol-agua) y otra no polar (hexano). La fase polar obtenida se ocupó para determinar la presencia de alcaloides, flavonoides, cumarinas, sesquiterpenlactonas, azúcares reductores,

taninos, glicósidos cardíacos, cianogénicos y quinonas. Mientras que la fase no polar se utilizó para las pruebas de saponinas y esteroides.

#### **4.2.3. Ensayos cuantitativos de metabolitos secundarios.**

Debido a que se ha reportado que contribuyen durante el proceso de cicatrización; se cuantificaron los siguientes metabolitos secundarios del extracto y del extracto clarificado de *Chenopodium murale*:

##### 4.2.3.1. Fenoles

Se determinó por el método descrito por Singleton & Rossi, (1965). Se realizó una curva tipo a concentraciones de 0.125, 0.0625, 0.0312, 0.0156, 0.0078 y 0.0039 mg/mL de ácido gálico (Anexo 1), cada tubo se agitó con un Vortex se dejó reposar en oscuridad durante 30 minutos y se leyó a una absorbancia de 760 nm. Los resultados se reportaron en concentración de fenoles totales [mg eq. de ácido gálico/ 1 g de muestra].

##### 4.2.3.2. Flavonoides

Para la cuantificación se realizó por el método descrito por Chang *et al.*, (2002). Con una curva tipo (Anexo 2), de 0.1, 0.05, 0.025, 0.012, 0.0062 y 0.0031 mg/mL de quercetina, cada tubo se agitó con un vortex y se dejó reaccionar por 30 minutos y se leyó a una absorbancia de 415 nm. Los resultados se reportaron en concentración de flavonoides totales [ $\mu$ g eq. de quercetina / 1 g de muestra].

##### 4.2.3.3 Taninos

Se realizó la cuantificación por el método de Folin-Ciocalteu descrito por Makkar *et al.*, (1993). Se realizó una curva tipo como se muestra en el anexo 3 a concentraciones de 0.1, 0.05, 0.025, 0.012 y 0.0031 mg/mL de ácido tánico, cada tubo se agitó con un vortex, se dejó reposar durante 40 minutos y se leyó cada tubo a una absorbancia de 725 nm. Los resultados se reportaron en concentración de taninos [mg eq. de ácido tánico/ 1 g de muestra].

#### 4.2.3.4 Esteroides

Se empleó el método descrito por Galindo *et al.*, (1989). Se realizó una curva tipo (Anexo 4), a concentraciones de 1, 0.5, 0.25, 0.125 0.062, 0.0312, 0.0156, 0.0078, y 0.0039 mg/mL de colesterol, cada tubo se agitó con un vortex, se dejó reposar 20 minutos y se leyó a una absorbancia de 560 nm. Se expresaron los resultados en concentración de esteroides totales [mg eq. de colesterol/ 1 g de muestra].

#### 4.2.4. Determinación de la actividad antioxidante

4.2.4.1. Determinación de la actividad antioxidante por el método 2,2-Azinobis-3-Etilbenzotiazolin-6-Ácido Sulfónico (ABTS).

Se realizó el método descrito por Re, *et al.*, (1999). Se generó una curva tipo (Anexo 6 y 6.1), y las lecturas se realizaron a una absorbancia de 734 nm. Los resultados se presentan en % de inhibición, en concentración de ácido ascórbico ( $\mu\text{g}$  eq. de asc. / 1 mL de extracto) y concentración de trolox ( $\mu\text{M}$  eq. de trolox / 1 g de extracto seco).

4.2.4.2. Determinación de la actividad antioxidante por el método 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).

Se realizó la cuantificación de la actividad antioxidante por el método de DPPH modificado de Brand-Williams *et al.*, (1995), el cual se basa en la reducción de la absorbancia a 517 nm del radical DPPH. Los resultados se presentan en % de inhibición, en concentración de ácido ascórbico ( $\mu\text{g}$  eq. de asc. / 1 mL de extracto) y concentración de trolox ( $\mu\text{M}$  eq. de trolox / 1 g de extracto seco). Curva de tipo (Anexo 5. Y 5.1)

#### 4.2.5. Análisis mediante espectroscopia infrarroja FT-IR

El extracto total y el extracto clarificado se analizaron mediante espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier, con el módulo RTA (Reflexión total atenuada) con base al trabajo de Pereira *et al.*, (2015), se utilizó un espectrómetro Spectrum

Two de la marca Perkin Elmer. Se colocaron alrededor de 20 µg de muestra para su lectura, se utilizó el intervalo de 4000 a 500 cm<sup>-1</sup>.

#### 4.2.6. Evaluación visual del efecto cicatrizante

Se utilizó ratas Fisher a todos los individuos se les rasuró el lomo y se hizo una incisión de aproximadamente 1.5 cm de largo a cada lado. La aplicación del tratamiento se realizó diariamente durante un periodo de 15 días.

Para evaluar el efecto cicatrizante de forma visual se utilizaron 3 grupos de ratas winstar con una n=3, de un peso promedio de 230 gramos y se tomaron fotos durante 15 días. Cada grupo tiene dos heridas: donde el costado izquierdo es el control negativo. La tabla 2 muestra los grupos con sus respectivos tratamientos.

Tabla.- 2 Grupos y dosis empleadas en el ensayo de cicatrización.

Ensayo de cicatrización			
	Grupo A: control positivo	Grupo B	Grupo C
Tratamiento	Nitrofurazona	<i>Chenopodium m.</i>	Encapsulado
Dosis	100mg: 0.1mg	200 µL: 1.02mg	200 µL:0.2mg
Control negativo.	/	Etanol 96%	Agua destilada
Dosis	/	200 µL	200 µL

#### 4.2.7 Ensayo de Citotoxicidad.

De acuerdo con el método de Perez *et al.*, (2016) se empleó la línea celular CHO-K1 (fibroblastos). Las células se propagaron en el medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Cellgro, Herndon) suplementado con 2 mL de glutamina, gentamicina 50 mg y 10 % de suero fetal bovino. Se utilizaron cultivos confluentes (80-90%) de la línea celular, realizando la exclusión con azul de tripano para comprobar su viabilidad, se colocaron 3,000 células/pozo en un volumen de 100 µL de medio DMEM en microplacas de 96 pozos, posteriormente se incubaron por 24 h a 37 °C en atmósfera húmeda y 5 % de CO<sub>2</sub> en incubadora de cultivo.

Las muestras se disolvieron en dimetil sulfóxido (DMSO) a una concentración final de 0.001 µg/mL. Posteriormente se preparan diluciones de las muestras en DMEM, se adicionaron 100 µL/pozo de cada dilución, el ensayo se realizó por cuadruplicado. El DMSO se utilizó como control negativo, las placas se incubaron durante 72 h en atmósfera de 5 % CO<sub>2</sub> a 37 °C. Luego de 72 h se adicionaron 20 µL MTT (sal de tetrazolio (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5- difeniltetrazolio). Al cabo de 4 h en atmósfera de 5 % CO<sub>2</sub> a 37 °C se decanta el medio, se adicionaron 200 µL/pozo de DMSO y se lee la densidad óptica (DO) en un lector de microplacas a 560 nm y 630 nm como referencia. El porcentaje de células muertas se determinó a partir del promedio de las absorbancias obtenidas de controles tratados y no tratados. Los valores de comparación se hacen sobre una base de 50 % de inhibición de crecimiento (IC<sub>50</sub>) en las células tratadas con los agentes específicos. El porcentaje de Viabilidad se obtiene de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{DO \text{ células tratadas} \times 100}{DO \text{ células control}}$$

El IC<sub>50</sub> se obtuvo mediante regresión lineal, graficando el % de viabilidad y la concentración del extracto, mediante a siguiente ecuación:

$$IC_{50} = \frac{50 - \text{Intersección } (b)}{\text{Pendiente } (m)}$$

#### **4.3.0 DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DEL TRANSPORTADOR.**

En esta sección se abordan los métodos y materiales empleados para formular y caracterizar los etosomas como transportadores. Los puntos 4.3 están relacionados a los métodos de proceso y los 4.4 a los métodos de caracterización.

##### **4.3.1. Diseño de los sistemas etosomales mediante el método de inyección fría.**

Mediante el método descrito por Touitou *et al.*, (2000) con ligeras modificaciones se diseñaron los sistemas etosomales. Donde se empleó una fase orgánica y una fase acuosa por separado. La fase orgánica se obtuvo disolviendo fosfatidilcolina de soya

(además del tensioactivo o potenciador, en el caso transetosomas, tween 80 y colesterol) en etanol, a una temperatura de 30 °C.

La fase acuosa representa el 70% de la solución final, (se empleó agua desionizada), esta se inyecta en la fase orgánica, a una temperatura de 40 °C y a una velocidad de 200µL/min. La solución se homogeniza a una velocidad de 2000 rpm, utilizando un agitador magnético durante 40 min.

La tabla 3 muestra las formulaciones establecidas con base a los parámetros límites reportados por Abdulbaqi *et al.*, (2016). La modificación principal de este método consistió en el uso de lecitina de soya y la adición de colesterol a los transetosomas, con el fin de obtener transportadores con características (estabilidad, morfología, elasticidad) diferentes a los transetosomas clásicos.

**Tabla.- 3 Formulaciones de vehículos. Las relaciones se hacen en base al peso del lípido**

<b>Tipo</b>	<b>Formula</b>	<b>Lecitina s.(mg)</b>	<b>Colesterol (mg)</b>	<b>Tensoactivo (mg)</b>	<b>Relación (p:p:p)</b>
Etosoma	A00	100	NA	NA	100:0:0
Transetosoma	A0	100	NA	10	100:0:10
Transetosoma + Colesterol	B10%	100	10	10	100:10:10
	C30%	100	30	10	100:30:10
	D50%	100	50	10	100:50:10
	E70%	100	70	10	100:70:10

#### **4.3.2. Homogenización de tamaño y morfología.**

Se empleó microfiltración tangencial con un módulo de tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$  (Millipore S.A. de C. V., México). Se empleó un sistema compuesto por un motor pump drive (modelo 7591-50), un cabezal (modelo Easy Lead 77-601-10) y un controlador o unidad drive (modelo 7591-50).

#### **4.4. Métodos de caracterización de los transportadores.**

Estos métodos permitieron obtener información morfológica y estructural de los etosomas.

##### **4.4.1. Análisis mediante espectroscopia infrarroja FT-IR**

Se realizó de acuerdo con el punto 4.2.5, en los materiales precursores (lecitina de soya y colesterol), en los etosomas y etosomas microfiltrados.

##### **4.4.2. Morfología y estructura.**

###### **4.4.2.1 Microscopía de contraste diferencial interferencial (DIC, Nomarski)**

Se utilizó un microscopio de la marca Leica de campo claro y con DIC para visualizar la estructura y morfología transparente de los etosomas, aprovechando los cambios del índice de refracción. Se utilizó un aumento de 80x, filtro azul, una cámara Lumnera y el software Image-Pro Insight.

###### **4.4.2.2 Microscopia MEB**

Se obtuvieron micrografías mediante el microscopio electrónico de barrido JCM-6000PLUS de la marca Jeol (alto vacío, 10kv, modo BEI), se incorporó grafito coloidal para poder observar la superficie de las vesículas.

##### **4.4.3. Distribución de tamaño de glóbulo y polidispersidad.**

De acuerdo con Gharib *et al.*, (2015), el tamaño promedio y la polidispersidad fue medido mediante dispersión de luz dinámica (DLS), en un equipo Zeta sizer de la marca Malvern, modelo Zetasizer Nano ZS.

#### 4.4.4. Potencial $\zeta$ (estabilidad del glóbulo)

El Potencial  $\zeta$  y la carga superficial se midió a través de microelectroforesis de láser Doppler, de acuerdo con el procedimiento de Chen *et al.*, (2016), en un equipo Zeta sizer de la marca Malvern, modelo Zetasizer Nano ZS.

#### 4.4.5. Deformabilidad de liposomas elásticos

De acuerdo con el método descrito por Weissig *et al.*, (2010) con ligeras modificaciones, se determinó la deformabilidad de los transportadores mediante de la extrusión en un filtro de membrana, de tamaño de poro definido (450 nm). Los etosomas se midieron antes y después de la extrusión mediante DLS.

Para cada suspensión de etosomas, se reportó la media  $\pm$  desviación estándar de tres extrusiones. La elasticidad se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Dedormabilidad} = \frac{\text{tamaño de las vesículas antes de la extrucción} - \text{tamaño de vesículas extruidas}}{\text{Tamaño de las vesículas antes de la extruccion}} \times 100$$

### 4.5. FORMULACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL ENCAPSULADO.

En esta sección se abordan los métodos y materiales empleados para formular y caracterizar los encapsulados etosomales. Los puntos 4.5 están relacionados a los métodos de proceso y los 4.6 a los métodos de caracterización.

#### 4.5.1. Encapsulación de metabolitos.

La formulación de los liposomas se realizó de acuerdo con el punto 4.3.1 adicionando el extracto clarificado al 2% en a la fase acuosa.

#### 4.5.2. Homogenización de tamaño y morfología

Se realizó de acuerdo con el punto 4.3.2

#### 4.6. Métodos de caracterización de encapsulados etosomales.

Estos métodos permitieron obtener información de las propiedades de los encapsulados etosomales. Se emplearon las metodologías descritas

anteriormente: espectroscopia infrarroja FT-IR (4.4.1), morfología y estructura (4.4.2.), distribución de tamaño de glóbulo y polidispersidad (4.4.3), potencial  $\zeta$  (estabilidad del glóbulo) (4.4.4).

#### **4.6.1. Capacidad de atrapamiento y eficiencia de atrapamiento.**

El contenido de extracto incorporado en los etosomas se determinó mediante el método de centrifugación con modificaciones de Kasetvatin *et al.*, (2015). Se desestabilizó la suspensión de etosomas-extracto (1.5 mL) con un buffer de fosfatos pH1 a 10 Mm (0.5 mL). Posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 minutos. Una vez recuperado el sedimento, se adicionó triton x100 al 1% (0.5mL) y finalmente se disuelve en 2ml de alcohol etílico. Se determinó la concentración de extracto mediante espectrofotometría UV-VIS, con una curva (Anexo 7) de extracto hidroalcohólico de *Chenopodium murale* (el cual tiene una absorción máxima en 665 nm.) La eficiencia de atrapamiento fue calculada mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Eficiencia de atrapamiento de extracto} = \frac{\text{concentración del extracto encapsulado}}{\text{concentración del extracto inicial}} \times 100$$

#### **4.6.2. Comprobación de la encapsulación mediante microscopia de fluorescencia.**

Se efectuó la comprobación de atrapamiento del extracto microfiltrado de *Chenopodium murale*, mediante la obtención de imágenes por un microscopio de fluorescencia de la marca Leica. Las imágenes se obtuvieron a 80x con una cámara Lumnera y el software Image-Pro Insight., (Tyagi *et al.*, (2015).

#### **4.6.3. Ensayo de permeabilidad en piel mediante microscopia de fluorescencia.**

Se empleó la metodología de Tyagi *et al.*, (2015) con ligeras modificaciones. El encapsulado A0EM con una concentración de 5% de concentración de extracto y el extracto a una concentración de 5%, se aplicaron tópicamente (0.3 mL) a la porción dorsal afeitada de las ratas Fisher. 1h después de la aplicación se sacrificaron las

ratas. Las secciones representativas se obtuvieron de ratas, la piel se cortó en trozos pequeños, y se observaron con un microscopio de fluorescencia marca Leica.

#### **4.6.4. Estabilidad durante el almacenamiento**

La estabilidad se determinó de acuerdo con la metodología de Di Marzio, *et al.*, 2011, las formulaciones se sometieron a temperaturas de refrigeración (4°C) y medio ambiente (25°C), por un periodo de 60 días determinando a intervalo de 15 días su estabilidad por medio del potencial Z.

#### **4.6.5. Determinación del efecto de cicatrizante.**

La metodología adoptada se basó en trivellatoGrassi *et al.*, (2013) con varias modificaciones. Se utilizaron ratas Fisher con una n= 3. El día de la cirugía, las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (42 mg / kg) por vía intraperitoneal. Después de la confirmación de la anestesia profunda, el pelo en la parte posterior del animal se eliminó manualmente con una máquina de afeitar. Se marcaron 6 círculos en el lomo del animal, con un diámetro de 1.5cm, posteriormente se separó la piel, los animales se colocaron en posición dorsal, se limpió el perímetro de la herida y se aplicaron los tratamientos de cuerdo a la tabla 4. Los animales se trataron dos veces al día durante 20 días, se tomaron fotos de la herida antes de aplicar cada tratamiento con una cámara de 16 mpx, (en cada foto se capturaba una regla milimétrica como patrón de referencia) desde el día 1 al 20, hasta que la herida cicatrizó por completo en el control negativo. Después de capturar las imágenes, se midió el área (mm<sup>2</sup>) de la herida con el programa informático Image J 1.5.k, usando como referencia la regla milimétrica en cada foto (Anexo 9). Los resultados se expresaron en % de cierre de herida y se calcularon de acuerdo a la siguiente ecuación.

$$\% \text{ de cierre de herida} = \frac{\text{Area inicial} - \text{Area de herida}}{\text{Area inicial}} \times 100$$

**Tabla.- 4 Tratamientos del ensayo de cicatrización**

Ensayo de cicatrización				
Tratamiento	Concentración	Cantidad volumétrica	Sólidos en mg.	Nota
β-Sitosterol (1%)	10 mg/mL	200 µL	2 mg.	Control +
s/n tratamiento	NA	NA		Control -
Extracto microfiltrado (5%)	50 mg/mL	200 µL	10 mg.	
Encapsulado A0EM (5% de extracto)	5 mg/mL	200µL	10 mg.	

#### **4.6.5.1 Análisis estadístico del ensayo de cicatrización.**

Los datos obtenidos del porcentaje de cierre de herida se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA). Los datos experimentales se muestran como el promedio en porcentaje  $\pm$  desviación estándar para los diferentes tratamientos. Para determinar las diferencias entre las medias se empleó un test de rango múltiple a un nivel de confianza de 95% ( $p < 0.05$ ), utilizando los métodos Dunnett y Scheffé. EL análisis se realizó en el software originlab 2015.

#### **4.6.6. Comprobación histológica.**

Este ensayo se realizó con base a la metodología de Arellano, (2014).

Las muestras fueron obtenidas del ensayo 4.6.3. Se recuperan tejidos en los días 1,5,10, 15 y 20. Los tejidos epidérmicos de las heridas, fueron colocados en paraformaldehído al 4 % en solución buffer de fosfatos PBS durante 15 días. Posteriormente se llevó el proceso de deshidratación. Después los tejidos fueron colocados en parafina a 60 °C durante 24 horas, a continuación, se realizó la inclusión en los moldes y se efectuarán los cortes histológicos a 4 µm. Para la observación de los tejidos, estos se desparafinaron, se hidrataron y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Las muestras fueron observadas con un microscopio de campo claro, con un objetivo 10x.

## V.- RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 5.1.1 MATERIAL A ENCAPSULAR Y CARACTERIZACIÓN.

#### 5.1.1.1 Extracción de metabolitos secundarios.

Se obtuvo un extracto etanólico de *Chenopodium murale*, con un volumen final de 300ml. Se recuperó el 85.7% del volumen inicial debido a que los sólidos precipitados después de la centrifugación conservan una fracción del solvente, aunado a la alta volatilización del etanol.

#### 5.1.1.2 Extracto microfiltrado.

Se obtuvo un extracto microfiltrado de *Chenopodium murale* con un volumen final de 167ml. Se recuperó el 83.5% del volumen inicial, debido a que parte del fluido se retiene en el filtro y en los conductos.

#### 5.1.2 Determinación de sólidos totales.

Se terminó por triplicado los sólidos totales del extracto y del extracto microfiltrado como se muestra en la tabla 5, se indica la cantidad de miligramos de sólidos por cada gramo y mililitro de extracto.

Tabla.- 5 Determinación de sólidos totales.

	mg de sólidos totales /g de extracto	mg de sólidos totales /mL de extracto
Extracto	9.822± 0.046	8.25 ± 0.129
Microfiltrado	7.270 ± 0.091	6.11± 0.098

Los resultados representan promedio ± desviación estándar de una n=3.

El extracto etanólico contiene 9.822± 0.046 mg de sólidos totales /g de extracto o 8.25 ± 0.129 mg de sólidos totales /mL de extracto, mientras que el extracto microfiltrado presenta una menor cantidad de sólidos (7.270 ± 0.091 mg/g o 6.11± 0.098mg/mL. Esta reducción de sólidos es atribuida al proceso de microfiltración, debido a que componentes con tamaño superiores a 50 nm (diámetro de poro de la membrana) son retenidos. De acuerdo a Cáceres *et al.*, (2003), la microfiltración

tangencial puede remover solidos insolubles, polisacáridos parietales como sustancias pécticas, celulosa, hemicelulosa, lignina, por lo tanto la reducción de sólidos en el extracto microfiltrado de *Chenopodium murale* puede ser causado por este tipo de remoción.

### 5.1.3 Determinación de rendimientos.

Se determinó el rendimiento del extracto total y extracto microfiltrado de *Chenopodium murale*. En la tabla 6 se muestra los resultados expresados en unidades de mg/gramo de muestra vegetal. Se obtuvo alrededor de 9.9 % de recuperación para el extracto total y 7.3 % el extracto microfiltrado.

Tabla.- 6 Rendimientos de extracción.

Extracto total.	$Y_{sw} = 99.05 \pm 0.566$ mg/g de planta
Extracto microfiltrado.	$Y_{sw} = 73.32 \pm 0.327$ mg/g de planta
Porcentaje de extracto microfiltrado recuperado respecto al extracto total.	$74.02 \pm 3.19$ %

Dónde:  $Y_{sw}$ =rendimiento en base húmeda (mg de solidos/g de muestra vegetal). Los resultados representan promedio  $\pm$  desviación estándar de una  $n=3$ .

El rendimiento del extracto microfiltrado respecto al extracto total, muestra que alrededor del 25.73 mg de solidos /g de solidos planta de es retenido por la membrana, lo que indica que el porcentaje restante, son moléculas de tamaño inferior a 0.05 micras que corresponde al corte molecular de filtro. Un alto rendimiento podría indicar que la mayor cantidad de metabolitos se conservan, sin embargo, esto se corrobora con los ensayos de tamiz fitoquímico y análisis FT-IR. El proceso microfiltración se puede aplicar como un pretratamiento para eliminar sólidos, polisacáridos, desechos celulares y otros materiales presentes en la solución, que por lo general no puede eliminarse por filtración convencional. (dos Santos., *et al* 2016). Este proceso de microfiltración permite la clarificación del extracto, el cual puede facilitar el proceso de encapsulación.

#### 5.1.4 Análisis preliminar fitoquímico.

Se realizó este estudio para determinar los metabolitos presentes en el extracto total de *Chenopodium murale* y para el extracto microfiltrado. La tabla 7 muestra los resultados obtenidos.

Tabla.- 7 Análisis preliminar fitoquímico.

<b>Metabolito</b>	<b>Reacción</b>	<b><i>Chenopodium murale</i></b>	<b><i>Extracto microfiltrado.</i></b>
<b>Fenoles</b>	Cloruro férrico	++	+
<b>Alcaloides</b>	Dragendorff	-	-
	Wagner	-	-
	Mayer	+	+
<b>Flavonoides</b>	Shinoda	-	-
	Hidróxido de sodio al 10%	++	+
<b>Cumarinas</b>	Erlich	-	-
	Con Hidróxido de amonio	-	-
<b>Sesquiterpenlactonas</b>	Con hidróxido férrico	-	-
<b>Azucares Reductores</b>	Fehling	-	-
	Benedict	-	-
<b>Taninos</b>	Cloruro férrico	+	+
	Gelatina	-	-
	Ferricianuro de potasio	-	-
<b>Glicósidos cardiacos</b>	De Legal	-	-
	De Baljet	-	-
<b>Glicósidos cianogénicos</b>	Grignard	-	-
<b>Quinonas</b>	Con ácido sulfúrico	-	-

<b>Saponinas</b>	De Lieberman-Bouchard	++	+
	Rosenthaler	-	-
<b>Esteroides</b>	Ácido sulfúrico.	++	+

El símbolo (+) indica presencia del metabolito y (-) indica la ausencia del metabolito. Resultados expresados con una n=3.

#### 5.1.4.1 Fenoles.

La presencia de fenoles concuerda con estudios actuales por Abdelghany *et al.*,2015; Abdel-Aziz, *et al.*,2014, donde muestran la presencia de compuestos fenólicos en extractos de *Chenopodium murale*.

Este metabolito se encuentra presente en ambas muestras, sin embargo, en el extracto microfiltrado se observó una menor presencia. Esto puede deberse al proceso de microfiltración, ya que después de esta operación hay una disminución de sólidos totales en el extracto, como se mostró en la tabla 5 y 6. La microfiltración tangencial puede remover algunos componentes como proteínas de constitución, ácidos fenólicos, taninos etc.,( Cáceres *et al.*, 2003).

Los compuestos poli- fenólicos, como los taninos, tienen una masa molecular relativamente alta (500-20000 Da), estos se clasifican en condensados , de origen flavonoide, hidrolizables, de origen no flavonoide, florotanninos y taninos de tipo complejo, (Olivas-Aguirre, 2015). La ultrafiltración puede remover compuesto mayores a 10nm, en nuestro caso usamos una membrana con poro de 50nm, que podría tener un corte molecular de 12,500 Da.

El interés de identificar la presencia de estos metabolitos en ambos extractos se debe a que estos tienen actividades antiinflamatorias, antioxidantes cuando son usados de manera tópica. Además, existe una creciente evidencia sobre el uso de compuestos fenólicos en la promoción de la recuperación de las condiciones de la piel, tales como cicatrización de heridas y reparación de tejidos. (Menaar, *et al.*, 2014).

#### **5.1.4.2 Alcaloides.**

Los alcaloides son metabolitos que se encuentran comúnmente en la familia de *Chenopodiaceae*, de acuerdo con lo reportado por Ibrahim, *et al.*, 2007 y que concuerda con lo que se reporta en este trabajo.

Estos metabolitos solo se encontraron la reacción de Mayer, tanto en el extracto total como en el microfiltrado.

De acuerdo con Tiwari, *et al.*, (2011) y Kokanova-Nedialkova, (2009) los alcaloides encontrados en plantas como *Chenopodium murale*, son compuestos nitrogenados heterocíclicos como: berberina, piperina, palmatina y tetrahidropalmatina, los cuales presentan actividad antimicrobiana Antihelmíntica, y antidiarreica. Siendo la actividad antimicrobiana de gran interés en este estudio.

#### **5.1.4.3 Flavonoides**

Los flavonoides que dieron resultado positivo solo fueron en el ensayo con hidróxido de sodio al 10%. En el extracto total de *Chenopodium murale* se observó mayor presencia de flavonoides que en el extracto microfiltrado, de manera similar a lo que sucedió con la determinación de fenoles, esto se puede atribuir a la operación de microfiltración y a la retención de sólidos que posiblemente contengan metabolitos. La presencia de estos metabolitos concuerda con lo reportado por Ibrahim, *et al.*, (2007) y Hs *et al.*, (2016) que indican la presencia de flavonoides en *Chenopodium murale* y que flavonoides de extractos etanólico y acuosos tienen una respuesta antiinflamatoria.

Actualmente Singhai, *et al.*, 2013 han reportado que extractos etanolitos con contenido de flavonoides como la luteína reducen el período de inflamación durante el proceso de cicatrización y genera resistencia a infecciones.

#### **5.4.4 Taninos**

La presencia de taninos fue positiva en la reacción de Cloruro férrico para el extracto total de *Chenopodium murale* y el microfiltrado del extracto. Visualmente la diferencia de concentración era poco notoria en ambas muestras. Esto puede ser debido al peso molecular de los taninos, lo que les permite ser más permeables.

La presencia de taninos es concurrente en la familia *Chenopodiaceae* (Petersen *et al.*, 1999, 2010). De acuerdo con Wink, *et al.*, (2010) este tipo de metabolito es de bajo peso molecular y funge como mecanismo de defensa constitutivo en las plantas contra bacterias, hongos y virus.

#### **5.4.5 Saponinas**

Las saponinas dieron resultado positivo en la reacción de Lieberman-Bouchard, indicando que son saponinas esteroideas, de manera visual se presentó mayor cantidad de metabolitos en el extracto total de *Chenopodium murale* que en el extracto microfiltrado.

De acuerdo con Romo *et al.*, (2006) alrededor del 88% de las familias de las plantas estudiadas en México contienen este metabolito secundario, por ejemplo; Fiallos, *et al.*, (2016) concuerda con la presencia de saponinas en *Chenopodium quinoa*, que pertenece a la familia de *Chenopodiaceae*.

#### **5.4.6 Esteroides**

La presencia de esteroides se encuentra en ambos extractos, visualmente el extracto total contenía mayor cantidad del metabolito. Los esteroides se encuentran presentes en todas plantas de la familia *Chenopodiaceae* (Ibrahim *et al.*, 2007), lo que concuerda con el resultado obtenido.

En el ensayo ambos extractos mostraron después de la reacción un color rojizo que es indicio de la existencia de triterpenos. Esto puede ser debido a que los esteroides se derivan de triterpenos tetracíclicos y poseen un esqueleto de Ciclopentanoperhidrofenantreno (James, 2003).

La presencia de triterpenos y esteroides puede ser beneficiar al proceso de cicatrización debido a la actividad antiinflamatoria y antibacteriana que presentan algunos de estos metabolitos (Sandjo, *et al.*, 2013). Además de que los esteroides son responsables de actividad proangiogénica (Strodtbeck, 2001).

## 5.5.0 Cuantificación de metabolitos secundarios.

### 5.1.5.1 Cuantificación de Fenoles totales.

Los compuestos fenólicos son muy importantes como constituyentes en las plantas debido a su habilidad para secuestrar radicales libres y que está relacionada con la presencia en la molécula del grupo hidroxilo (Valenzuela *et al.*, 2014). Se realizó la cuantificación de fenoles del extracto total y del extracto microfiltrado obteniendo  $5.553 \pm 0.095$  y  $4.447 \pm 0.0290$  mg de ácido gálico por gramo de planta respectivamente. La tabla numero 6 muestra los resultados obtenidos.

De acuerdo Abdel *et al.*, 2013 indican que obtuvieron en la cuantificación de fenoles  $74.9 \pm 0.23$  mg EAG /g de extracto seco (extracción solido-liquido 6 h, hidroalcohólica 80:20 v/v), por otra parte, Hsu, *et al.*, (2016) indican que obtuvieron 2.1 mg/g de extracto seco(extracción solido-liquido 6 h, hidroalcohólica 50:50 v/v), ambos resultados de extractos de plantas de la familia *Chenopodiaceae*, sin embargo, en este trabajo se obtuvo  $60.665 \pm 2.217$  mg EAG. /g de extracto seco de *Chenopodium murale*. Esta discrepancia en los resultados puede ser debida a los diferentes procesos de extracción realizados en cada investigación.

Tabla.- 8 Resultados de cuantificación de Fenoles.

Extracto	Concentración de ácido gálico (mg/mL)	C <sub>Fenoles</sub> [mg eq. de ácido gálico /g de planta]	C <sub>Fenoles</sub> [mg eq. de ácido gálico / g de extracto seco]
<i>Chenopodium murale</i>	$0.462 \pm 0.029$	$5.553 \pm 0.095$	$56.436 \pm 0.966$
<i>Chenopodium murale</i> microfiltrado	$0.370 \pm 0.013$	$4.447 \pm 0.290$	$60.665 \pm 2.217$

Los resultados representan promedio  $\pm$  desviación estándar de una n=3.

Los resultados de la tabla 8 muestran claramente la disminución de los compuestos fenólicos después del proceso de microfiltración y se confirma lo descrito en el punto 5.1.4.1 respecto a la influencia del proceso de microfiltración. De acuerdo con

Giacobbo *et al.*, (2015) la microfiltración es un método para recuperar compuestos fenólicos como polifenoles (taninos, flavonoides) y mencionan que, a mayores factores de dilución mayor permeado, también indican que las membranas con poro de mayor tamaño tienden a un menor flujo de permeado. Esto factores pueden estar relacionados en este trabajo en el proceso de recuperación fenoles durante el proceso de microfiltración.

### 5.1.5.2 Cuantificación de taninos.

Los taninos constituyen un grupo de sustancias ampliamente distribuidas en el reino vegetal, se presentan como mezclas de polifenoles, muy difíciles de separar, con el agua forman soluciones coloidales de reacción ácida y sabor astringente (Casanova *et al.*, 2015). Se llevó acabo la cuantificación de taninos en extracto total y el extracto microfiltrado obteniendo  $0.546 \pm 0.035$  y  $0.415 \pm 0.009$  miligramos equivalentes de ácido tánico por cada gramo de planta respectivamente, como se observa en la tabla 9.

Se obtuvo alrededor de un 76 % de recuperación de taninos después del proceso de microfiltración, un porcentaje similar al de los flavonoides recuperados.

Se realizó una revisión bibliográfica en investigaciones relacionadas a la cuantificación de taninos de familia Chenopodiaceae, pero actualmente solo se indica la presencia de los metabolitos en trabajos de: De la torre *et al.*, 2013; Paixão, *et al.*, 2014; Wink, *et al.*, 2010.

**Tabla.- 9 Resultados de cuantificación de taninos.**

Extracto	Concentración de ácido tánico (mg/mL)	C <sub>taninos</sub> [mg eq. de ácido tánico/g de planta]	C <sub>taninos</sub> [mg eq. de ácido tánico/g de extracto seco]
<i>Chenopodium murale</i>	$0.045 \pm 0.002$	$0.546 \pm 0.035$	$7.45 \pm 0.486$
<i>Chenopodium murale</i> microfiltrado	$0.034 \pm 0.001$	$0.415 \pm 0.009$	$4.221 \pm 0.165$

Los resultados representan promedio  $\pm$  desviación estándar de una n=3.

### 5.1.5.3 Cuantificación de Flavonoides totales.

Los resultados de este ensayo revelaron que el extracto etanólico de *Chenopodium murale* y del extracto microfiltrado tienen  $1.64 \pm 0.025$  y  $1.29 \pm 0.030$  miligramos equivalentes de quercetina por cada gramo de planta, como se observa en la tabla 10. Después del proceso de microfiltración se recupera alrededor del 78 % de flavonoides. La cantidad menor de flavonoides en comparación a fenoles es debido a que los flavonoides son un subgrupo de los compuestos fenólicos y estos pueden representar una fracción de estos.

Tabla.- 10 Resultados de Cuantificación de Flavonoides totales.

Extracto	Concentración mg de quercetina/mL	C <sub>Flavonoides</sub> [mg eq. de quercetina /g de planta]	C <sub>Flavonoides</sub> [mg eq. de quercetina /g de extracto seco]
<i>Chenopodium murale</i>	$0.136 \pm 0.002$	$1.64 \pm 0.025$	$16.66 \pm 0.263$
<i>Chenopodium murale</i> microfiltrado	$0.108 \pm 0.002$	$1.29 \pm 0.030$	$17.69 \pm 0.413$

Los resultados representan promedio  $\pm$  desviación estándar de una n=3.  
Extracto seco equivale a 1 gramo de sólidos libre de disolvente.

En esta determinación se obtuvo  $16.66 \pm 0.263$  extracto mg eq. de quercetina /gramo de extracto seco de *Chenopodium murale*. Trabajos actuales han reportado el contenido de flavonoides;  $12.77 \pm 0.07$  mg eq. de quercetina /g de extracto seco en *Chenopodium murale* por Abdel *et al.*, (2013), 7.9 mg eq. de quercetina /g de extracto seco de *Chenopodium formosanum*, por Hsu, *et al.*, (2016) y  $2.53 \pm 0.05$  mg eq. de quercetina /g de extracto seco de *Chenopodium album L.* por Arora *et al.*, (2016). En comparación a lo reportado por estos autores, el extracto etanólico obtenido tiene mayor cantidad de flavonoides. Sin embargo, los valores reportados por estos autores no son cercanos entre sí aun siendo de la familia

Chenopodiaceae, debido a que diversos factores como el método de extracción y la condiciones en donde se desarrollaron las plantas (Barrón *et al.*, 2011).

#### 5.1.5.4 Cuantificación de esteroides.

Los resultados de este ensayo arrojaron que el extracto de *Chenopodium murale* y del extracto microfiltrado tienen  $10.462 \pm 0.016$  y  $9.627 \pm 0.006$  miligramos equivalentes de colesterol por cada gramo de planta, como se observa en la tabla 11. Se recuperó cerca del 92% de esteroides después del proceso de microfiltración, siendo el metabolito con mayor porcentaje de recuperación y posiblemente el más abundante.

De acuerdo con Castillo *et al.* 2014; TrivellatoGrassi *et al.* 2013; Ibrahim *et al.*, 2007, indican la presencia de triterpenos y esteroides en la familia de Chenopodiaceae, pero no muestran ensayos de cuantificación para este metabolito.

En la investigación de Arellano, (2014) indica que el contenido  $179.55 \pm 5.499$  mg eq. de colesterol / g de muestra, en un extracto cetónico de hojas de *Chenopodium murale*. Este valor es mayor al de nuestro extracto etanólico de  $106.328 \pm 0.163$  mg eq. de colesterol / g de extracto seco, donde se empleó el extracto de la planta completa de *Chenopodium murale*. Un menor contenido de esteroides en extractos etanólicos respecto a cetónicos, puede estar relacionado a la solubilidad de los esteroides, siendo más solubles en solventes orgánicos como la acetona y el éter, Guerrero, 2004.

Tabla.- 11 Resultados de cuantificación de esteroides.

Extracto	Concentración mg colesterol /mL	C <sub>Esteroides</sub> [mg eq. de colesterol /g de planta]	C <sub>Esteroides</sub> [mg eq. de colesterol /g de extracto seco]
<i>Chenopodium murale</i>	$0.871 \pm 0.001$	$10.462 \pm 0.016$	$106.328 \pm 0.163$
<i>Chenopodium murale</i> microfiltrado	$0.802 \pm 0.005$	$9.627 \pm 0.006$	$131.310 \pm 0.084$

Los resultados representan promedio  $\pm$  desviación estándar de una n=3.

### 5.1.6.0 Determinación de actividad antioxidante.

La capacidad antioxidante total de un compuesto consiste en determinar la actividad del antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical.

Los métodos más aplicados son ABTS y DPPH, los cuales presentan una excelente estabilidad en ciertas condiciones (Kuskoski *et al.*,2005)

#### 5.1.6.1 Actividad antioxidante por el método de DPPH

Se determinó la actividad antioxidante del extracto etanólico y del extracto microfiltrado. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 12 donde el extracto etanólico presentó  $64.478 \pm 0.0679$  % de capacidad antioxidante y el extracto microfiltrado  $56.65 \pm 0.0266$  % de capacidad antioxidante. La actividad antioxidante puede ser atribuida al contenido de compuestos fenólicos flavonoides y taninos reportados en el preliminar fitoquímico y confirmado por la cuantificación de los mismos.

Alrededor del 88 % de la actividad antioxidante se conservó después del proceso de microfiltración. De acuerdo con Coronado *et al.*, (2015), el contenido de fenoles y flavonoides está relacionado a la actividad antioxidante.

Tabla.- 12 Resultados de la actividad antioxidante por el método de DPPH.

Extracto	% de inhibición	Concentración de asc ( $\mu\text{g Asc/mL}$ de extracto)	Concentración de Trolox ( $\mu\text{M /g}$ de extracto seco)
<i>Chenopodium murale</i>	$64.478 \pm 0.0679$	$167.190 \pm 6.184$	$832.204 \pm 31.387$
<i>Chenopodium murale</i> microfiltrado	$56.65 \pm 0.0266$	$146.785 \pm 4.899$	$977.875 \pm 33.309$

Los resultados representan promedio  $\pm$  desviación estándar de una n=3.

Shivhare *et al.*, (2010), reportan un valor de  $129.20 \pm 2.10$   $\mu\text{g}$  de ácido ascórbico /mL, en un extracto metanólico de *Chenopodium album* Linn, por otra parte, Baldi *et al.*, (2013) indican el contenido de  $58.21 \pm 1.11$  de ácido ascórbico  $\mu\text{g/mL}$ , en un extracto etanólico de *Chenopodium álbum* con una concentración de 100  $\mu\text{g}$  extracto seco/ml. En este trabajo se obtuvo  $167.190 \pm 6.184$   $\mu\text{g}$  de ácido ascórbico

/ml, en un extracto total de *Chenopodium murale*, lo que indica que se obtuvo una alta actividad antioxidante respecto a extractos de plantas de la misma familia (Chenopodiaceae). Por otra parte, Ibarra-Alvarado ,(2010), reporta un valor de 868.9  $\mu\text{M}$  eq. a Trolox /g de extracto seco, en un extracto acuoso de *Chenopodium m*, semejante al valor obtenido del extracto etanólico de *Chenopodium m*, con  $832.204 \pm 31.387$   $\mu\text{M}$  eq. a Trolox /g de extracto seco.

### 5.1.6.2 Actividad antioxidante por el método de ABTS

Se determinó la actividad antioxidante (Tabla 13) del extracto etanólico y del extracto microfiltrado obteniendo en porcentaje la capacidad antioxidante de  $90.197 \pm 0.067$  y  $79.197 \pm 0.0266$  respectivamente. Se conservó cerca 87% de la actividad antioxidante después del proceso de microfiltración. La presencia de los metabolitos secundarios como los compuestos fenólicos donde se incluyen los flavonoides y taninos está relacionado a la capacidad antioxidante que presentan los extractos (Guerrero, 2004).

En el extracto total de *Chenopodium murale* se obtuvo  $828.964 \pm 0.479$   $\mu\text{M}$  eq. de Trolox /g de extracto seco, valor semejante al que reporta Arvizu en 2009 de un extracto acuoso de *Chenopodium murale* con un valor de  $805.625 \pm 0.010$   $\mu\text{M}$  eq. de Trolox /g de extracto seco. También se obtuvo la cantidad de  $127.010 \pm 3.241$   $\mu\text{g}$  eq. de Ácido ascórbico /mL de extracto, con el fin de reportar la actividad con otro antioxidante.

Tabla.- 13 Resultados de la actividad antioxidante por el método de ABTS.

Extracto	% de inhibición	Concentración de asc ( $\mu\text{g}$ Asc/mL de extracto)	Concentración de trolox ( $\mu\text{M}$ /g de extracto seco)
<i>Chenopodium murale</i>	$90.197 \pm 0.067$	$127.010 \pm 3.241$	$828.964 \pm 0.479$
<i>Chenopodium murale</i> microfiltrado	$79.197 \pm 0.0266$	$100.789 \pm 8.952$	$976.410 \pm 0.945$

Los resultados representan promedio  $\pm$  desviación estándar de una n=3.

### 5.1.7.0 Análisis estructural mediante FT- IR en el proceso de extracción

De acuerdo con Sun *et al.*, (2009) la espectroscopia FT-MIR monitorea el estiramiento vibracional y rotatorio fundamental de las moléculas, lo que produce un perfil químico de la muestra. Las moléculas absorben la energía del infrarrojo medio y exhiben movimientos de estiramiento, flexión, torsión, balanceo y tijera en una o más localizaciones del espectro, dependiendo de varios factores incluyendo la configuración del enlace, ubicación, etc.

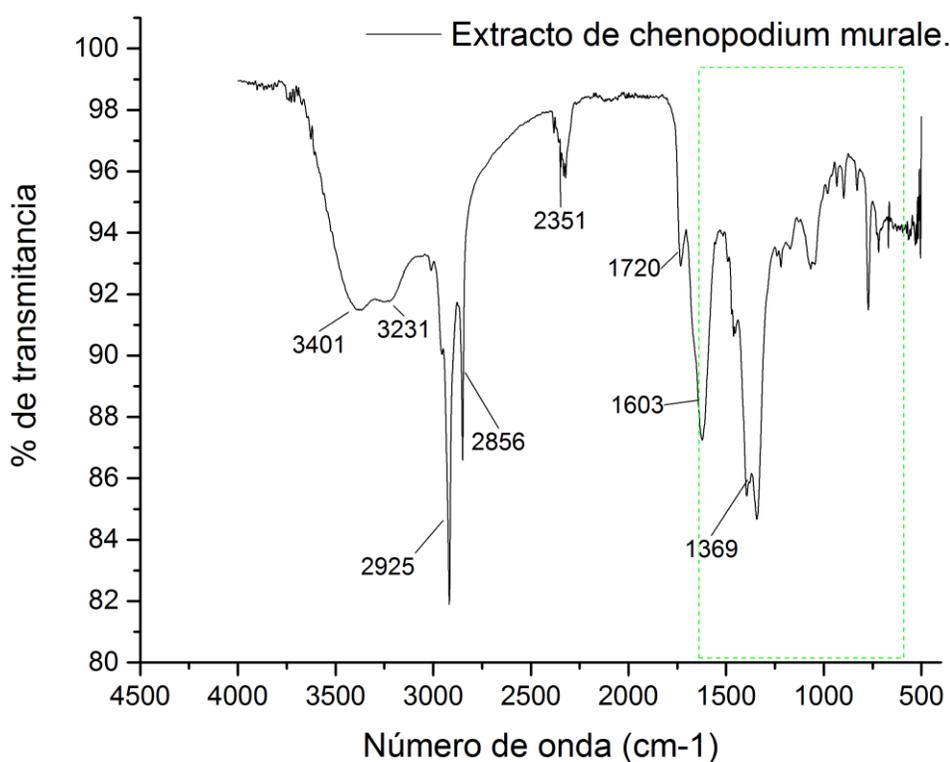
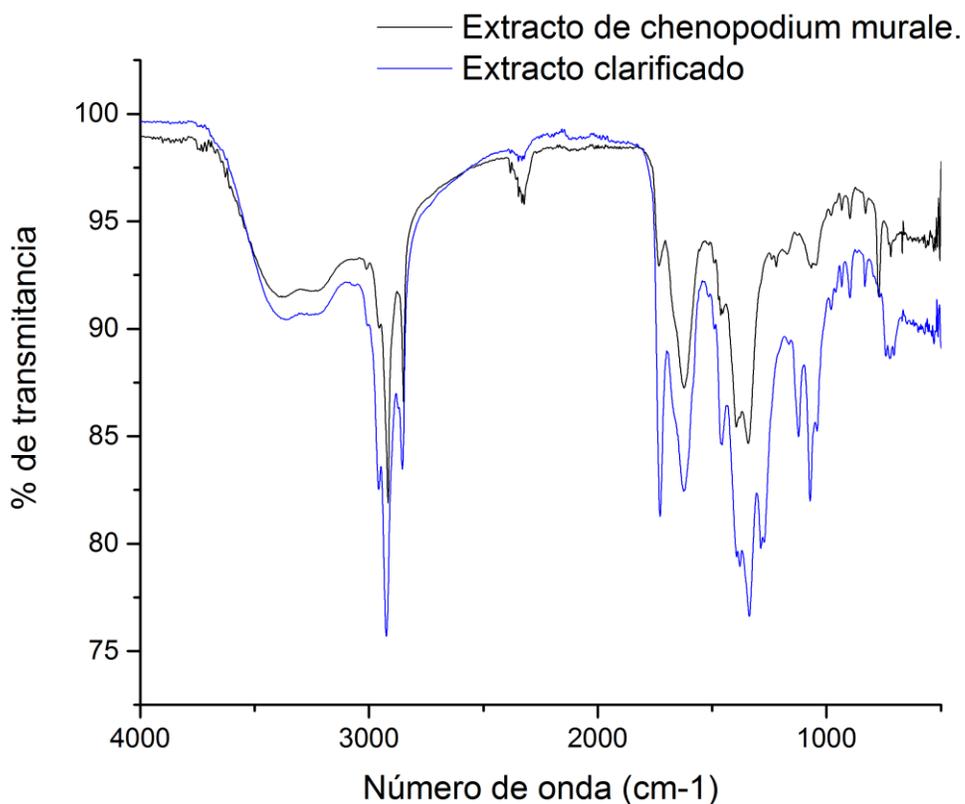


Figura.- 6 Espectro infrarrojo de *Chenopodium murale*.

El espectro infrarrojo del extracto de *Chenopodium murale* (figura 6) muestra picos en 3401 y en 3231  $\text{cm}^{-1}$  que corresponden al grupo funcional O-H con vibración en modo de tensión, de la familia de alcoholes y fenoles. Debido a que son picos anchos y se encuentran en la banda de 3200 a 3400, se puede atribuir a la presencia de polímeros. Los picos 2925 y 2856  $\text{cm}^{-1}$  corresponden al grupo funcional -COOH

(dímero) que se encuentra en las bandas de 2500 a 3000 que se deben a la vibración en modo tensión O-H y pertenecen a la familia de los ácidos.

El pico débil en  $235\text{ cm}^{-1}$  corresponde a la banda de 2100 a 2200 que indica la presencia del grupo funcional  $\text{C}=\text{C}$  de la familia de los alquinos. El pico en 1720 corresponde al grupo funcional  $\alpha, \beta$ - no saturado, de la vibración en modo tensión  $\text{C}=\text{O}$  característicos de los ésteres. El pico  $1603\text{ cm}^{-1}$  corresponde a la familia de las amidas con el grupo funcional  $\text{RCONH}_2$  (primaria) debido a la vibración en modo de deformación NH (banda II). El pico  $1369\text{ cm}^{-1}$  corresponde al grupo funcional  $\text{CH}_3$  de la familia de los alcanos, debido a que es una señal fuerte dentro de las bandas  $1370 - 1385\text{ cm}^{-1}$  y a la vibración en modo de deformación simétrica ( $\delta$  C-H). Lo que concuerda con el estudio de Abdelghany *et al.*, (2015) en un extracto de hojas de *Chenopodium murale*, donde reportan los siguientes picos 1050, 1390, 1625, 2922,  $3440\text{ cm}^{-1}$  que corresponden a los grupos C-H en el plano de aromáticos, C-N de la amina aromática, grupos carbonilo ( $\text{C}=\text{O}$ ),  $\text{CH}_2$  asimétrico y grupo  $-\text{COOH}$  respectivamente. La sección resaltada en color verde indica la región de huella digital que caracteriza y hace único el espectro del *Chenopodium murale*.



**Figura.- 7 Espectro infrarrojo de *Chenopodium murale* y extracto clarificado.**

La figura 7 muestra los espectros infrarrojos del extracto total y el extracto microfiltrado o clarificado, donde se puede observar la similitud de ambas muestras, sin embargo, en la región de 1200 a 1300  $\text{cm}^{-1}$  del extracto clarificado, las señales incrementan, esto puede ser debido a que el proceso de microfiltración puede retener macro componentes que pueden interferir en la lectura de la muestra.

En ambos extractos se encuentran los grupos funcionales descritos en la figura 8, lo que indica la preservación de los componentes después del proceso de microfiltración.

De acuerdo Abdelghany *et al.*, (2015) las señales en 1700 y 600  $\text{cm}^{-1}$  permiten identificar perfiles específicos que son típicos de las diferentes moléculas de hidroxilo aromático que constituyen fenoles de tipo tanino. Los taninos que pertenecen a la familia "hidrolizable", presentan una intensa absorción en la región

del C=O en torno a 1700 cm<sup>-1</sup> y también dos grandes bandas en torno a 1315 y 1180 cm<sup>-1</sup> que se corresponden grupo C-O aromático.

Por otra parte, las bandas de absorción con un máximo a 1233 cm<sup>-1</sup> se asigna al estiramiento de los anillos de pirano, típicos de los compuestos flavonoides. Bandas que aparecen entre 1300 y 1380 cm<sup>-1</sup> asignadas al enlace C-O muestra deformidades angulares de fenoles. (Ortega, *et al.*, 2007).

#### 5.1.8.0. Ensayo de cierre de herida visual del extracto total.

El objetivo de este ensayo fue mostrar de manera preliminar el comportamiento del cierre de herida, utilizando el extracto total de *Chenopodium murale*, un control positivo y negativo.

Para la evaluación del efecto cicatrizante visual- macroscópico, se seleccionó del grupo, un sujeto de estudio que mostrara visualmente el mismo comportamiento del grupo correspondiente y se colocaron fotos de las heridas de los días 1,3, 6, 9 y 10 que se muestran en la figura 7.

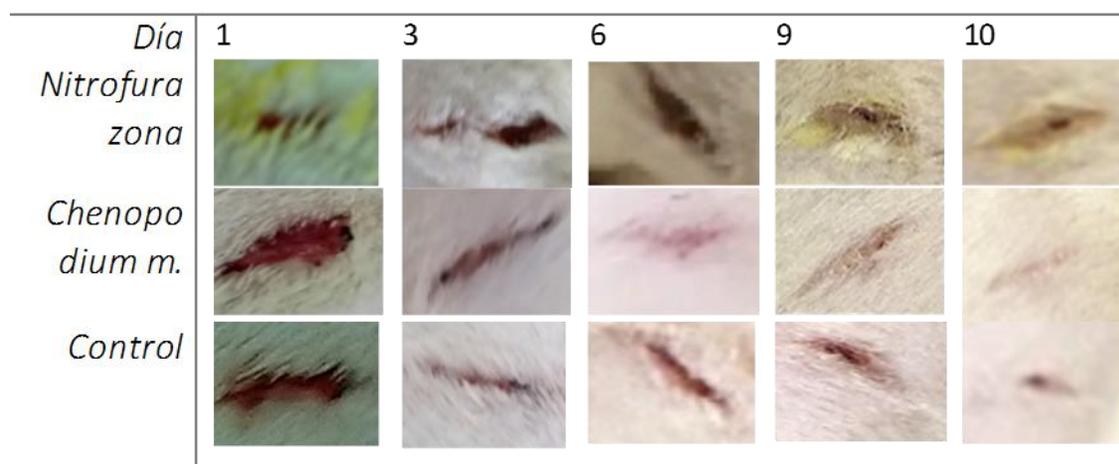


Figura.- 8 Resultados del efecto cicatrizante de *Chenopodium murale*

Cada grupo reveló el cierre de la herida en diferentes tiempos. El grupo tratado con *Chenopodium murale*, mostró un mayor efecto de cicatrización de heridas, en comparación a la pomada de nitrofurazona.

Aproximadamente el 50% de forma visual, del cierre de las heridas se logró en los días 6 y 7 para el extracto de *Chenopodium murale* y nitrofurazona respectivamente. Estudios de TrivellatoGrassi *et al.*, 2013 reportan resultados similares, mostrando que el 50% del cierre de las heridas se llevó acabo en el séptimo día debido al empleo de un extracto etanólico de *Chenopodium ambrosioides* comparado con un control negativo (sin tratamiento).

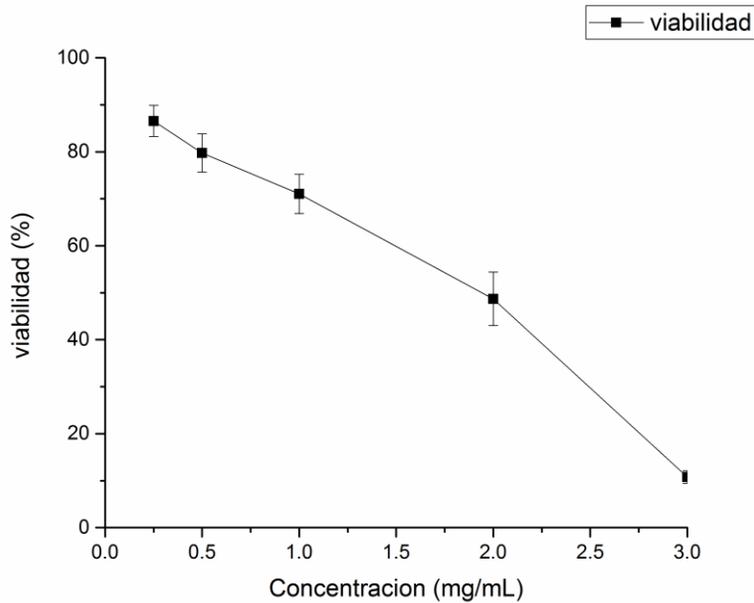
El análisis macroscópico de las heridas cutáneas en animales tratados con el extracto total, mostro la evolución de la reparación tisular, la ausencia de sangrado y secreciones purulentas, en comparación con el control negativo.

Este ensayo visual macroscópico mostró el efecto cicatrizante del extracto etanólico de *Chenopodium murale*, sin embargo, en la última sección de esta investigación se muestran un ensayo cuantitavo; del porcentaje del cierre de herida, además de la comparación de nuevos grupos que incluyen el encapsulado y un control positivo de origen natural.

#### **5.1.9.0. Ensayo de citotoxicidad.**

Debido a que las plantas se derivan de fuentes naturales, los medicamentos a base de hierbas, tinturas, extractos, resinas y látex, a menudo se presentan como libres de efectos secundarios. Sin embargo, es necesario llevar a cabo estudios de toxicidad en plantas medicinales a pesar de que se han utilizado durante décadas para determinar sus posibles niveles de toxicidad (Jesus *et al.*, 2012).

Se determino el porcentaje viabilidad de la línea celular Cho-k1, mediante el ensayo de viabilidad colorimétrico basado en la reducción enzimática de la molécula de Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), a diferentes concentraciones del extracto etanólico microfiltrado de *Chenopodium murale*.



**Figura.- 9 Porcentaje de viabilidad de fibroblastos Cho-k1**

EL extracto de *Chenopodium murale* mostró un IC50 de  $1.702 \pm 0.251$  mg/mL, que indica la concentración inhibitoria del 50% de células, e indica que a esta concentración se preserva 50% de viabilidad celular.

Las concentraciones obtenidas inferiores al IC50 ( $1.702 \pm 0.251$  mg/mL) en este ensayo permiten conocer el rango de operación para hacer ensayos posteriores a esta investigación, *in vitro* de cicatrización como el ensayo “scratch”, con el fin de determinar el índice terapéutico.

El estudio de citotoxicidad de Azevedo, *et al.* (2014), indica que el extracto etanólico de *Dilodendron bipinnatum Radlk* no se considera citotóxico en células CHO-k1 debido a que reportan un IC50 de  $0.118 \pm 1.55$  mg/mL. De acuerdo con esto, se puede inferir que el extracto de *Chenopodium murale* no se considera citotóxico ya que se requiere que tenga una concentración 13 veces mayor para que cause el mismo efecto citotóxico del extracto de *Dilodendron bipinnatum Radlk* (considerado un IC50 altamente toxico de 0.0003 mg/mL). Además, Froelich *et al.*, (2007) indica que entre menor sea el valor de IC50 mayor es la citotoxicidad.

Los datos publicados sobre las propiedades citotóxicas y anticancerígenas de las especies de Chenopodiaceae son limitados y de acuerdo con la literatura, C.

ambrosioides es el más activo en la inhibición de la polimerización de cromosomas humanos (Potawale *et al.*, 2008 y Nascimento *et al.*,2006). Por otra parte Nowak *et al.*,(2016) indican que extractos etanólicos de algunas especies de *Chenopodium* (*Chenopodium album*, *Chenopodium hybridum*, *Chenopodium rubrum* y *Chenopodium urbicum*) podrían suprimir las células cancerosas que se multiplican *in vitro*, desafortunadamente, sus propiedades a menudo van acompañadas de una alta toxicidad en los fibroblastos de la piel, por ello fue importante determinar la no citotoxicidad *Chenopodium murale*, ya que su administración será vía tópica.

## **5.2.0 DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DEL TRANSPORTADOR.**

Las vesículas fueron obtenidas de acuerdo con la sección 4.3.1. a través del método de inyección fría: mediante el autoensamblamiento de los lípidos, promovido por las fuerzas hidrófobas de afinidad, las interacciones de Vander Waals, fuerzas de hidratación e interacciones electrostáticas que poseen las cadenas hidrocarbonadas dispersas en el medio hidroalcohólico. Las formulaciones de la tabla 3 se caracterizaron de acuerdo con la sección 4.4.

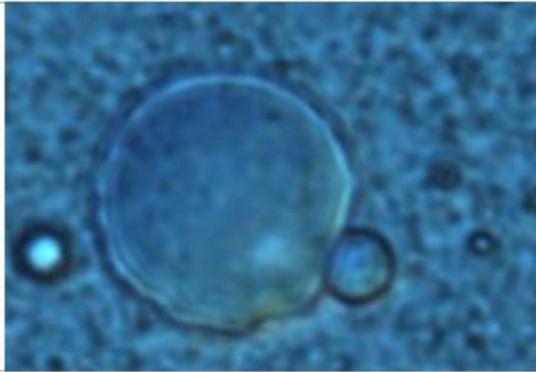
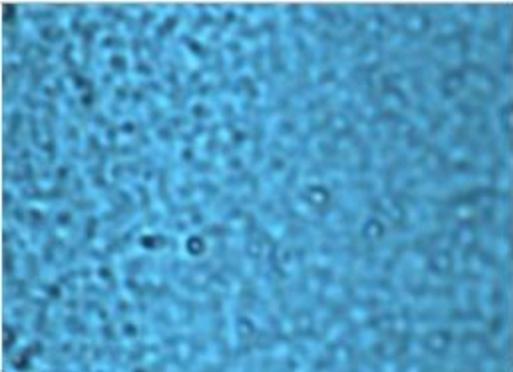
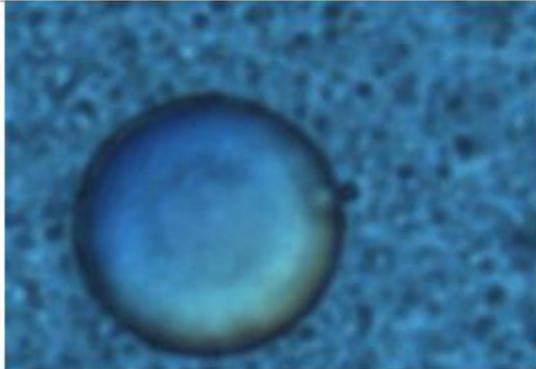
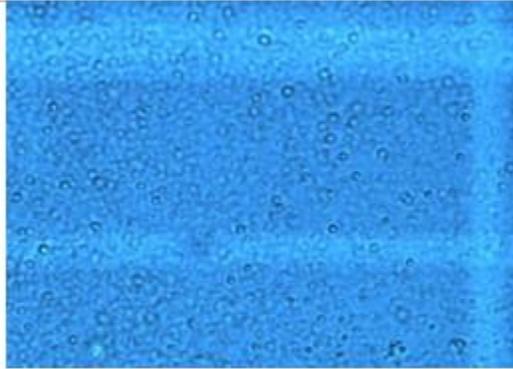
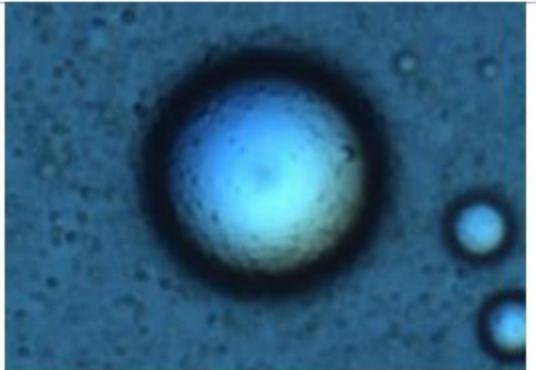
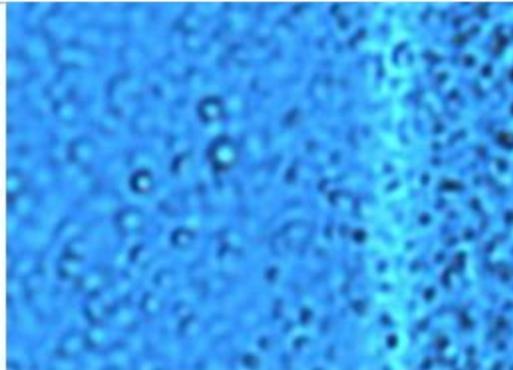
### **5.2.1. Morfología y estructura.**

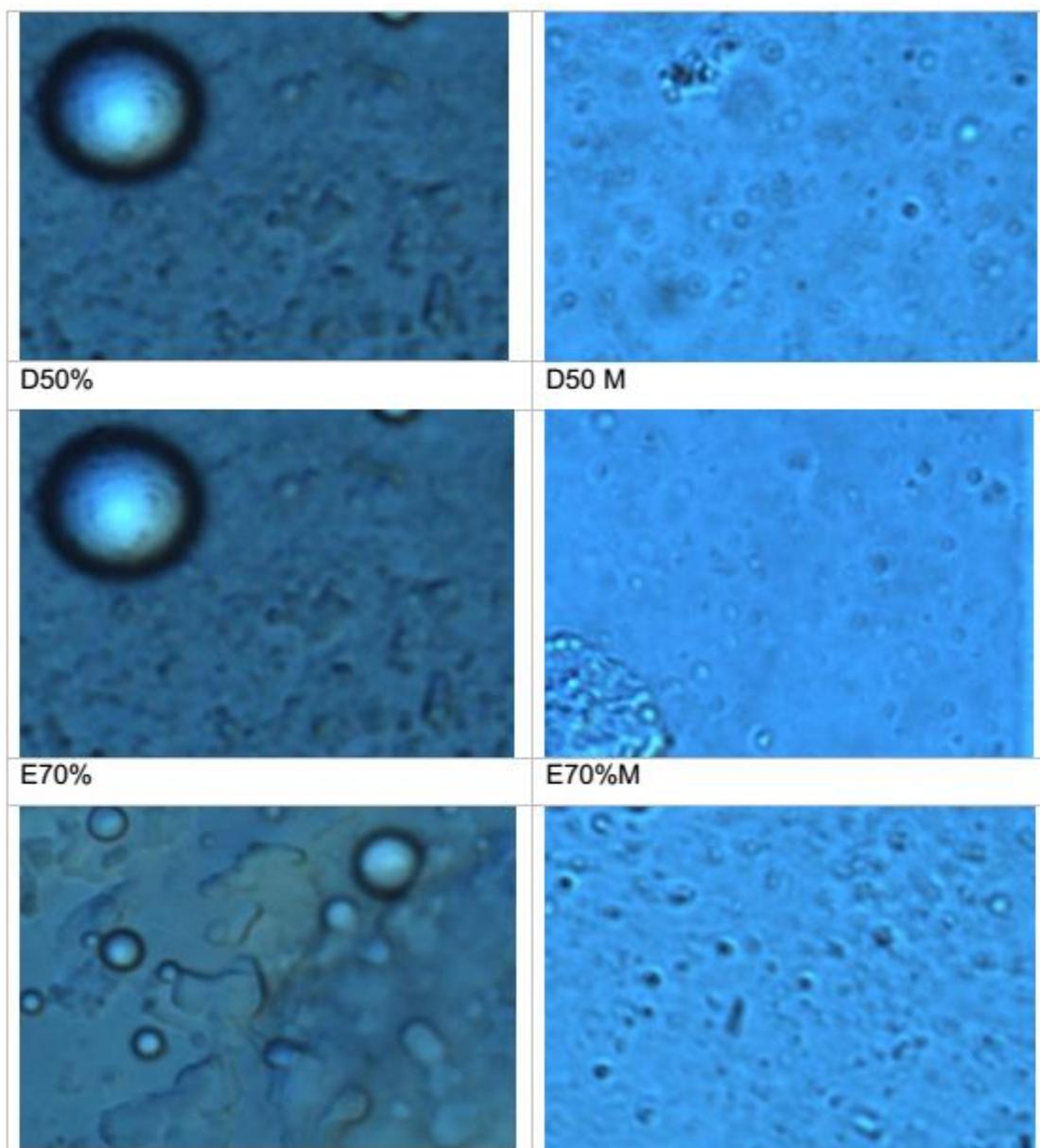
#### **5.2.1.1 Microscopía de contraste diferencial interferencial.**

Se realizó microscopía de contraste diferencial interferencial (DIC, Nomarski), que permite visualizar la estructura y morfología transparente de los etosomas, aprovechando los cambios del índice de refracción.

En la tabla 14 se muestran las micrografías de las diferentes formulaciones de los vehículos etosomales. Los gradientes repentinos del índice de refacción producen el alto contraste y el efecto de relieve 3D que se muestran en las micrografías. La esfericidad y curvatura de las siguientes imágenes es lograda por el cambio de la dispersión de luz de acuerdo con Miyata *et al.*, (1992).

Tabla.- 14 Microscopias DIC de las formulaciones de etosomas y transetosomas antes y después del proceso de extrusión observados a 80x y con filtro azul.

<b>Etosomas</b>	
Vesículas	Vesículas extruidas a 450nm.
A00	A00M
	
<b>Transetosomas</b>	
A0	A0M
	
<b>Transetosomas + Colesterol</b>	
B10%	B10% M
	
C30%	C30% M



Los etosomas (A00) muestran una morfología circular con deformaciones en la circunferencia, además de ser translúcidas lo que permite observar capas en toda la estructura, lo cual concuerda con lo que describe Touitou y colaboradores en año 2000. Los transetosomas (A0) se diferencian de los etosomas por contener tween 80; que funge como surfactante y estabilizador, en esta formulación se observa una estructura circular con mayor definición y un contraste alto que indica mayor contenido de material, lo que hace que las vesículas tengan menor transparencia, sin embargo, aún se observan las multicapas como en los etosomas (A00). La

investigación de Song *et al.*, en 2012 indica que los transetosomas son vehículos que conservan similitudes con los etosomas, sin embargo, poseen características de estabilidad y de morfología esférica de los transfersomas (liposomas ultraderformables), si se compara la micrografía A00 Y A0 se puede observar que los transetosomas tienen una superficie más homogénea debido al surfactante tween 80.

La constitución de los transetosomas hace que sean vehículos adecuados para su uso en piel debido a su alta permeabilidad, (Abdulbaqi *et al.*, 2016), sin embargo, poco se sabe, si adicionalmente compuestos como el colesterol pueden ayudar a aumentar su estabilidad, como suelen hacerlo en vehículos como los liposomas clásicos. Por ello se utilizó el método de inyección fría para diseñar transetosomas con tween 80 (A0) y aumentar el contenido de colesterol (B10%, C30%, D50%, E70%), se plantearon concentraciones del 10% al 70% en relación con el lípido, con base a los estudios del colesterol en liposomas de López-Pinto, (2005) y en el estudio de etosomas transdérmicos de Zhu *et al.*,(2013).

En los transetosomas (B10%) que contienen colesterol, se observa una morfología circular definida con un alto contraste blanco que muestra vesículas semisólidas. En la estructura de la superficie se observan pequeñas protuberancias que se encuentra en todas las vesículas a diferencia de las formulaciones A00 y A0. El contenido de colesterol podría generar esas protuberancias que se observa en la superficie de la vesícula, ya que en el estudio de López-Pinto en 2005, indican que en liposomas aumenta la rigidez.

Los transetosomas (C30%) muestran características semejantes a B10%, sin embargo, a partir de esta concentración se observa material no formado y agregados debido al aumento del porcentaje de colesterol. Las formulaciones D50% y E70% muestran muy poca cantidad de vesículas formadas y se observa a muchas de estas deformadas y con agregaciones. En el trabajo de Abdulbaqi *et al.*, (2016), se hace mención que en vehículos etosomales clásicos se puede admitir hasta un 70% de colesterol, sin embargo, en este trabajo a través de la microscopia DIC, podemos inferir que la formación de transetosomas con colesterol solo se lleva forma adecuada a porcentajes menores del 30%.

En la tabla 14 en la columna derecha se observan las formulaciones después del proceso de extrusión a 450nm (de A00M a E70%M), donde se observa de manera drástica el cambio de tamaño y la gran cantidad de vesículas. También se aprecia que a partir de la muestra C30% las vesículas tienden a deformarse y a mostrar agregados.

### 5.2.1.2 Microscopia electrónica de barrido

Se empleó como técnica complementaria la microscopia electrónica de barrido para observar las vesículas que fueron extruidas. Solo se evaluaron las formulaciones A00M, A00M y B10%M debido a que son las que presentaron mejor estructura y morfología y poca deformación en la microscopia DIC. Las micrografías de los vehículos mediante microscopia electrónica de barrido presentan aberraciones o falta de resolución para la distinción de los límites de la superficie, debido a la nula conductividad de electrones que tiene matriz lipídica.

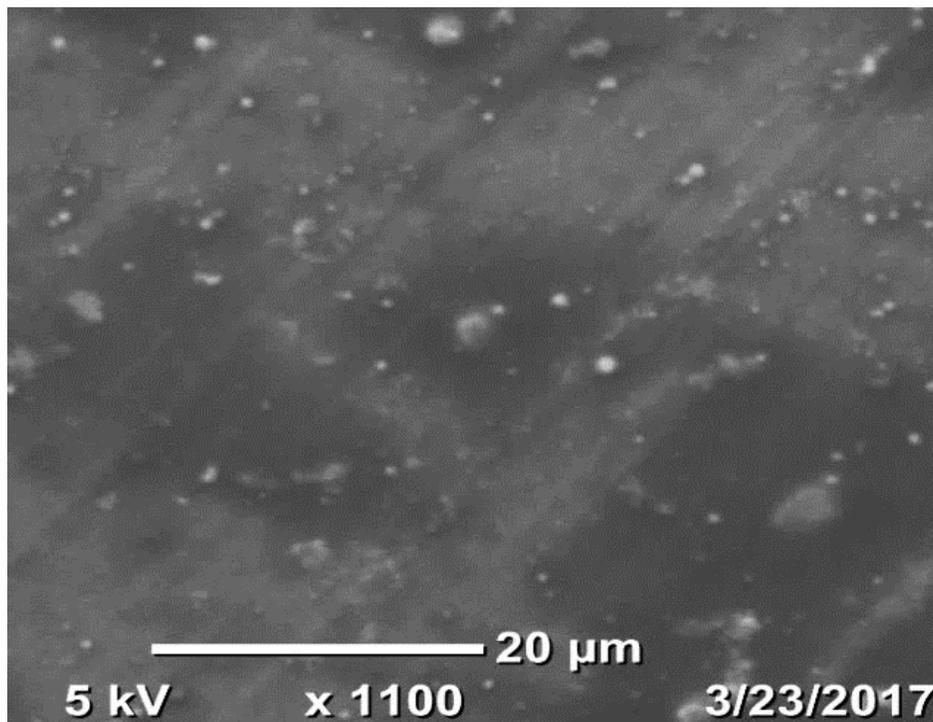


Figura.- 10 Micrografía de A00M (etosomas)

La figura 10 muestra una gran cantidad de partículas lipídicas las cuales durante el proceso de formación se les adiciono grafito coloidal (conductor de electrones) con el fin de observarlas por esta técnica. Se observa partículas blancas y agregaciones que son resultado de la deposición de estas en un porta muestras (con cinta de grafito) y llevadas a sequedad. En esta micrografía a 1100 aumentos se aprecia que las partículas son inferiores a 20 micrómetros. De acuerdo con Dayan, N., & Touitou, en el año 2000, este análisis de la superficie tridimensional, indica que los etosomas tienen una forma esférica cerrada.

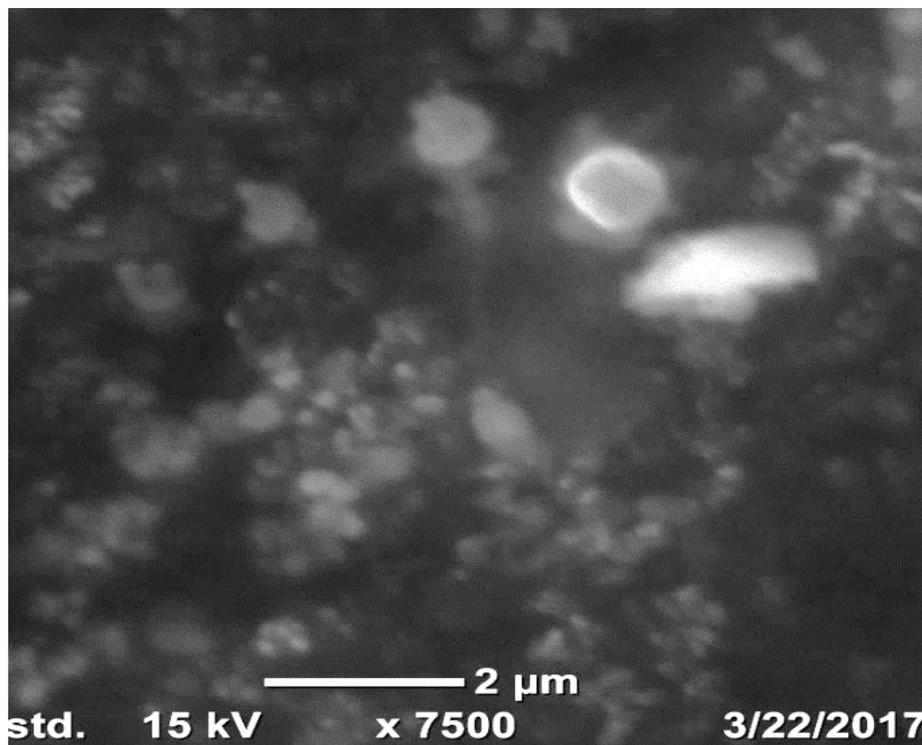


Figura.- 11 Micrografía de A0M (Transetosoma)

La figura 11 es una micrografía a 7500 aumentos de los transetosomas A0M que contienen tween 80, cabe mencionar que se observa una gran cantidad de agregados submicrométricos que preservan la forma vesicular y que resaltan en color blanco debido a la cantidad de grafito que atraparon durante su formación. En esta microscopia se pudo obtener más información de la superficie, en comparación a los etosomas (A0). De acuerdo con Dayan & Touitou (2000), la obtención de este

tipo de micrografías permite identificar la esfericidad en etosomas, y con la micrografía de la figura 11 podemos confirmar que los transetosomas también pueden ser analizados por esta técnica. Además, en esta micrografía se pudo observar que las características fisicoquímicas no cambiaron, después de la preparación y 15 días de almacenamiento, indicando estabilidad coloidal y estructural, lo que concuerda con lo reportado en micrografías de etosomas por He *et al.*, (2009).

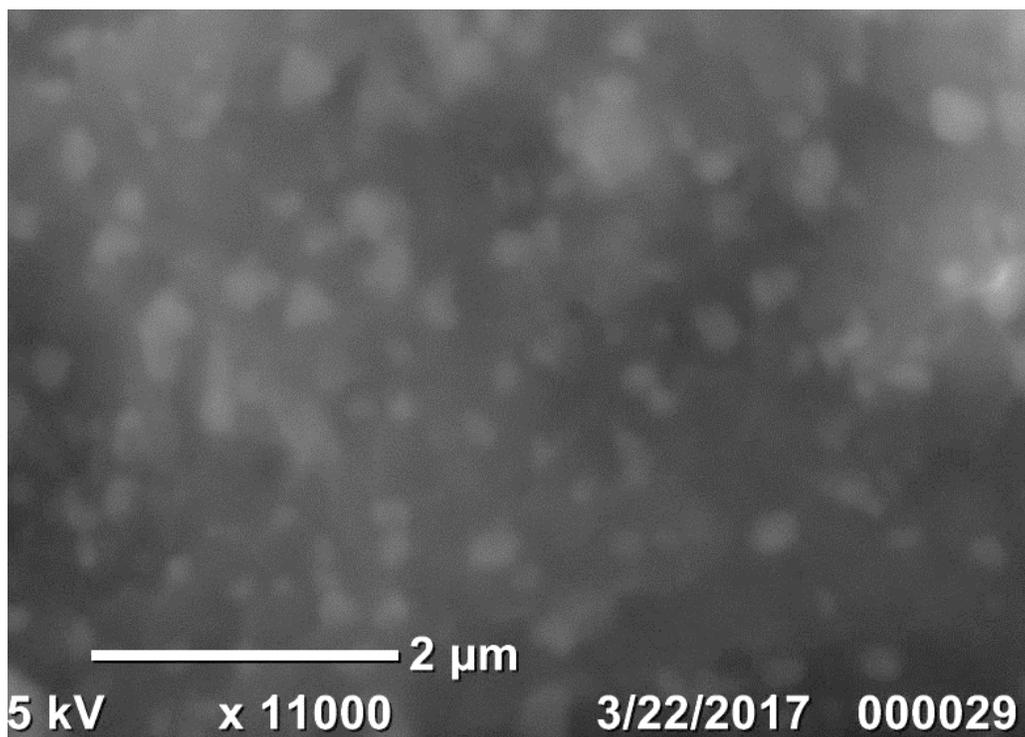


Figura.- 12 Micrografía electrónica de barrido de B10 % (transetosoma+ colesterol)

En la figura 12 se observan vesículas semiesféricas que corresponden a los transetosomas con 10% de colesterol, se observa una menor definición de las vesículas respecto a los transetosomas, esto se debe posiblemente a una mayor carga estática superficial causada por un mayor atrapamiento de grafito y que está relacionado a lo que describe Zhu *et al.*, (2013); indicando que el colesterol puede aumentar la eficiencia de atrapamiento de los compuestos.

Se puede observar que las vesículas son lisas como lo menciona Bisht *et al.*, (2017) en su investigación con etosomas, sin embargo, con la técnica DIC, se observa una superficie con protuberancias, debido a que esta se encuentra en solución acuosa.

## **5.2.2.0 Caracterización de tamaño y distribución de glóbulo.**

### **5.2.2.1 Tamaño de diámetro promedio de la vesícula.**

Se utilizó este el tamaño promedio de partícula porque es un parámetro primario y el más estable producido por la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS), debido a que es un parámetro hidrodinámico y, por lo tanto, sólo es aplicable a las partículas en una dispersión de moléculas en solución. Este parámetro es el mejor valor para reportar cuando se usa en un ajuste de control de calidad como se define en la ISO 13321 y recientemente en la ISO 22412, Xu, (2008).

En la figura 13 se muestra el tamaño promedio de vesícula de tres formulaciones (A00, A0, B10%) antes y después del ser sometidas a un proceso de extrusión con poro de 450nm, resultando que los transetosomas A00 son los de mayor diámetro con un valor de  $625.75 \pm 0.07$ nm y los de menor tamaño son los transetosomas B10% con un valor de  $536.6 \pm 1.20$  nm. En las muestras extruidas los etosomas A0M resultaron con el mayor tamaño de diámetro ( $531.55 \pm 7.79$ ) y los de menor tamaño fueron los transetosomas con 10% de colesterol ( $311.15 \pm 3.53$ ).

Que el tamaño sea inferior a un micrómetro en las tres formulaciones es atribuido al contenido de etanol del 15%. La interpenetración de la cadena de hidrocarburos del etanol conduce a una reducción en el espesor de la membrana vesicular y, por lo tanto, reduce el tamaño vesicular, de acuerdo con Li *et al.*, (2012), a mayor contenido de etanol menor tamaño de partícula (teniendo como límite 50% de etanol). Investigadores como Fang *et al.*, (2008) han propuesto que el etanol modifica la carga neta de los sistemas en algún grado de estabilización estérica, que podría conducir a una disminución en el tamaño de vesícula media.

El tamaño inferior de los transetosomas A0 y B10% respecto al Etosoma A00 puede ser atribuido a lo que reporta Song *et al.*, (2012); la incorporación de tween 80 en sistemas etosómicos reduce el tamaño vesicular y mejorar la estabilidad del sistema y los efectos de tween 80 en el sistema etosomal se deben principalmente a su propiedad de solubilización.

Los transetosomas con colesterol (B10%) son las vesículas de menor tamaño ya que al aumentar la cantidad de colesterol, el tamaño de partícula disminuye. De acuerdo con Kasetvatin *et al.*, (2015), el colesterol que se encuentra en la bicapa de las vesículas mejora la densidad de empaquetamiento lateral, reduciendo así el volumen libre de la fase hidrofóbica.

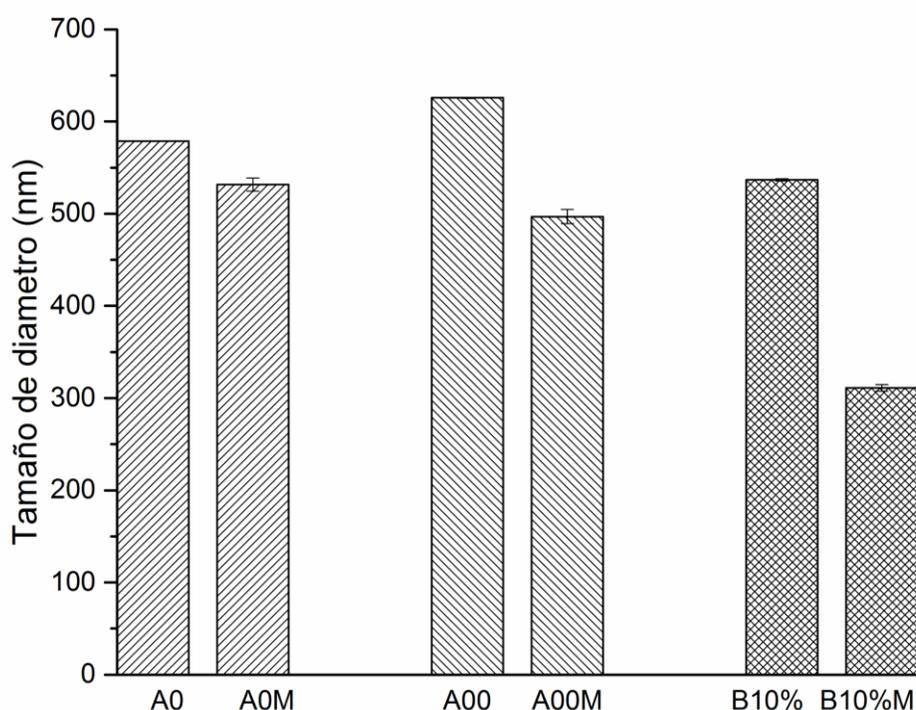


Figura.- 13 Tamaño de diámetro promedio de los vehículos.

Los resultados representan promedio  $\pm$  desviación estándar de una  $n=3$  y cada ensayo tiene 27 mediciones.

### 5.2.2.2 Índice de polidispersidad.

EL índice de polidispersidad (IPD) indica el grado de variación, o amplitud de una campana gaussiana que representa el tamaño de diámetro de partícula. Este índice de polidispersidad es adimensional y escalado de tal manera que los valores a 0.7

indican que la muestra tiene una distribución de tamaños muy amplia y no es adecuada para la técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS). Los cálculos para estos parámetros se definen en la norma ISO 13321: 1996 e ISO 22412: 2017.

La tabla 15 indica valores del IPD inferiores a 0.7 en las tres formulaciones. Se observa que después del proceso de homogenización se reduce hasta en un 50% el IPD en la muestra B10%. Los etosomas A00 y extruidos A00M son la formulación con menor IPD con valores de  $0.531 \pm 0.02$  y  $0.47 \pm 0.01$  respectivamente.

**Tabla.- 15 Tamaño promedio, Índice de polidispersidad (IPD) y porcentaje de polidispersidad**

Nombre	Formula	Diámetro promedio (nm)	IPD (u.a)
	FC:TN:Cl		
Etosoma A00	100:0:0	$625.75 \pm 0.07$	$0.35 \pm 0.06$
Etosoma A00M Extruido	100:0:0	$496.95 \pm 7.14$	$0.318 \pm 0.01$
Transetosoma A0	100:0:10	$578.85 \pm 0.49$	$0.531 \pm 0.02$
Transetosoma extruido A0M	100:0:10	$531.55 \pm 7.79$	$0.47 \pm 0.01$
Transetosoma B10%	100:10:10	$536.6 \pm 1.20$	$0.65 \pm 0.08$
Transetosoma extruido B10%M	100:10:10	$311.15 \pm 3.53$	$0.32 \pm 0.05$

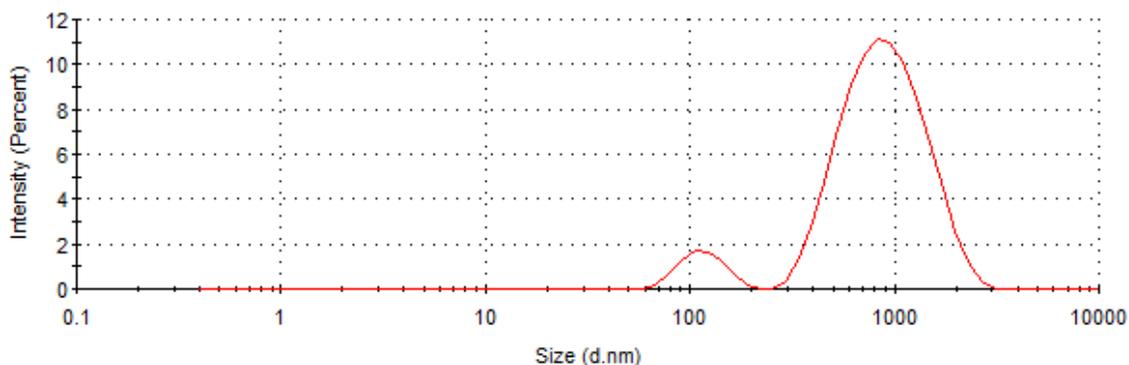
Los resultados representan promedio  $\pm$  desviación estándar de una  $n=3$  y cada ensayo tiene 27 mediciones.

De acuerdo con Akhtar & Pathak (2012), los etosomas A00 y transetosoma B10% preservan una distribución homogénea de partículas dentro de la formulación, ya que tienen un valor IPD cercano a 0.3, mientras que A0 tiene una distribución heterogénea porque sobrepasa este valor.

### **5.2.2.3 Distribución de intensidad de tamaño.**

El resultado de primer orden de un experimento DLS es una distribución de intensidad de los tamaños de partícula. La distribución de intensidad se mide naturalmente de acuerdo con la intensidad de dispersión de cada fracción de partícula o familia. Para materiales o polímeros biológicos, la intensidad de

dispersión de partículas es proporcional al cuadrado del peso molecular (Dynamic-lights-cattering, 2017).



**Figura.- 14 Grafica bimodal representativa de las mediciones de las vesículas**

En la figura 14 se observa un comportamiento bimodal de las vesículas en las tres formulaciones, que está relacionado a los valores que se observan en la tabla 16. Estos valores indican que los etosomas, transetosomas y transetosomas más colesterol tienen una intensidad de dispersión (A) que supera el 80%, que corresponde a tamaños de diámetro que van de los 500 a los 1000 nm y cerca del 10% de intensidad de dispersión (B) está relacionado a diámetros de partícula cercanos a los 100nm.

En el diseño de vehículos etosomales se busca tener tamaños homogéneos, en este trabajo se recurrió a un proceso de extrusión con un poro inferior a 450nm, para lograr el cometido. Sin embargo, podemos observar que antes y después del proceso de extrusión existen vesículas con tamaños inferiores a 100nm. En trabajos posteriores se puede recurrir a membranas de menor poro u otro método para aumentar la uniformidad (Weissig, 2010).

**Tabla.- 16 Intensidad de la distribución de tamaños**

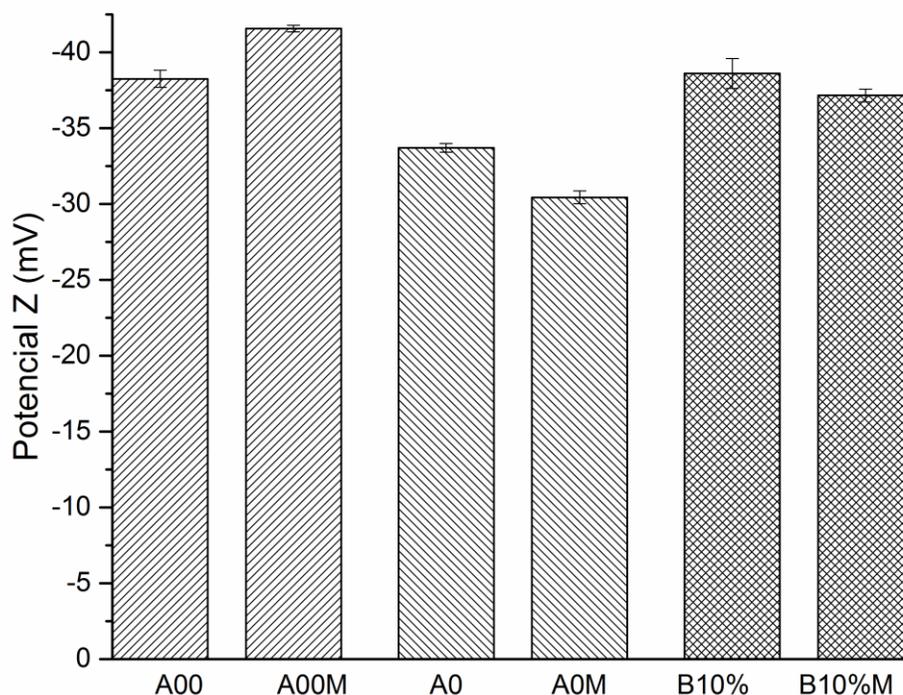
Nombre	Formula	Diámetro A(nm)	% de intensidad A	Diámetro B(nm)	% de intensidad B
	FC:TN:CI				
Etosoma A00	100:0:0	1029.9 ±96.30	91.77	86.9±3.20	8.23
Etosoma A00M Extruido	100:0:0	751.4 ±0.21	92.53	98.3±2.53	6.00
Transetosoma A0	100:0:10	1047 ±22.62	92.10	132.9±19.51	7.90
Transetosoma extruido A0M	100:0:10	949.8 ±56.42	81.07	77.9±16.30	11.67
Transetosoma extruido B10%	100:10:10	636.9 ±41.93	87.77	82.9±29.62	12.23
Transetosoma extruido B10%M	100:10:10	548.6 ±20.57	82.93	88.4±11.70	16.53

Los resultados representan promedio ± desviación estándar de una n=3 y cada ensayo tiene 27 mediciones.

La distribución de tamaño permitió corroborar la diferencia de tamaños que observamos tanto en la microscopia DIC como en la MEB, además revela que con el método de inyección fría y sin proceso de extrusión se pueden alcanzar tamaños de 78 nm.

### **5.2.3. Estabilidad de las vesículas, Potencial $\zeta$ y movilidad electroforética**

La potencial zeta es una medida de la magnitud de la repulsión o atracción electrostática (o de carga) entre las partículas, y es uno de los parámetros fundamentales que se sabe que afectan la estabilidad de vesículas como los etosomas y transetosomas (Abdulbaqi *et al.*, 2016).



**Figura.- 15 Estabilidad de las vesículas medida mediante el potencial Z**

Los resultados representan promedio  $\pm$  desviación estándar de una  $n=3$  y cada ensayo tiene 27 mediciones.

La figura 15 indica que las tres formulaciones (A00, A0, B10%) y las muestras extruidas son estables debido a que se encuentran fuera del rango de moléculas inestables que comprende de  $-30\text{mV}$  a  $30+\text{mV}$ , un valor negativo fuera de este rango indican una carga superficial negativa y un valor positivo una carga superficial positiva (Sabeti *et al.*, (2014). Siendo los transetosomas A00M la formulación más estable con un valor de  $-41.55\pm 0.21$  mV. La carga vesicular influye en las propiedades vesiculares de estas formulaciones, como la estabilidad y la interacción vesícula-piel. La presencia de etanol en los etosomas y transetosomas cambia la carga vesicular de positiva a negativa y esta carga negativa incrementa al aumentar la concentración de etanol de acuerdo con Touitou *et al.*, (2000) y Dubey *et al.*, (2007), ya que el etanol actúa como un proveedor de carga negativa para la

superficie de las vesículas, evitando así la agregación del sistema vesicular debido a la repulsión electrostática.

Por otra parte, en trabajos de etosomas de Song *et al.*, (2012) y Bragagni *et al.*, (2012) indican que el Tween 80 mejora la estabilidad del sistema y las propiedades de permeación de la piel, debido principalmente a su propiedad de solubilización y la prevención de la fusión de vesículas. Sin embargo, los transetosomas y transetosomas + colesterol, que contienen Tween 80, tuvieron una carga menor respecto al etosomas A00. Esto se puede deber a que existe una interacción en la superficie de los transetosomas, donde el tween 80 puede estar reduciendo el espacio disponible para el etanol, modificando así la carga superficial del vehículo.

Respecto al contenido de colesterol, López-Pinto *et al.*, (2005) reportan que la incorporación de colesterol en la formulación de etosomas (usan una formula como A00 + colesterol) aumentaba la estabilidad vesicular y la rigidez, en nuestro trabajo observamos que los transetosomas (A0) tienen un compartimiento similar ya que al adicionar colesterol (B10%) aumenta la carga superficial de -5 a -7 mv.

**Tabla.- 17 Potencial Z y movilidad electroforética de las vesículas**

Nombre	Formula	Potencial Z (mv)	Movilidad e. ( $\mu\text{mmc/Vs}$ )
	FC:TN:CI		
Etosoma A00	100:0:0	-38.25±0.56	-3±0.09
Etosoma A00MExtruido	100:0:0	-41.55±0.21	-3.28±0.02
Transetosoma A0	100:0:10	-33.70±0.28	-2.62±0.07
Transetosoma extruido A0M	100:0:10	-30.43±0.41	-2.36±0.03
Transetosoma extruido B10%	100:10:10	-38.60±0.98	-2.89±0.13
Transetosoma extruido B10%M	100:10:10	-37.15±0.42	-2.85±0.05

Los resultados representan promedio  $\pm$  desviación estándar de una n=3 y cada ensayo tiene 27 mediciones

En la tabla 17 muestra los resultados obtenidos de la movilidad electroforética que está relacionado a la velocidad que tienen las partículas o moléculas en el medio que las contiene, en este caso en particular un medio hidroalcohólico. Los etosomas

A00 son los que tienen mayor movilidad electroforética de  $-3\pm 0.09$  y extruidos con un valor de  $-3.28\pm 0.02$   $\mu\text{mmc}/\text{Vs}$ . La figura 16 muestra una desviación estándar menor en las formulaciones extruidas, esto indica que la velocidad de la partícula se mantiene estable después del proceso de homogenización (Dynamic-light-scattering, 2017).

De acuerdo con Chen, (2010) en la bicapa de las vesículas, algunas de las moléculas constituyente de los lípidos pueden tener carga debido a la disociación de sus grupos ionizables. Por lo tanto, la caracterización de las propiedades de carga superficial bajo diversas condiciones es de importancia fundamental para aplicaciones de liposomas, además indica que el efecto capacitivo puede mejorar la migración de un liposoma.

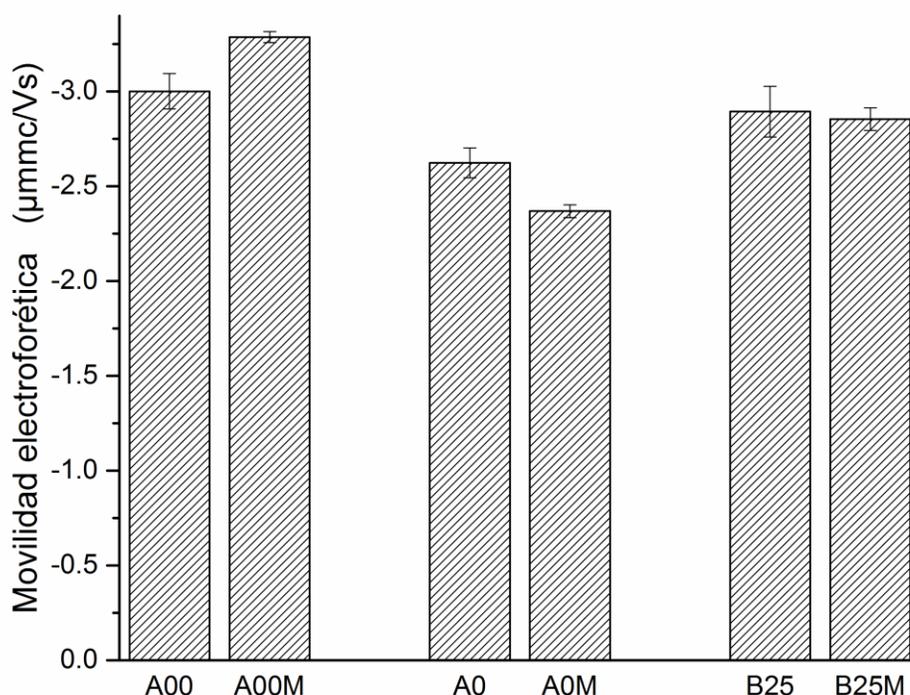


Figura.- 16 Movilidad electroforética de las vesículas.

Los resultados representan promedio  $\pm$  desviación estándar de una  $n=3$  y cada ensayo tiene 27 mediciones

#### 5.2.4. Deformabilidad de las vesículas lipídicas.

El principio de este experimento se basa en la alteración del tamaño de la vesícula al pasar a través del filtro de polycarbonato que tenía un tamaño de poro de 450 nm. Siendo la deformabilidad el cambio en el tamaño o forma de un cuerpo debido a esfuerzos internos producidos por una o más fuerzas aplicadas sobre el mismo, se calculó la deformabilidad de las vesículas de las tres formulaciones expresando los resultados en porcentaje.

Tabla.- 18 Resultados de deformabilidad en base al tamaño promedio de diámetro.

Nombre	Formula	Deformabilidad (%)
	FC:TN:CI	
Etosoma A00	100:0:0	20.58
Transetosoma A0	100:0:10	8.17
Transetosoma extruido B10%	100:10:10	42.01

Los resultados representan promedio  $\pm$  desviación estándar de una  $n=3$  y cada ensayo tiene 27 mediciones

Los transetosomas con un tamaño inicial  $578.85 \pm 0.49$  nm atravesaron la membrana con un poro de 450 nm y lograron conservar un tamaño de  $531.55 \pm 7.79$  nm. Por lo cual los transetosomas A0 son los vehículos que tienen mayor elasticidad indicado en la tabla 18 un porcentaje de deformabilidad menor respecto a los vehículos A00 Y B10%.

En la investigación de Kasetvatin *et al.*, (2015) obtuvieron liposomas elásticos con un valor 14.7% de deformabilidad y un tamaño de 742nm, en este trabajo logramos obtener vehículo más elástico (8.17% deformabilidad) y con un tamaño de 530 nm. El responsable de una mayor elasticidad en los transetosomas (A0) es el surfactante Tween 80 que actúa como un "activador de superficie" que desestabiliza los lípidos de las bicapas y aumenta la deformabilidad de la vesícula, Zhang *et al.*, 2012.

Ya que los transetosomas combinan las ventajas de los etosomas clásicos y los liposomas deformables (transfersomas), (Ainbinder y Touitou, 2011), los transetosomas A0 obtenidos pueden deformarse hasta un décimo de su diámetro y

penetrar espontáneamente el estrato córneo, como lo hacen los transfersomas reportados por Cevc, *et al.*, (2008).

Por otra parte, los etosomas (A00) son considerados vehículos deformables debido al contenido de etanol, mostrando mejor permeabilidad en la piel y mejores perfiles de estabilidad en comparación con los liposomas clásicos, Touitou (2000).

Los transetosomas+ colesterol (B10%), en esta investigación son los vehículos con menor elasticidad, a pesar de que con tienen surfactante. El responsable de la disminución de la elasticidad es el colesterol, ya que, debido a su estructura química, logra compactar las bicapas lipídicas de la vesícula y aumenta la rigidez de la estructura, López-Pinto, (2005).

**Tabla.- 19 Deformabilidad en base a la intensidad de tamaño del diámetro A.**

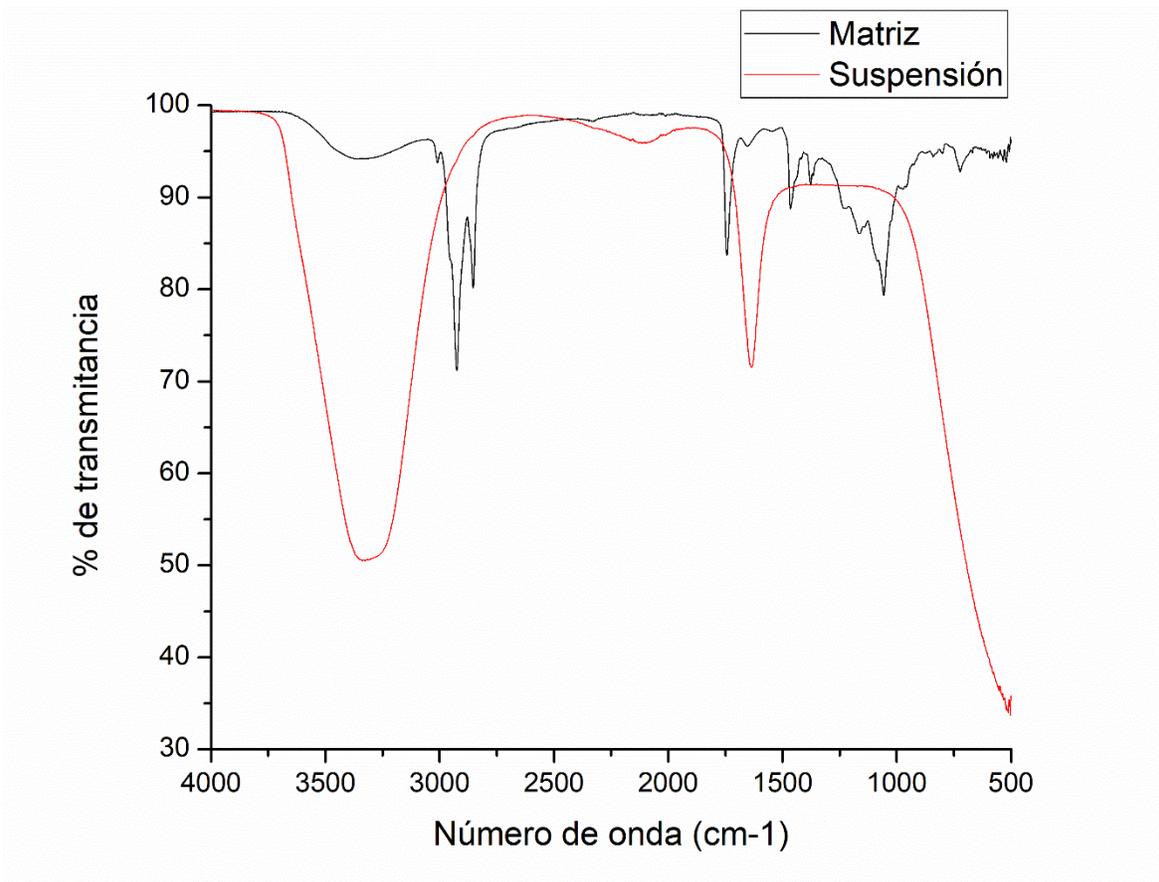
Nombre	Formula	Deformabilidad (%)
	FC:TN:CI	
Etosoma A00	100:0:0	27.03
Transetosoma A0	100:0:10	9.28
Transetosoma extruido B10%	100:10:10	13.86

Los resultados representan promedio  $\pm$  desviación estándar de una n=3 y cada ensayo tiene 27 mediciones

Los resultados obtenidos en la tabla 19 fueron calculados con base a la intensidad de tamaño del diámetro A. Esto con el fin de observar cómo se comportaría la elasticidad, si el diámetro de partícula fuera totalmente homogéneo. Sin embargo, resultado que los transetosomas A0, siguen siendo los más elásticos, considerando la fracción de partículas de tamaño cercano a los 1000nm.

### **5.2.5 Análisis estructural mediante FT- IR en la formulación de liposomas**

La espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) es una técnica muy utilizada para estudiar cambios del estado liotrópico de membranas biológicas tanto naturales como artificiales (Cabrera *et al.*, 2016).



**Figura.- 17 Espectro infrarrojo de transetosomas A0 en suspensión acuosa (suspensión) y en estado sólido (matriz).**

La figura 17 muestra el espectro infrarrojo transetosomas constituidos por lecitina de soya y Tween 80 en una solución hidroalcohólica (suspensión) y en estado sólido (Matriz). El espectro de la suspensión indica una fuerte señal en las bandas de 3700-3100 y 1700-1600  $\text{cm}^{-1}$  que corresponden al grupo O-H de estiramiento, lo que indica la presencia de agua, que no permite la identificación de los grupos funcionales de los precursores. Sin embargo, la amplitud del pico ubicado en aproximadamente en 3700  $\text{cm}^{-1}$  indica una interacción de los grupos O-H del agua y de los componentes de lecitina de soya (Popova *et al.*, 2016).

El espectro de Matriz muestra vibraciones de tensión correspondientes a los enlaces C-H del residuo acilo de los fosfolípidos que dan lugar a bandas de absorción en la región de 2800-3100  $\text{cm}^{-1}$ . Las bandas más fuertes en el espectro de un fosfolípido

son, generalmente, las correspondientes a las de tensión antisimétrica ( $2920\text{ cm}^{-1}$ ) y simétrica ( $\text{CH}_2\ 2850\text{ cm}^{-1}$ ) del grupo  $-\text{CH}_2$ . Los picos  $1742$  y  $1728\text{ cm}^{-1}$  son característicos de los grupos carbonilos de la fosfatidilcolina.

Cuando las membranas pasan de fase gel a fase líquido cristalinos, estas bandas vibraciones muestran un corrimiento del máximo de absorción a número de onda mayores, cambiando su posición en el espectro. (Cabrera *et al.*, 2016)

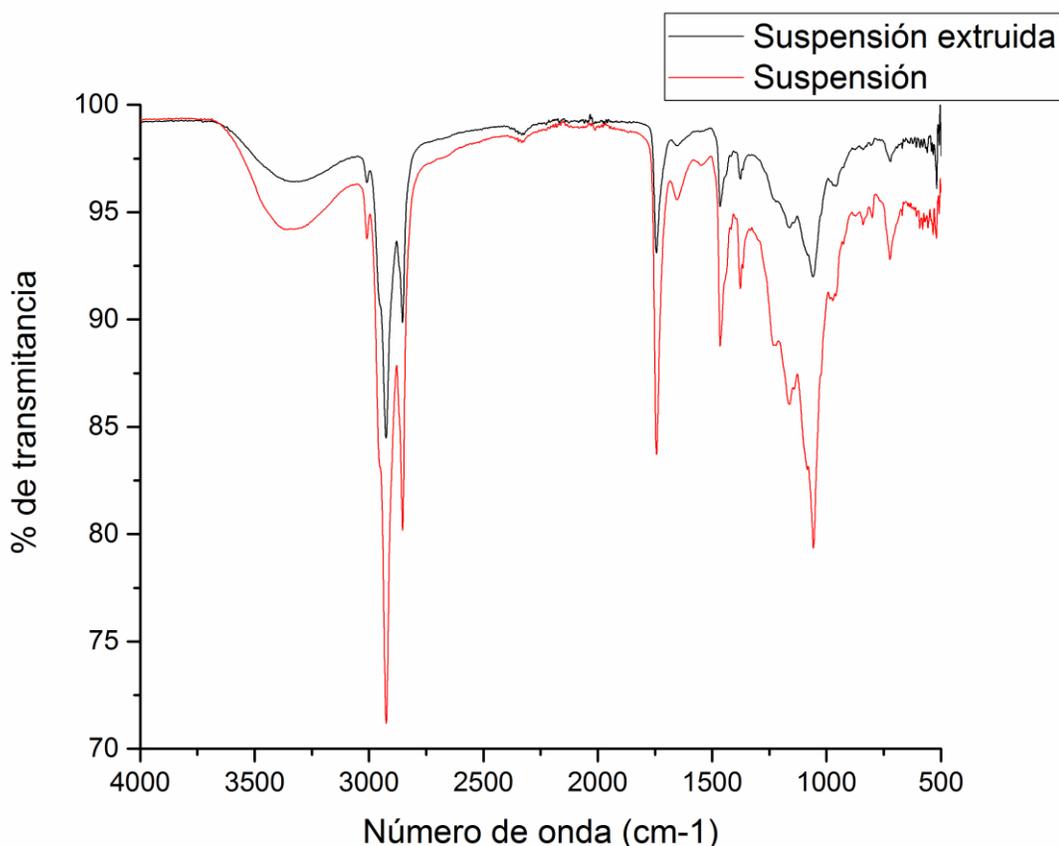


Figura.- 18 Espectro infrarrojo de etosomas A0 en suspensión y suspensión extruidos A0M, llevados a sequedad.

La figura 18 muestra es espectro infrarrojo de A0 (suspensión) y el espectro de los A0M (suspensión extruida), ambos espectros muestran los mismos picos. Sin embargo, el pico  $1750\text{ cm}^{-1}$  representa el estiramiento  $\text{C} = \text{O}$  del enlace éster donde la cadena de hidrocarburo se une con el grupo de la cabeza de los fosfolípidos. La aparición los picos de  $1750\text{ cm}^{-1}$ , indica que el grupo de cabeza está más confinado

(es decir, tiene una mayor amplitud de unión de hidrógeno). Los liposomas multilamelares tienen un radio mayor que los liposomas unilamelares, dando como resultado una menor torsión aplicada a las moléculas adyacentes. Como resultado, en una configuración de vesículas multilamelares, las moléculas adyacentes están más próximas e interactúan más altamente entre sí. (Rutherford *et al.*, 2011). Este análisis FT-IR, de forma general indica que después del proceso de microfiltración se puede disminuir la cantidad de capas del liposoma y preservar la identidad macromolecular.

En la figura 19 se aprecian los espectros de A0M, A00M Y B10M%, los cuales comparten las mismas bandas descritas de la figura 17, lo que indica la presencia de las vesículas lipídicas en las formulaciones (Popova *et al.*, 2016).

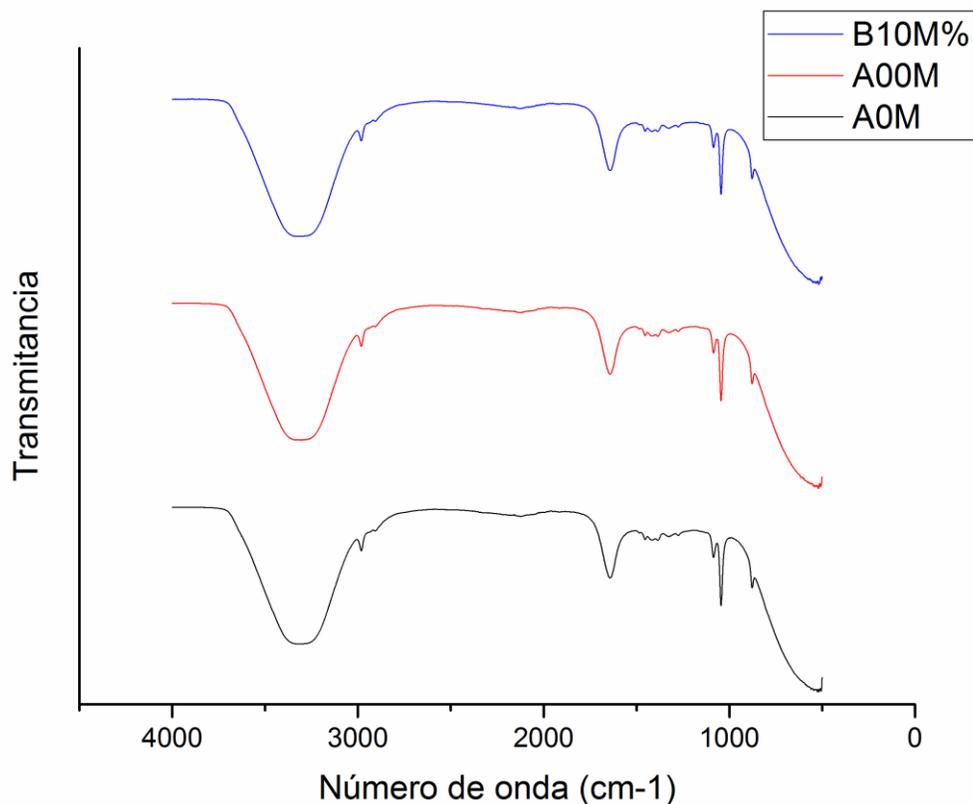


Figura.- 19 Espectro infrarrojo de formulaciones en suspensión extruida (A00, A0, B10%)

### 5.3.0 DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DEL ENCAPSULADO.

#### 5.3.2.0 Caracterización de tamaño y distribución de glóbulo.

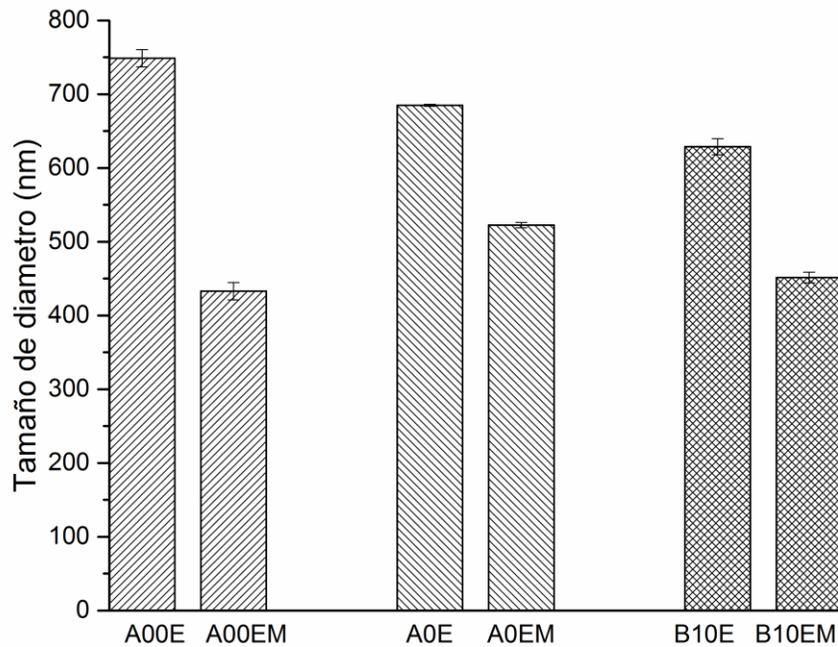
##### 5.3.2.1 Tamaño de diámetro promedio de la vesícula.

Se determinó el tamaño promedio de partícula mediante la técnica DLS, como en la sección de 5.2.2.1, con el fin de observar si existe un cambio en el tamaño después de atrapar el extracto microfiltrado de *Chenopodium murale*.

En la figura 20 se muestra el tamaño promedio de vesícula de tres formulaciones (A00E A0E, B10E%) antes y después del ser sometidas a un proceso de extrusión resultando que los transetosomas A00E son los de mayor diámetro con un valor de  $748.93 \pm 11.73$  y a la vez los de menor tamaño después de la extrusión A00EM con un valor de  $433.00 \pm 11.90$  nm. Este comportamiento puede ser debido al atrapamiento del extracto, el cual puede aumentar el tamaño de diámetro de la vesícula y a consecuencia de los componentes del extracto, como lo esteroides, puede aumentar la rigidez de la vesícula, lo cual provoca que después del proceso de extrusión, solo se recuperen vesículas inferiores al tamaño de poro de 450nm (quedando atrapadas o destruidas las vesículas superiores al diámetro de poro de la membrana), (Kasetvatin *et al.*, 2015; Weissig, 2010; Paolino *et al.*, 2012).

Los tamaños de diámetro aumentaron en las tres formulaciones cuando se compara con los vehículos vacíos (no extruidos). Sin embargo, los transetosomas A0EM (extruidos) mantienen un valor semejante al de A0M (transetosomas vacíos),  $531.55 \pm 7.79$  y  $522.33 \pm 3.59$  respectivamente.

La conservación del tamaño de vesícula después del proceso de atrapamiento es importante ya que se pretende utilizar los vehículos de manera tópica y transdérmica donde se requieren tamaños submicrométricos. Existen casos como el que presenta Paolino *et al.*, (2012), donde se parte de un tamaño de etosoma de  $131 \pm 13$  nm y aumenta a  $751.3 \pm 38.34$  nm después de encapsular el fármaco Paclitaxel, este cambio drástico afecta directamente en la administración del fármaco.



**Figura.- 20 Tamaño de diámetro promedio de los vehículos.**

Los resultados representan promedio  $\pm$  desviación estándar de una  $n=3$  y cada ensayo tiene 27 mediciones.

### 5.3.2.2 Índice de polidispersidad.

EL índice de polidispersidad (IPD) de los vehículos obtenidos se observa en la tabla 20, con el formato de la sección 5.2.2.2. donde se describieron los vehículos vacíos. En las tres formulaciones aumento el IPD, incluso después del proceso de homogenización, siendo los transetosomas extruidos A0ME ( $0.52 \pm 0.06$ ) los vehículos más homogéneos después del atrapamiento del extracto y manteniendo un valor cercano al del vehículo vacío A0M ( $0.47 \pm 0.01$ ).

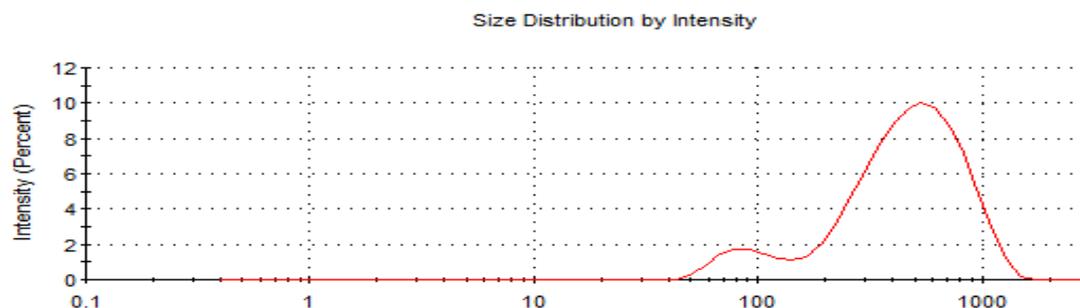
**Tabla.- 20 Tamaño promedio, Índice de polidispersidad (IPD) y porcentaje de polidispersidad.**

Nombre	Formula	Diámetro promedio (nm)	IPD (u.a)
	FC:TN:CI		
Etosoma A00E	100:0:0	748.93±11.73	0.70±0.01
Etosoma A00EM Extruido	100:0:0	433.00±11.90	0.63±0.09
Transetosoma A0E	100:0:10	685.03±1.48	0.69±0.02
Transetosoma extruido A0ME	100:0:10	522.33±3.59	0.52±0.06
Transetosoma B10%E	100:10:10	628.73±10.75	0.85±0.04
Transetosoma extruido B10ME	100:10:10	451.37±7.28	0.60±0.08

Los resultados representan promedio ± desviación estándar de una n=3 y cada ensayo tiene 27 mediciones.

### 5.3.2.3 Distribución de intensidad de tamaño.

En la figura 21 se observa un comportamiento bimodal de las vesículas en las tres formulaciones (A00E A0E, B10E%) antes y después del ser sometidas al proceso de extrusión. En comparación a la figura 14 de la sección 5.2.2.3, se observa la ampliación de los picos que describen la intensidad de tamaño, incluso se denota el solapamiento de estos. En general se observó la disminución de la homogeneidad de partícula debida debido a la incorporación del extracto de *Chenopodium murale*. De acuerdo con lo que describe Akhtar & Pathak (2012), podemos inferir que los transetosomas A0M al atrapar el extracto pasan de ser una distribución homogénea a una heterogénea ya que sobrepasan el valor de 0.3 de IPD.



**Figura.- 21 Grafica bimodal representativa de las mediciones de las vesículas**

### 5.3.3. Estabilidad de las vesículas, Potencial $\zeta$ y movilidad electroforética.

En este ensayo a diferencia de la sección 5.2.3.1, se analizaron solo los vehículos extrudidos. En la figura 22 se puede observar que los tres encapsulados (A00EM, A0EM y B10%ME) son estables debido a que se encuentran fuera del rango de moléculas inestables que comprenden de -30mV a 30+mV, (Sabeti *et al.*, 2014).

Es importante resaltar que los etosomas A00 vacíos aumentaron -6 mV, los transetosomas + colesterol B10% permanecieron igual y los transetosomas A0, aumentaron -15 mV, cuando se adiciono el extracto. Esto indica un aumento importante en la estabilidad de este último vehículo, ya que como se había mencionado; el etanol actúa como un proveedor de carga negativa para la superficie de las vesículas, evitando así la agregación del sistema vesicular debido a la repulsión electrostática, (Touitou *et al.*, 2000 y Dubey *et.*, 2007). Podemos inferir que el extracto de *Chenopodium murale*, puede mejorar la estabilidad de los transetosomas A0EM debido a que la extracción fue etanólica y los metabolitos obtenidos tienen afinidad por este solvente, además de que tiene un alto contenido de esteroides que pueden favorecer a el aumento de cargas negativas.

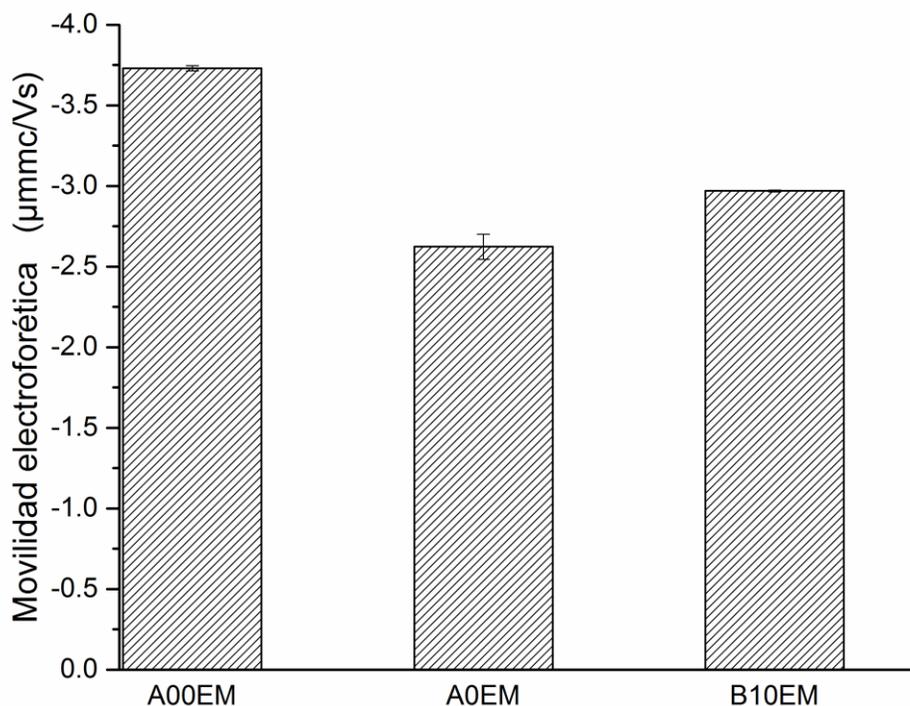
Tabla.- 21 Potencial Z y movilidad electroforética de las vesículas

Nombre	Formula	Potencial Z (mv)	Movilidad e. ( $\mu\text{mmc/Vs}$ )
	FC:TN:CI		
Etosoma A00ME Extruido	100:0:0	-47.600 $\pm$ 0.529	-3.73 $\pm$ 0.016
Transetosoma extruido A0ME	100:0:10	-45.100 $\pm$ 0.212	-3.3 $\pm$ 0.0156
Transetosoma extruido B10%ME	100:10:10	-37.15 $\pm$ 0.1414	-2.85 $\pm$ 0.006

Los resultados representan promedio  $\pm$  desviación estándar de una n=3 y cada ensayo tiene 27 mediciones

La tabla 21 y la figura 22 muestra los resultados obtenidos de la movilidad electroforética que está relacionado a la velocidad que tienen las vesículas. Se encontró que para los encapsulados A00ME y A0ME, la velocidad aumento respecto a sus vehículos (A00M Y A0M) vacíos, sin embargo, el encapsulado B10%ME

permaneció con el mismo valor. EL aumento de la movilidad electroforética en los encapsulados puede estar relacionada al contenido de extracto, por otra parte, el comportamiento del encapsulado B10%ME puede deberse al contenido de colesterol que aumenta rigidez de la estructura vesicular (López-Pinto *et al.*, 2005 y Limsuwan *et al.*, 2012).



**Figura.- 22 Movilidad electroforética de las vesículas.**

Los resultados representan promedio  $\pm$  desviación estándar de una n=3 y cada ensayo tiene 27 mediciones

#### **5.3.4. Deformabilidad de las vesículas lipídicas.**

Como ya se había discutido anteriormente en la sección 5.2.3.1, la importancia de la elasticidad en las vesículas lipídicas radica en que estas sean capaces deformarse hasta un décimo de su diámetro y penetrar el estrato córneo (Touitou, 2000).

**Tabla.- 22 Deformabilidad de vesículas lipídicas.**

Nombre	Formula	Deformabilidad (%)
	FC:TN:CI	
Etosoma A00E	100:0:0	42.18±0.543
Transetosoma A0E	100:0:10	23.75±.986
Transetosoma extruido B10E%	100:10:10	28.21±077

Los resultados representan promedio ± desviación estándar de una n=3 y cada ensayo tiene 27 mediciones

Comparando los valores de la tabla 22 y la tabla 18 podemos confirmar que hubo una disminución de la elasticidad en los encapsulados, indicando un 22% más de deformabilidad para A00, 15% para A0 y un 14% para B10%. Debido a que en la sección en la sección 5.2.3.1, ya se ha descrito la interacción de los materiales usados respecto a la elasticidad, podemos deducir que este cambio es atribuido a la presencia del extracto microfiltrado de *Chenopodium murale*.

Es importante mencionar que el encapsulado que sigue siendo el más elástico es el transetosoma A0EM, debido al contenido de Tween 80 que aumenta la deformabilidad de la vesícula, (Zhang *et al.*, 2012).

### **5.3.5. Capacidad de atrapamiento del extracto de *Chenopodium murale***

Este ensayo permitió conocer cuál es el vehículo que puede atrapar una mayor cantidad del extracto de *Chenopodium murale*. En la tabla 23 encontramos que después del proceso de extrusión, disminuye la capacidad de atrapamiento, debido a que hay una reducción del tamaño de vesícula (Bhadra *et al.*, 2012). Los transetosomas + colesterol (B10%E) son los vehículos con mayor capacidad y eficiencia de atrapamiento, atribuido al contenido de colesterol de acuerdo con lo que reportan Limsuwan y Amnuakit, (2012). Sin embargo, al ser extruidos estas propiedades disminuyen drásticamente, dejándolo por debajo de los dos vehículos restantes.

Los transetosomas A0EM, son las vesículas con mayor eficiencia y capacidad de atrapamiento después del proceso de extrusión y mantiene valores cercanos a la capacidad inicial (A0E).

**Tabla.- 23 Capacidad de atrapamiento de extracto de *Chenopodium murale*.**

Transportador	Capacidad de atrapamiento ( $\mu\text{g}$ de extracto seco /mL de suspensión)	Eficiencia de atrapamiento (%)
Etosoma A00E	22.44 $\pm$ 2.12	74.81
Etosoma A00EM Extruido	11.27 $\pm$ .071	37.56
Transetosoma A0E	23.73 $\pm$ 2.00	79.11
Transetosoma extruido A0ME	19.01 $\pm$ 0.58	63.35
Transetosoma B10%E	28.68 $\pm$ 2.00	95.58
Transetosoma extruido B10ME	9.55 $\pm$ 1.29	31.82

Los resultados representan promedio  $\pm$  desviación estándar de una n=6.

### **5.3.6. Transetosoma (A0EM) como transportador de *Chenopodium murale*.**

A partir de esta sección de trabajo solo se mostrarán los resultados del encapsulado A0EM, ya que en base a todos los análisis de caracterización del transportador y del encapsulado, se decidió que es el vehículo con mejores características para transportar el extracto etanólico de *Chenopodium murale*, orientado a una administración dérmica y transdérmica. La tabla 24 condensa la información más relevante sobre el Transetosoma A0EM.

**Tabla.- 24 Datos de caracterización del transetosoma A0EM como transportador.**

Nombre	Fórmula FC:TN:Cl: Ex	Diámetro promedio (nm)	IPD (u.a)	Potencia Z (mV)	Deformabilidad (%).	Eficiencia de atrapamiento (%).
Transetosoma A0EM	100:0:10:2	522.33 $\pm$ 3.59	0.52 $\pm$ 0.06	45.100 $\pm$ 0.212	23.75 $\pm$ .986	63.35

### 5.3.7. Morfología y estructura.

Se empleó la microscopía de contraste diferencial interferencial (DIC, Nomarski), que permite visualizar la estructura y morfología transparente de los transetosomas descrita en la sección 5.2.1.1, además se empleó como técnica complementaria la microscopia electrónica de barrido para observar las vesículas submicrométricas, como se describe en la sección 5.2.1.2.

La figura 23 permite corroborar en la micrografía A, que después del atrapamiento del extracto, se conserva la morfología esférica de A0M, sin embargo, a diferencia de los transetosomas sin extracto, se percibe que la estructura no es traslúcida y la superficie presenta irregularidades. La micrografía B mediante MEB permite ver la superficie tridimensional que indica que los transetosomas conservan una forma esférica cerrada después del proceso de encapsulación, además se aprecia que la vesícula tiene tamaño submicrométrico, (Touitou, 2000).

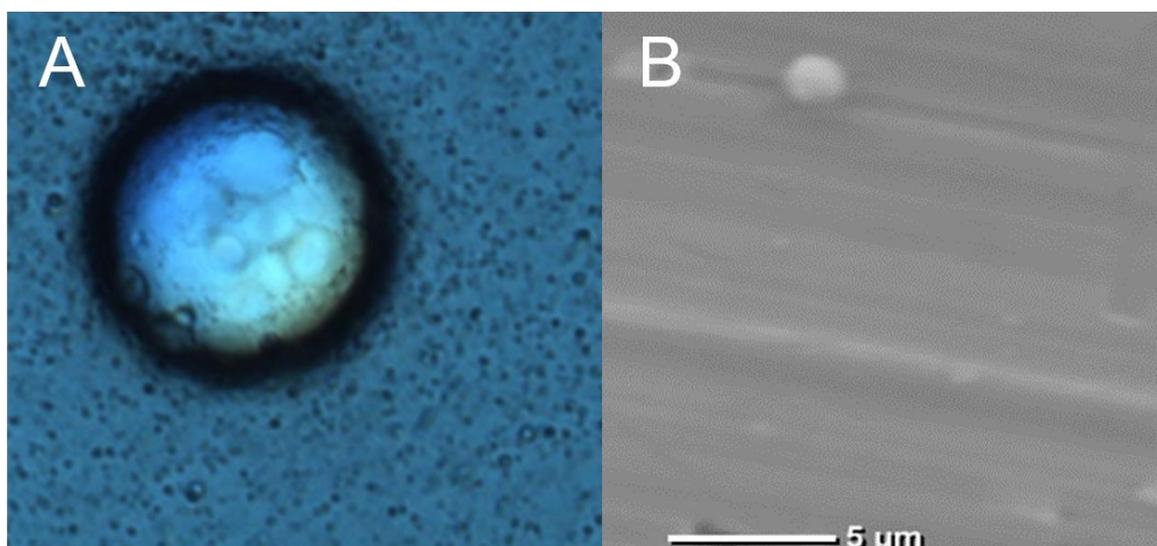


Figura.- 23 Micrografías de encapsulado A0EM, micrografía mediante DIC a 80x (A) y micrografía mediante MEB a 15000x (B).

### 5.3.8. Análisis estructural mediante FT- IR del encapsulado.

La figura 24 muestra los espectros IR, del encapsulado A0E y del extracto microfiltrado de *Chenopodium murale*, es posible observar el solapamiento de los picos del extracto en el espectro del encapsulado (debido a la baja concentración

del extracto en la suspensión de transetosomas), que de acuerdo con Abdelghany *et al.*, (2015) se encuentran en 1050, 1390, 1625, 2922, 3440  $\text{cm}^{-1}$  y que corresponden a los grupos C-H en el plano de aromáticos, C-N de la amina aromática, grupos carbonilo (C = O),  $\text{CH}_2$  asimétrico y grupo -COOH respectivamente. El ovalo verde indica que el pico a 1625  $\text{cm}^{-1}$ , es perteneciente al extracto de *Chenopodium murale* y este podría servir de referencia para monitorear si el proceso de atrapamiento se llevó acabo.

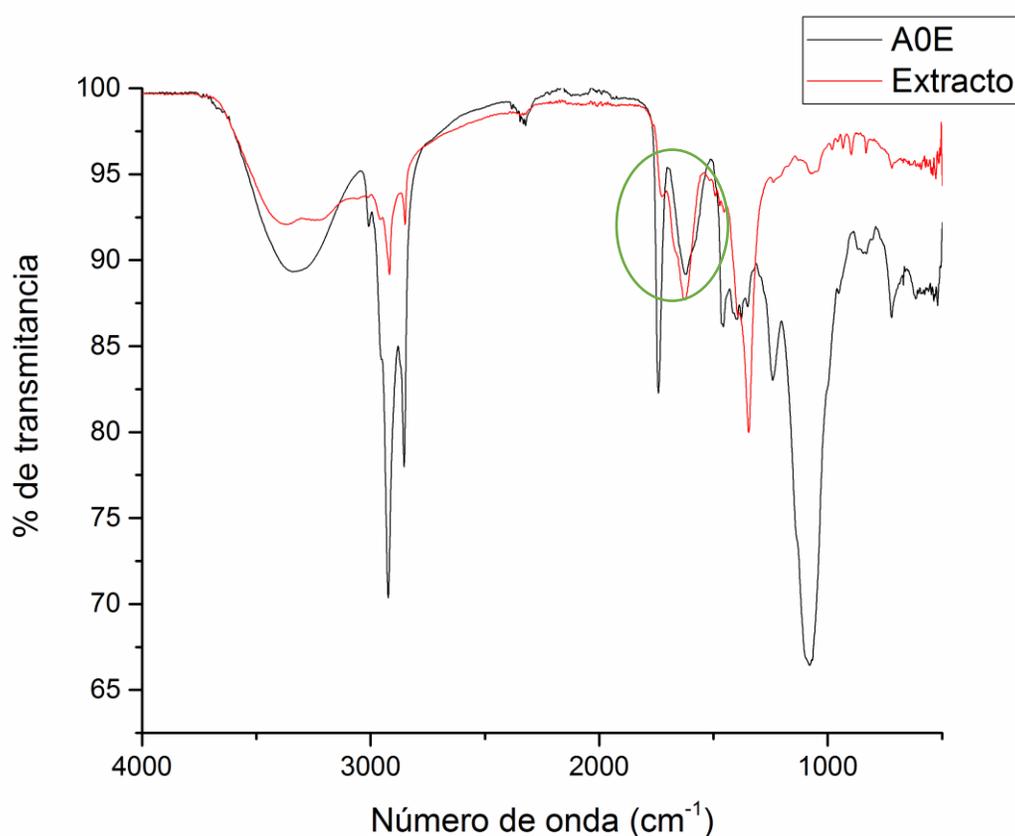


Figura.- 24 Comparación del espectro IR del encapsulado A0E y del espectro IR del extracto.

En la figura 24 se compara el espectro infrarrojo del extracto etanólico de *Chenopodium murale* antes y después de encapsular. Para este ensayo se recurrió a utilizar el método 4.6.1, para recuperar el extracto contenido en las vesículas.

El resultado indica que se preserva la identidad macroestructural del extracto después de ser encapsulado; se observan bandas de absorción con un máximo a 1233  $\text{cm}^{-1}$  que se asigna al estiramiento de los anillos de pirano, típicos de los compuestos flavonoides, otras bandas que permanecen entre 1300 y 1380  $\text{cm}^{-1}$  asignadas al enlace C-O, que muestra deformidades angulares de fenoles (Ortega, *et al.*, 2007), Sin embargo, se observa una ligera disminución de los picos debido a la baja concentración recuperada.

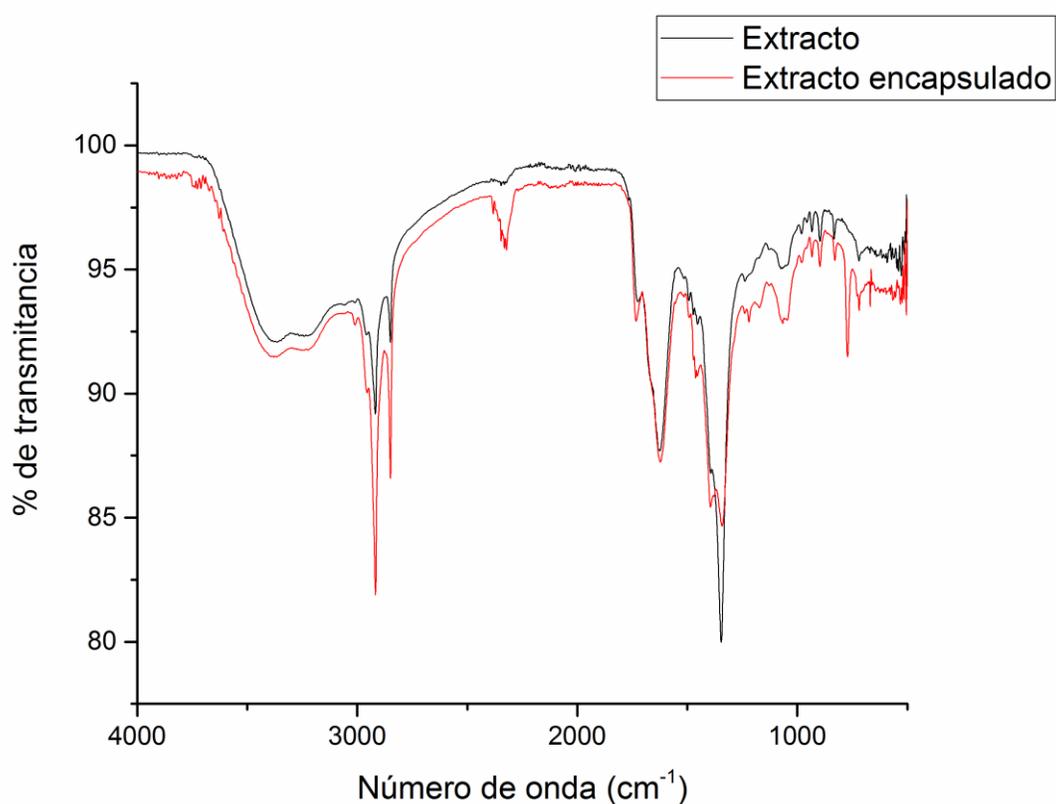


Figura.- 25 Espectro infrarrojo del extracto de *Chenopodium murale* antes y después de encapsular.

### 5.3.9. Comprobación de la encapsulación mediante microscopia de fluorescencia.

La comprobación de atrapamiento del agente activo es muy importante, ya que permite confirmar que se llevó a cabo la encapsulación de la sustancia de interés (Weissing, 2010). En esta investigación se comprobó el atrapamiento del extracto de *Chenopodium murale* mediante el ensayo de eficiencia de tratamiento (espectrofotometría) y el ensayo de espectrometría infrarroja, sin embargo, la microscopia de fluorescencia permite hacer una comprobación visual de la distribución de extracto.

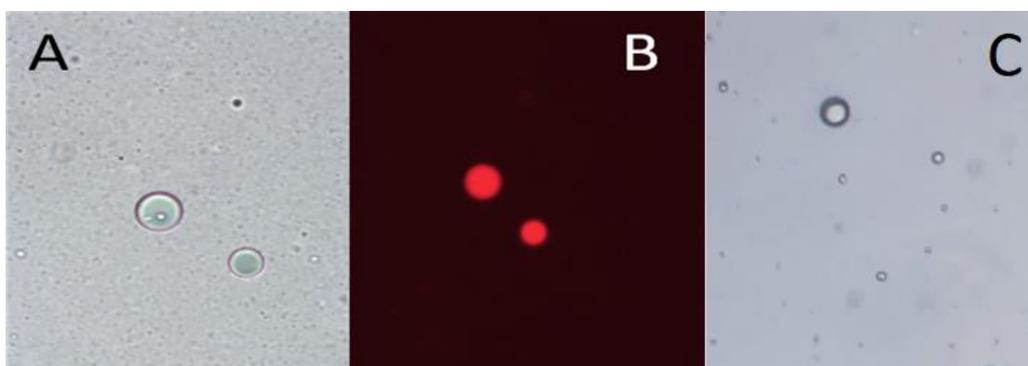


Figura.- 26 Microscopia óptica de campo claro (A), de fluorescencia (B) de A0EM y microscopia de campo claro (C) de A0M (vehículo vacío ) a 80x,

En la figura 26 se aprecia en la micrografía (A) la presencia de los transetosomas con extracto etanólico de *Chenopodium murale*, se observa un color verde en el interior de la vesícula causado por el atrapamiento del extracto. En la micrografía (B) mediante fluorescencia podemos observar como los transetosomas adquieren una coloración roja, debido a que el extracto presenta una alta fluorescencia. Esta propiedad es atribuida al alto contenido de clorofila del tipo A y B de la planta de *Chenopodium murale* (Mechan *et al.*, 2010). En la micrografía (C) se aprecian los vehículos vacíos como control.

Mediante microscopia óptica observamos que la distribución del extracto se encuentra en el centro acuso del transetosoma y mediante fluorescencia constatamos que el extracto también se encuentra en la superficie.

En otros trabajos como en los de Dubey *et al.*, (2007) y Tyagi *et al.*, (2015), utilizan rodamina roja la cual permite hacer un contraste fluorescente para observar las vesículas lipídicas. En contraste los encapsulados que se obtuvieron en este trabajo no requieren un componente adicional para ser monitoréalos mediante microscopia de fluorescencia.

### **5.3.10 Ensayo de permeabilidad en piel mediante microscopia de fluorescencia.**

Se usó microscopía de fluorescencia para confirmar la capacidad de penetración en la piel de los liposomas elásticos. La micrografía A, B y C de la figura 27 son secciones representativas de la piel dorsal de una rata Fisher, donde se aplicó el extracto etanólico microfiltrado, los encapsulados (A0EM) y el control (sin tratamiento) respectivamente. Después de una hora con el tratamiento, podemos observar que en la dermis en (A) se exhibe una coloración naranja y en (B) una coloración roja, estas tonalidades se deben a la florescencia que emite el extracto, en (C) se observa una tonalidad blanca debida a la piel sin tratamiento . Al aumentar la concentración del extracto en la dermis se observan tonalidades fuertes de color rojo. Esto indica que hay una mayor permeabilidad de el extracto encapsulado en comparación al extracto sin encapsular, (Montes *et al.*,2007; Dubey *et al.*, 2007; Tyagi *et al.*, 2015).



**Figura.- 27 Micrografías de fluorescencia a 40x. de piel expuesta a los tratamientos; (A) extracto, (B) encapsulados y (C) control (sin tratamiento).**

La baja permeabilidad de extracto puede ser debida su baja solubilidad y biodisponibilidad (Medina *et al.*, 2004). De acuerdo con Alexander *et al.*, (2016) los

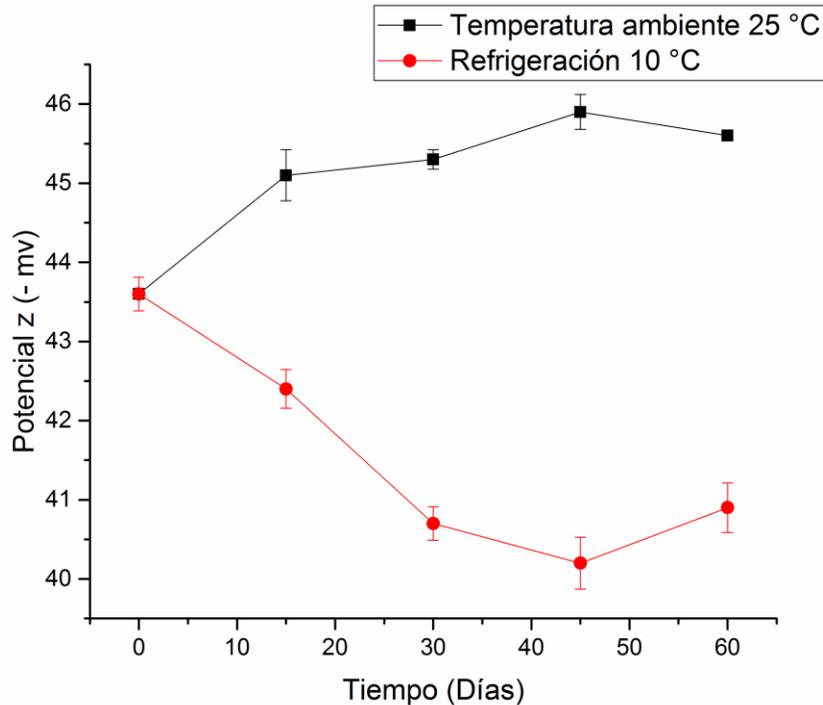
vehículos liposomales como A00EM aumentan la permeabilidad de extractos de plantas debido a su biocompatibilidad, tamaño, estabilidad y la eficacia de carga del fármaco para compuestos hidrófilos, lipófilos y anfifílicos.

La incorporación de moléculas de extractos herbales a los fosfolípidos de la fosfatidilcolina generan un complejo que mejora la permeabilidad del extracto. Esto a su vez también aumenta la biodisponibilidad sistémica del fármaco al mejorar el coeficiente de partición agua-aceite. Los extractos solubles en agua cuando se cargan en estos complejos de fosfolípidos mejoran significativamente la biodisponibilidad de los metabolitos debido a una mayor penetración a través del estrato corneo (Shivanand *et al.*, 2010; Ajazuddin *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2012).

La elección de usar transetosomas (A0M) como transportadores del extracto etanólico de *Chenopodium murale* base a sus características fisicoquímicas, dio como resultado en este ensayo, una mayor permeabilidad del extracto, mejorando así sus propiedades farmacocinéticas. Este comportamiento es semejante investigación de Yeh *et al.*, (2013) donde indica los transetosomas son más eficaces para administrar y mejorar la adsorción de extractos de té negro, que una solución hidroalcohólica del mismo extracto.

#### **5.3.11. Estabilidad durante el almacenamiento**

Se monitoreo la estabilidad de los encapsulados durante 60 días mediante el potencial Z, en condiciones de refrigeración y a temperatura ambiente. Se aprecia en la figura 28, que durante el periodo de valuación y en las dos condiciones, los valores se encuentran fuera del rango de moléculas inestables que comprende de -30 mV a + 30 mV, Sabeti *et al.*, (2014).



**Figura.- 28 Estabilidad durante el almacenamiento. Condiciones de refrigeración y temperatura ambiente.**

Para ambas condiciones se partió de un valor de  $-43.6 \pm 0.212$  mv, posterior a los 60 días se obtuvo que los encapsulados presentan mejor estabilidad a temperatura ambiente con un valor de  $-45.6 \pm 0.057$ , en cambio a temperaturas de  $10^{\circ}\text{C}$  la estabilidad se redujo hasta  $-40.9 \pm 0.312$ .

En la actualidad existen pocos estudios donde se evaluó la estabilidad durante el almacenamiento de los etosomas, (Abdulbaqi *et al.*, 2016). En el estudio de Oskuie *et al.*, (2017) indica que etosomas cargados con fluconazol en condiciones de refrigeración tuvieron un valor inicial de  $-7.51 \pm 0.22$  mV y después de seis meses  $-7.0 \pm 0.78$  mV, en condiciones de temperatura ambiente obtuvieron un valor inicial de  $7.51 \pm 0.22$  mV y después de seis meses  $-5.4 \pm 1.30$  mV. A pesar de que sus vehículos están en el rango considerado como inestable, conservan un potencial Z constante en refrigeración. En contraste los transetosomas A0ME se encuentran en el rango de vesículas estables y posiblemente a temperatura ambiente pueden permanecer con un potencial Z constante por periodos más prolongados.

### 5.3.12. Ensayo de cierre de herida (cicatrización)

Se realizó el ensayo de cierre de herida, con el fin de conocer el efecto cicatrizante del extracto etanólico microfiltrado de *Chenopodium murale* antes y después de ser encapsulado. El porcentaje se calculó mediante la comparación del área inicial y el área correspondiente al día de medición.

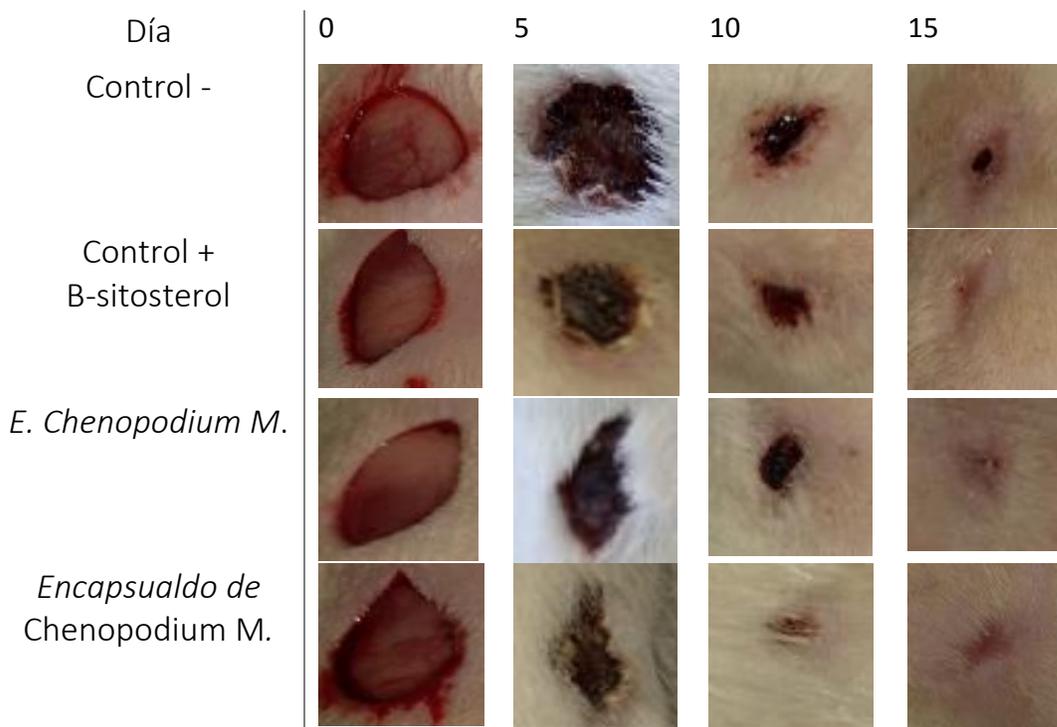
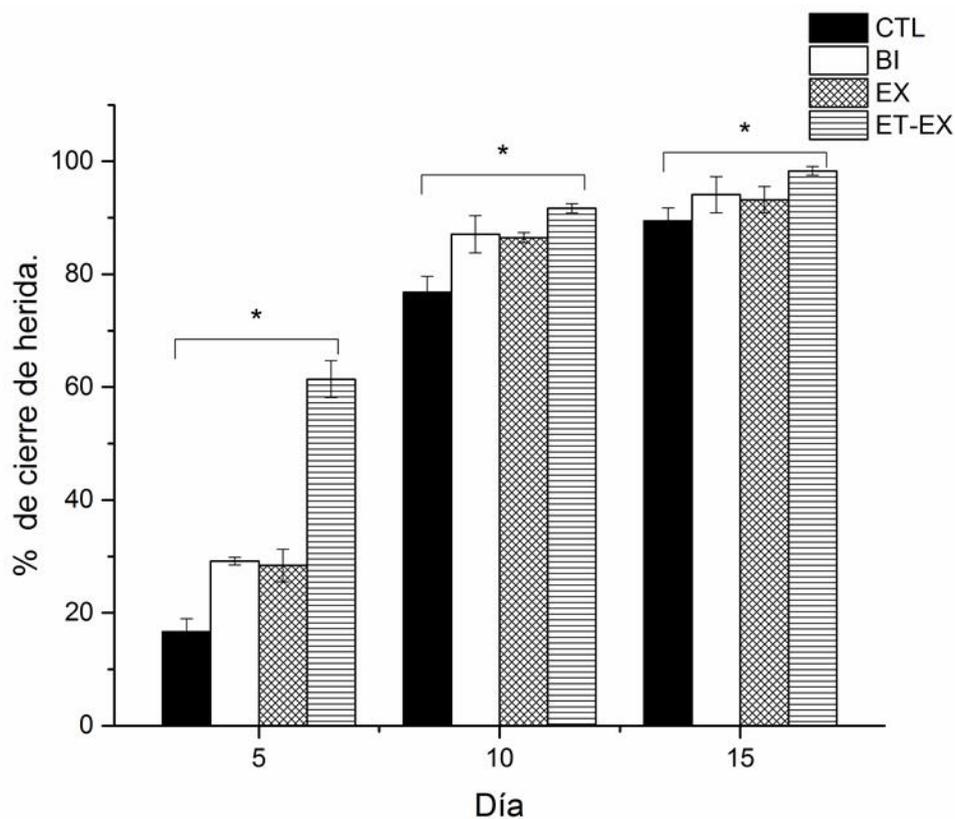


Figura.- 29 Progreso de la cicatrización con diferentes tratamientos

Se empleó como control positivo  $\beta$ -Sitosterol ya que es un compuesto químico que pertenece al grupo de los fitosteroles, que son los esteroides que se encuentran de forma natural en las plantas. Su estructura química es muy similar a la del colesterol. Está ampliamente distribuido en el mundo vegetal donde cumplen la función de mantener la estructura y el funcionamiento de las membranas celulares. Se ha reportado que el  $\beta$ -Sitosterol estimula la angiogénesis en ensayos de membranas corioalantoicas de embriones de pollo. La inducción de la angiogénesis se observó en el 64% de los huevos a una concentración de 10 mg. (Moon, *et al.*, 1999 y Kasote, 2015). Además de que actualmente se usa como tratamiento natural al 1% ante una

gran cantidad de diferentes tipos de herida, ya que el b-sitosterol regula significativamente la expresión de ARN mensajero del factor de crecimiento de hepatocitos, considerado como uno de los factores de crecimiento más importantes relacionados con el proceso de curación de heridas de la piel en ratas, (Bardaa *et al.*, 2016).

En la figura 30 se aprecia que en los primeros 5 días de cicatrización, los encapsulados que contienen el extracto microfiltrado de *Chenopodium murale*, tienen un 40 % más de cierre de herida respecto al control negativo y en los días 10 y 15 mantienen un porcentaje por encima de los demás tratamientos. Este comportamiento se observa de manera visual en la figura 29.



**Figura.- 30 Ensayo de cicatrización.**

**Donde: CTL; sin tratamiento, Bi; Beta-sitosterol, EX; extracto, ET-EX; encapsulado.**

Cada columna representa la media de 9 mediciones de 3 animales y las barras verticales la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticas en comparación al control negativo de cada día (\*  $p < 0.05$ ).

Por otra parte, el tratamiento  $\beta$ -Sitosterol y el extracto sin encapsular tienen un porcentaje de cierre de herida muy cercano en todos los días y exhiben un 10% más del cierre de herida respecto al control negativo.

La propiedad cicatrizante del extracto etanólico de *Chenopodium murale* es atribuida a los metabolitos presentes; flavonoides, esteroides, fenoles y saponinas, además de que la propiedad antioxidante del extracto puede estar involucrada en la disminución de los procesos inflamatorios durante la cicatrización (Süntar *et al.*, 2012 y Manca *et al.*, 2015). En otros estudios se ha reportado que las plantas promueven la angiogénesis, principalmente a través de la regulación positiva de la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular y / o la activación de la vía proteína quinasas activada por mitógenos, siendo los responsables de la actividad proangiogénica: polifenoles, esteroides y saponinas (Strodtbeck, 2001 y Morgan & Nigam, 2013). La importancia de la angiogénesis en el proceso de cicatrización radica en formación de nuevos vasos sanguíneos (Kasote *et al.*, 2015).

La investigación de Arellano, (2014) indica que el extracto cetónico de *Chenopodium murale*, posee actividad antimicrobiana, además en su evaluación visual (no reporta mediciones de la herida) del cierre de herida, reporta que el extracto aplicado (en gel), tiene un cierre de herida mayor respecto al control positivo (nitrofurazona). En otro estudio, TrivellatoGrassi *et al.*, (2013) emplearon un extracto etanólico al 5% de *Chenopodium ambrosioides* en el ensayo de cicatrización y reportan que en el séptimo día se tiene el 29% de cierre de herida. Existe una problemática al querer comparar nuestros resultados con otros ensayos como los ya mencionados, debido a que no midieron la herida o la miden respecto al diámetro y no respecto al área de cicatrización, además de que la comparación entre tratamientos no es confiable debido a que sus heridas iniciales no son del mismo tamaño. En cambio, en nuestro estudio decidimos medir el área y determinar el porcentaje de cierre de herida, para evitar el error que se genera debido a los diferentes tamaños de las áreas iniciales en los diferentes grupos. El tratamiento del extracto etanólico de *Chenopodium murale* muestra un  $28.39 \pm 2.89$  % de cierre de herida en el día 5, lo que indica que hay un mayor efecto cicatrizante respecto a un extracto etanólico de *Chenopodium ambrosioides*.

Es importante mencionar que en heridas de segunda intención se lleva a cabo un proceso de cicatrización más complicado y prolongado. La cicatrización por segunda intención es causada por infección, trauma excesivo, pérdida o aproximación imprecisa del tejido, por ello es importante reducir el tiempo de este proceso. Los transetosomas A0EM (ET-EX) pueden contribuir a una reducción del tiempo de cicatrización con un porcentaje de cierre de herida  $61.40 \pm 3.27$  % en el día número 5, donde cabe la posibilidad de que el extracto atrapado tenga mayor efecto cicatrizante debido a que el proceso de angiogénesis esta reportado que se lleva acabo del día 3 al 5, (Kasote *et al.*, 2015). Además, la reducción del tiempo de cicatrización usando el extracto encapsulado puede deberse a las mejoras farmacocinéticas que adquirió el extracto microfiltrado después de ser atrapado en los transetosomas (como se describe en el ensayo de permeabilidad), (Shivanand *et al.*, 2010).

Los componentes durante el diseño del transetosoma juegan un papel importante para reducir el tiempo de cicatrización. Por ejemplo, el etanol y los fosfolípidos actúan de forma sinérgica para mejorar la penetración de metabolitos en piel con formulaciones etosómicas. El etanol suaviza las bicapas lipídicas de las vesículas y del estrato córneo simultáneamente, cambiando la disposición y disminuyendo la densidad de los lípidos de la piel. Por lo tanto, las vesículas altamente maleables y blandas de un sistema etosomal penetrarán en la estructura alterada del estrato córneo y crearán un camino a través de la piel. La liberación del agente terapéutico se produce por la fusión de estas vesículas en las membranas celulares de las capas más profundas de la piel. Se sugiere que los transetosomas tienen propiedades superiores de permeación de la piel sobre los etosomas clásicos. Esto se debe a que los transetosomas contienen tanto etanol como el activador de superficie (Tween 80), que actúan conjuntamente para aumentar la maleabilidad vesicular y la perturbación de lípidos de la piel (Touitou *et al.*, 2000; Ainbinder *et al.*, 2010; Akhtar, 2014; Ascenso *et al.*, 2015; Abdulbaqi *et al.*, 2016).

### 5.3.13. Comprobación histológica del proceso de cicatrización.

Se utilizó una técnica básica de tinción hematoxilina y eosina, con el fin de observar el progreso de cicatrización en los diferentes tratamientos (Figura 31).

La cicatrización de las heridas de la piel progresa a través de fases secuenciales y superpuestas de inflamación, reparación y remodelación, cada fase de curación está dirigida por la compleja coordinación e interacción de varios tipos de células contenidas dentro de la herida, incluidas las células inflamatorias como los neutrófilos, los macrófagos, los linfocitos y las plaquetas (DiPietro,2003).

De acuerdo con las imágenes de la figura 31 podemos observar que en los primeros 5 días del proceso de cicatrización, el tratamiento del extracto encapsulado de *Chenopodium murale*, ha logrado que durante la fase de remodelación se observe una mayor cantidad de tejido que pueden ser células nativas de la piel como fibroblastos, queratinocitos y células endoteliales vasculares (Wetzler, *et al.*, 2000).Esto concuerda con el ensayo de cierre de herida, donde estadísticamente se describe un mayor porcentaje de cierre de herida cuando se utiliza los transetosomas como trasportadores del extracto de *Chenopodium murale*.

Los tratamientos del extracto y el control positivo muestran una cantidad de tejido semejante, posiblemente debido a estas sustancias promueven la angiogénesis, principalmente a través de la regulación positiva de la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (Strodtbeck, 2001 y Morgan & Nigam, 2013). Los factores de crecimiento desempeñan papeles dominantes en la regulación de la proliferación celular, la diferenciación y la síntesis de la matriz extracelular (DiPietro,2003).

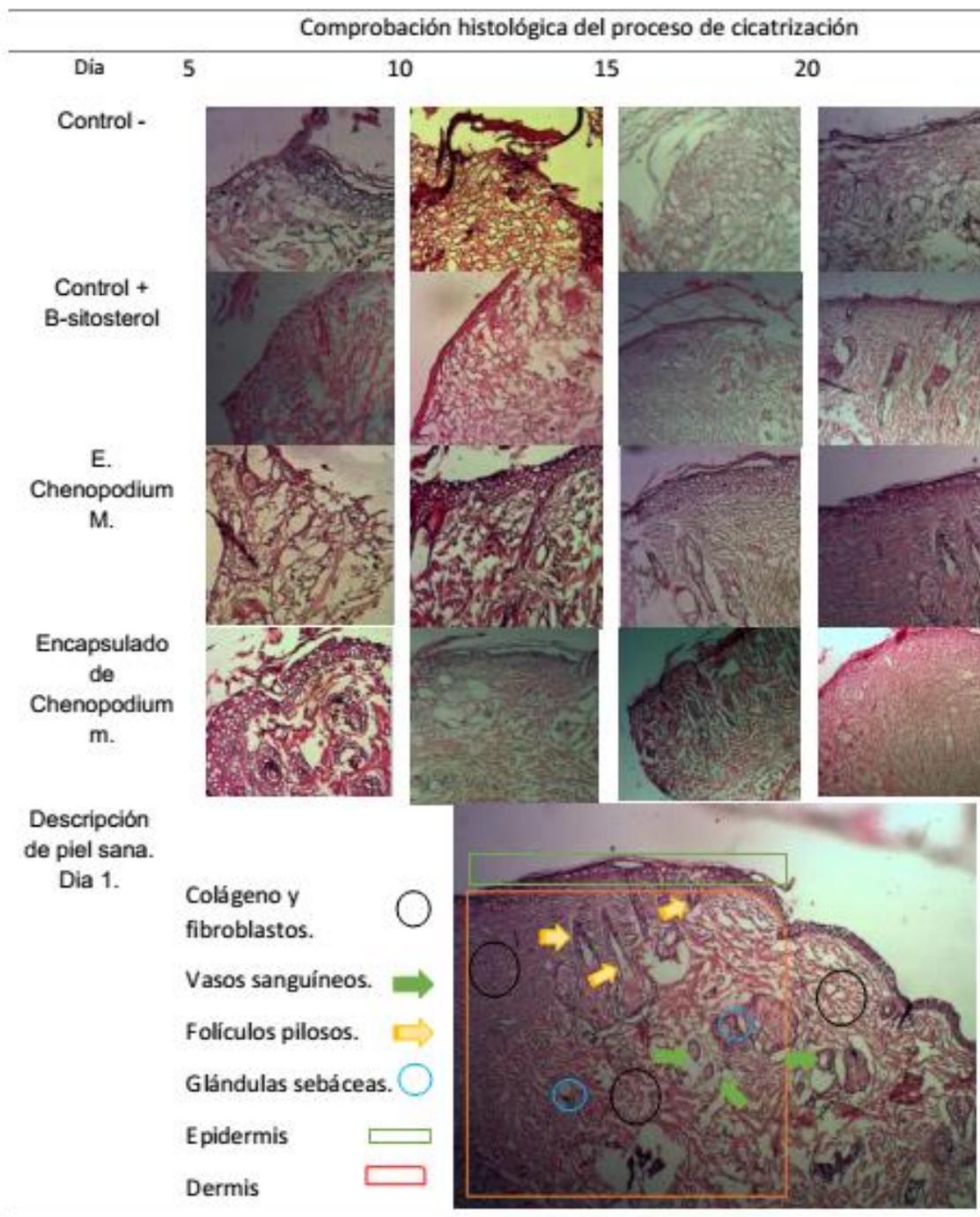


Figura.- 31 Comprobación histológica durante el proceso de cicatrización.

El día 10, en las heridas se observó en los tres tratamientos crecimiento de la epidermis y la dermis. El encapsulado muestra una mayor abundancia de

fibroblastos. Las tasas de epitelización más bajas se observaron en el grupo de control negativo.

En el día número 15 podemos observar que el extracto y el extracto encapsulado muestran la presencia de folículos pilosos, vasos sanguíneos, y glándulas sebáceas, que no se perciben en el control negativo. Por otra parte, el tratamiento de beta- sitosterol en comparación a los tratamientos con extracto, presenta los mismos componentes a excepción de folículos pilosos. En este día el grupo de control negativo aun no cierra la herida totalmente.

En el día número 20 todos los tratamientos y el control negativo son semejantes al corte histológico inicial, ya que en este día se ha cerrado completamente la herida, pero continua el proceso de remodelación que puede durar hasta 1 año. El control negativo es el único grupo que presenta poca presencia de folículos pilosos.

El seguimiento del proceso de cicatrización a través de histología permitió identificar un mayor efecto cicatrizante para el extracto cuando es encapsulado en transetosomas, semejante a lo que reporta Lu *et al.*, (2016), donde monitorean mediante histología el efecto cicatrizante de taninos cargados en un vehículo de gelatina -quitosano.

## VI.- CONCLUSIONES.

Se caracterizó el extracto etanólico de *Chenopodium murale* antes y después de microfiltrar, lo cual permitió identificar y cuantificar los metabolitos con probable efecto cicatrizante, se confirmó la prevalencia de la actividad antioxidante y la huella digital en IR después de un proceso de microfiltración, además, se reportó que el extracto no es citotóxico en fibroblastos (CHO-k1).

Se diseñaron vehículos etosomales, de los cuales se obtuvo información detallada de la estructura, estabilidad, morfología, elasticidad, entre otros parámetros que permitieron seleccionar un vehículo (A0M) con las mejores características para una administración tópica y transdérmica de metabolitos de *Chenopodium murale*.

Se encapsulo el extracto obteniendo transetosomas (A0EM) con mayor estabilidad respecto al vehículo vacío (A0M), se confirmó el atrapamiento mediante microscopia de fluorescencia y la conservación de la huella digital en IR, además los encapsulados presentaron una alta estabilidad durante el almacenamiento y el aumento de la permeabilidad del extracto en piel.

En los ensayos de cicatrización se reportó que el efecto cicatrizante del extracto etanólico microfiltrado de *Chenopodium murale* es semejante al de  $\beta$ - sitosterol y que este aumenta al transportar el extracto en transetosomas, logrando una disminución del tiempo de cicatrización y un porcentaje de cierre de herida de  $61.40 \pm 3.27$  % en los primeros 5 días.

Como perspectiva se pretende estudiar a fondo los mecanismos específicos de acción del extracto de *Chenopodium murale* en cicatrización y complementar los estudios de liberación de los vehículos transetosomales, ya que generar una forma de administración tópica y transdérmica de un extracto estructuralmente complejo, da pauta a generar nuevos tratamientos fitoterapéuticos, que aseguren la entrega de las sustancias de interés, su preservación y eficacia.

## VII.- REFERENCIAS

- Abdel-Aziz, M. S., Shaheen, M. S., El-Nekeety, A. A., & Abdel-Wahhab, M. A. (2014). Antioxidant and antibacterial activity of silver nanoparticles biosynthesized using
- Abdelghany, A. M., Abdelrazek, E. M., Badr, S. I., Abdel-Aziz, M. S., & Morsi, M. A. (2015). Effect of Gamma-irradiation on biosynthesized gold nanoparticles using *Chenopodium murale* leaf extract. *Journal of Saudi Chemical Society*.
- Abdulbaqi, I. M., Darwis, Y., Khan, N. A. K., Assi, R. A., & Khan, A. A. (2016). Ethosomal nanocarriers: the impact of constituents and formulation techniques on ethosomal properties, in vivo studies, and clinical trials. *International journal of nanomedicine*, 11, 2279.
- Aggarwal, N., & Goindi, S. (2013). Dermatopharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of ethosomes of griseofulvin designed for dermal delivery. *Journal of nanoparticle research*, 15(10), 1983.
- Ahmad, N., Abbasi, B. H., & Fazal, H. (2013). Evaluation of antioxidant activity and its association with plant development in *Silybum marianum* L. *Industrial Crops and Products*, 49, 164-168.
- Ainbinder D, Touitou E. A new approach for skin tumor treatment: from delivery system characterization to in vivo evaluation. *Drug Deliv Transl Res*. 2011;1(1):53–65
- Ajazuddin, Alexander, A., Khan, J., Giri, T. K., Tripathi, D. K., Saraf, S., & Saraf, S. (2012). Advancement in stimuli triggered in situ gelling delivery for local and systemic route. *Expert opinion on drug delivery*, 9(12), 1573-1592.
- Akhtar, N. (2014). Vesicles: a recently developed novel carrier for enhanced topical drug delivery. *Current drug delivery*, 11(1), 87-97.
- Akhtar, N., & Pathak, K. (2012). Cavamax w7 composite ethosomal gel of clotrimazole for improved topical delivery: development and comparison with ethosomal gel. *AAPS PharmSciTech*, 13(1), 344-355.
- Alexander, A., Patel, R. J., Saraf, S., & Saraf, S. (2016). Recent expansion of pharmaceutical nanotechnologies and targeting strategies in the field of phytopharmaceuticals for the delivery of herbal extracts and bioactives. *Journal of Controlled Release*, 241, 110-124.
- American Diabetes Association. (2013). Economic costs of diabetes in the US in 2012. *Diabetes Care* 2013; 36: 1033–1046. *Diabetes care*, 36(6), 1797.
- Andrades, P., Sepúlveda, S., & González, J. (2004). Curación avanzada de heridas. *Rev Chil Cir*, 56(4), 396-403.
- Arellano C., Aasith. (2014), Estudio de la actividad farmacológica de *Chenopodium* sp. y *Barkleyanthus Salicifolius*, tesis de ingeniería farmacéutica, UPIBI, IPN.
- Arias, J. (2002). Generalidades médico-quirúrgicas. Editorial Tebar.
- Arora, S. K., Itankar, P. R., Verma, P. R., Bharné, A. P., & Kokare, D. M. (2014). Involvement of NFκB in the antirheumatic potential of *Chenopodium album* L., aerial parts extracts. *Journal of ethnopharmacology*, 155(1), 222-229.
- Arvizu Espinosa, M. G. (2009). Identificación de metabolitos secundarios y evaluación de actividad antioxidante de extractos acuosos de *Portulaca oleraceae*, *Chenopodium murale* y *Malva parviflora* (Doctoral dissertation).
- Ascenso A, Raposo S, Batista C, et al. Development, characterization, and skin delivery studies of related ultradeformable vesicles: transfersomes, ethosomes, and transethosomes. *Int J Nanomedicine*. 2015 ;10:5837–5851.
- Bagatolli, L. A. (2006). To see or not to see: lateral organization of biological membranes and fluorescence microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1758(10), 1541-1556.

- Bakirtzi, C., Triantafyllidou, K., & Makris, D. P. (2016). Novel lactic acid-based natural deep eutectic solvents: Efficiency in the ultrasound-assisted extraction of antioxidant polyphenols from common native Greek medicinal plants. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*.
- Baldi, A., & Choudhary, N. (2013). In vitro antioxidant and hepatoprotective potential of chenopodium album extract. *International Journal of Green Pharmacy*, 7(1), 50.
- Banga, A. K. (2002). *Electrically assisted transdermal and topical drug delivery*. CRC Press.
- Bardaa, S., Chabchoub, N., Jridi, M., Moalla, D., Mseddi, M., Rebai, T., & Sahnoun, Z. (2016). The effect of natural extracts on laser burn wound healing. *Journal of Surgical Research*, 201(2), 464-472.
- Barrón-Yáñez, R. M., García-Mateos, M., Soto-Hernández, M. R., Colinas-León, T., & Kite, G. (2011). Flavonoides y actividad antioxidante de *Calia secundiflora* (Ort.) Yakovlev. *Revista fitotecnica mexicana*, 34(3), 151-157.
- Barua, C. C., Talukdar, A., Begum, S. A., Pathak, D. C., Sarma, D. K., Borah, R. S., & Gupta, A. (2012). In vivo wound-healing efficacy and antioxidant activity of *Achyranthes aspera* in experimental burns. *Pharmaceutical biology*, 50(7), 892-899.
- Beaskoetxea Gómez, P., Bermejo Martínez, M., Capillas Pérez, R., Cerame Pérez, S., García Collado, F., Gómez Coiduras, J. M., ... & Segovia Gómez, T. (2013). Situación actual sobre el manejo de heridas agudas y crónicas en España: Estudio ATENEA. *Gerokomos*, 24(1), 27-31.
- Bhadra D, Jain NK, Umamaheshwari RB, Jain S. Ethosomes: a novel vesicular carrier for enhanced transdermal delivery of an antiHIV agent. *Indian J Pharm Sci*. 2004;66(1):72–81.
- Bisht, D., Verma, D., Mirza, M. A., Anwer, M. K., & Iqbal, Z. (2017). Development of ethosomal gel of ranolazine for improved topical delivery: In vitro and ex vivo evaluation. *Journal of Molecular Liquids*, 225, 475-481.
- Biswas, T. K., & Mukherjee, B. (2003). Plant medicines of Indian origin for wound healing activity: a review. *The international journal of lower extremity wounds*, 2(1), 25-39.
- Boateng, J. S., Matthews, K. H., Stevens, H. N., & Eccleston, G. M. (2008). Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. *Journal of pharmaceutical sciences*, 97(8), 2892-2923.
- Boateng, J., & Catanzano, O. (2015). Advanced therapeutic dressings for effective wound healing—a review. *Journal of pharmaceutical sciences*, 104(11), 3653-3680
- Bonifácio, B. V., da Silva, P. B., dos Santos Ramos, M. A., Negri, K. M. S., Bauab, T. M., & Chorilli, M. (2014). Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. *International journal of nanomedicine*, 9, 1.
- Bragagni M, Mennini N, Maestrelli F, Cirri M, Mura P. Comparative study of liposomes, transfersomes and ethosomes as carriers for improving topical delivery of celecoxib. *Drug Deliv*. 2012;19(7): 354–361.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25-30
- Brown, G. L., Curtsinger, L. J., White, M. I. C. H. A. E. L., Mitchell, R. O., Pietsch, J., Nordquist, R., ... & Schultz, G. S. (1988). Acceleration of tensile strength of incisions treated with EGF and TGF-beta. *Annals of surgery*, 208(6), 788.
- Bustos Córdova, E., Cabrales Martínez, R. G., Cerón Rodríguez, M., & Naranjo López, M. Y. (2014). Epidemiología de lesiones no intencionales en niños: revisión de estadísticas internacionales y nacionales. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 71(2), 68-75.
- Cabrera, M. A., Ferreyra, M. G., Chehin, R., Grupalli, S. A., & Cortéz, L. Control de temperatura basado en el efecto Peltier para estudios de mecanismos de formación molecular mediante espectroscopia infrarroja. Año 18 N° 31-Octubre de 2009, 2.

- Cáceres, M., & Heidy, L. (2003). Estudio preliminar del efecto de la microfiltración tangencial sobre la capacidad antioxidante en jugos de fruta clarificados.
- Casanova, E. V. (2015). Cuantificación de flavonoides totales y taninos presentes en el extracto acuoso de hojas de *Thea sinensis* L. y su capacidad antioxidante. *UCV-SCIENTIA*, 4(2), 161-174.
- Castillo Espinosa, J. C. (2014). Determinación del efecto vasodilatador de plantas y propóleos utilizados en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares (Doctoral dissertation).
- Cevc G, Blume G. Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. *Biochim Biophys Acta*. 1992;1104(1):226–232
- Cevc, G., Mazgareanu, S., & Rother, M. (2008). Preclinical characterisation of NSAIDs in ultradeformable carriers or conventional topical gels. *International journal of pharmaceutics*, 360(1), 29-39.
- Chang, C., Yang, M., Wen, H., & Chern, J. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), 178-182
- Chen, H., Pan, H., Li, P., Wang, H., Wang, X., Pan, W., & Yuan, Y. (2016). The potential use of novel chitosan-coated deformable liposomes in an ocular drug delivery system. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 143, 455-462
- Chen, Shing Bor. "Electrophoretic mobility of a spherical liposome." *Journal of colloid and interface science* 348.1 (2010): 177-182.
- Choi, D. Y., Huh, J. E., Lee, J. D., Cho, E. M., Baek, Y. H., Yang, H. R., ... & Park, D. S. (2005). *Uncaria rhynchophylla* induces angiogenesis in vitro and in vivo. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28(12), 2248-2252.
- Chu, Y., Yu, D., Wang, P., Xu, J., Li, D., & Ding, M. (2010). Nanotechnology promotes the full-thickness diabetic wound healing effect of recombinant human epidermal growth factor in diabetic rats. *Wound repair and regeneration*, 18(5), 499-505.
- Conesa, J. A. (2001). Kinetics of decomposition measured using thermobalance. *Fuel*, 80(14), 2123-2124.
- Coronado, M., Vega y León, S., Gutiérrez, R., Vázquez, M., & Radilla, C. (2015). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Revista chilena de nutrición*, 42(2), 206-212.
- Dayan, N., & Toutou, E. (2000). Carriers for skin delivery of trihexyphenidyl HCl: ethosomes vs. liposomes. *Biomaterials*, 21(18), 1879-1885.
- de Azevedo Neta, C. P. C., Colodel, E. M., Balogun, S. O., de Oliveira, R. G., & de Oliveira Martins, D. T. (2014). Toxicological evaluation of the hydroethanolic extract of *Dilodendron bipinnatum* Radlk. *Journal of ethnopharmacology*, 155(1), 665-671.
- De Melo Junior, E. J. M., Raposo, M. J., Neto, J. L., Diniz, M. F. A., Junior, C. M., & Sant'Ana, A. E. G. (2002). Medicinal plants in the healing of dry socket in rats: microbiological and microscopic analysis. *Phytomedicine*, 9(2), 109-116.
- Delatorre-Herrera, J., Sánchez, M., Delfino, I., & Oliva, M. I. (2013). La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd), un tesoro andino para el mundo. *Idesia (Arica)*, 31(2), 111-114.
- Di Marzio, L., Marianecchi, C., Petrone, M., Rinaldi, F., & Carafa, M. (2011). Novel pH-sensitive non-ionic surfactant vesicles: comparison between Tween 21 and Tween 20. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 82(1), 18-24.
- DiPietro, L. A., & Burns, A. L. (Eds.). (2003). *Wound healing: methods and protocols* (Vol. 78). Springer Science & Business Media
- dos Santos, C. D., Scherer, R. K., Cassini, A. S., Marczak, L. D. F., & Tessaro, I. C. (2016). Clarification of red beet stalks extract by microfiltration combined with ultrafiltration. *Journal of Food Engineering*, 185, 35-41.

- Dubey, V., Mishra, D., & Jain, N. K. (2007). Melatonin loaded ethanolic liposomes: physicochemical characterization and enhanced transdermal delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 67(2), 398-405.
- Dunn, D. L., & Phillips, J. (2009). Ethicon wound closure manual. Ethicon, Inc., Somerville NJ. Available via [http://www.jnjgateway.com/public/NLDUT/Wound\\_Closure\\_Manual1.pdf](http://www.jnjgateway.com/public/NLDUT/Wound_Closure_Manual1.pdf). Accessed, 7.
- Dynamic-lights-cattering. (2017). Malvern. <https://www.malvern.com/es/products/technology/dynamic-light-scattering>
- El Maghraby, G. M., Williams, A. C., & Barry, B. W. (2000). Oestradiol skin delivery from ultradeformable liposomes: refinement of surfactant concentration. *International journal of pharmaceutics*, 196(1), 63-74.
- Eloy, J. O., de Souza, M. C., Petrilli, R., Barcellos, J. P. A., Lee, R. J., & Marchetti, J. M. (2014). Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: strategies to enhance encapsulation and delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 123, 345-363.
- Elsayed, M. M., Abdallah, O. Y., Naggar, V. F., & Khalafallah, N. M. (2007). Lipid vesicles for skin delivery of drugs: reviewing three decades of research. *International journal of pharmaceutics*, 332(1), 1-16.
- Eming, S. A., Martin, P., & Tomic-Canic, M. (2014). Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Science translational medicine*, 6(265), 265sr6-265sr6.
- Ezhilarasi, P. N., Karthik, P., Chhanwal, N., & Anandharamakrishnan, C. (2013). Nanoencapsulation techniques for food bioactive components: a review. *Food and Bioprocess Technology*, 6(3), 628-647.
- Fang, Yi-Ping, et al. "Comparison of 5-aminolevulinic acid-encapsulated liposome versus ethosome for skin delivery for photodynamic therapy." *International journal of pharmaceutics* 356.1 (2008): 144-152.
- Fiallos-Jurado, J., Pollier, J., Moses, T., Arendt, P., Barriga-Medina, N., Morillo, E., ... & Leon-Reyes, A. (2016). Saponin determination, expression analysis and functional characterization of saponin biosynthetic genes in *Chenopodium quinoa* leaves. *Plant Science*.
- Froelich, S., Onegi, B., Kakooko, A., Siems, K., Schubert, C., & Jenett-Siems, K. (2007). Plants traditionally used against malaria: phytochemical and pharmacological investigation of *Momordica foetida*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17(1), 1-17.
- Fry DW, White JC, Goldman ID (1978) Rapid separation of low molecular weight solutes from liposomes without dilution. *Anal Biochem* 90(2):809–815
- Gainza, G., Villullas, S., Pedraz, J. L., Hernandez, R. M., & Igartua, M. (2015). Advances in drug delivery systems (DDSs) to release growth factors for wound healing and skin regeneration. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 11(6), 1551-1573.
- Galindo, W., Rosales, M., Murgueito, E., & Larrahondo, J. E. (1989). Sustancias antinutricionales en las hojas de guamo, nacedero y matarratón. *Livestock Research for Rural Development*.
- Garti N. & McClements.D. J. (2012). Encapsulation technologies and delivery systems for food ingredients and nutraceuticals. Woodhead Publishing Limited. Pag.4-5
- Gertsch, J., 2011. Botanical drugs, synergy, and network pharmacology: forth andback to intelligent mixtures. *Planta Med.* 77, 1086–1098.
- Gharib, R., Greige-Gerges, H., Fourmentin, S., Charcosset, C., & Auezova, L. (2015). Liposomes incorporating cyclodextrin–drug inclusion complexes: Current state of knowledge. *Carbohydrate polymers*, 129, 175-186.
- Ghosh, P. K., & Gaba, A. (2013). Phyto-extracts in wound healing. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 16(5), 760-820.

- Giacobbo, A., do Prado, J. M., Meneguzzi, A., Bernardes, A. M., & de Pinho, M. N. (2015). Microfiltration for the recovery of polyphenols from winery effluents. *Separation and Purification Technology*, 143, 12-18.
- Godin, B., & Touitou, E. (2005). Erythromycin ethosomal systems: physicochemical characterization and enhanced antibacterial activity. *Current drug delivery*, 2(3), 269-275.
- Gouin, S. (2004). Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in food science & technology*, 15(7), 330-347.
- Guerrero Rodriguez, Daysi. Obtención e identificación preliminar de un crudo de saponinas de *Capraria biflora* L. Predicción de la actividad antiinflamatoria. Diss. Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas, 2004.
- H.G. Yang, H.J. Kim, H.S. Kim, S.N. Park, Ethosome formulation for enhanced transdermal delivery of *Artemisia princeps* Pampanini extracts, *Appl. Chem. Eng.* 24 (2013) 190–195.
- He, R., Cui, D. X., & Gao, F. (2009). Preparation of fluorescence ethosomes based on quantum dots and their skin scar penetration properties. *Materials Letters*, 63(20), 1662-1664.
- Hodúr, C., Kertész, S., Beszédes, S., László, Z., & Szabó, G. (2009). Concentration of marc extracts by membrane techniques. *Desalination*, 241(1), 265-271.
- Hope, M. J., Bally, M. B., Webb, G., & Cullis, P. R. (1985). Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 812(1), 55-65.
- Hsu, B. Y., Lin, S. W., Inbaraj, B. S., & Chen, B. H. (2016). Simultaneous determination of phenolic acids and flavonoids in *Chenopodium formosanum* Koidz.(djulis) by HPLC-DAD-ESI-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 132, 109-116.
- Ibarra-Alvarado, C., Rojas, A., Mendoza, S., Bah, M., Gutiérrez, D. M., Hernández-Sandoval, L., & Martínez, M. (2010). Vasoactive and antioxidant activities of plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of cardiovascular diseases. *Pharmaceutical biology*, 48(7), 732-739.
- Ibrahim, L. F., Kawashty, S. A., Baiuomy, A. R., Shabana, M. M., El-Eraky, W. I., & El-Negoumy, S. I. (2007). A comparative study of the flavonoids and some biological activities of two *Chenopodium* species. *Chemistry of natural Compounds*, 43(1), 24-28.
- James, R. H. (2003). Natural products: the secondary metabolites. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK..[ONLINE] DOI, 10(39), 9781847551535.
- Jesus, N. Z., Silva Júnior, I. F., Lima, J., Colodel, E. M., & Martins, D. T. (2012). Hippocratic screening and subchronic oral toxicity assessments of the methanol extract of *Vatairea macrocarpa* heartwood in rodents. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22(6), 1308-1314.
- Jiménez, C. E. (2008). Advanced methods in the treatment of acute and chronic wounds. *Revista Colombiana de Cirugía*, 23(3), 146-155.
- Jones, M. N. (1995). The surface properties of phospholipid liposome systems and their characterisation. *Advances in colloid and interface science*, 54, 93-128.
- Kasetvatin, C., Rujvipat, S., & Tiyaboonchai, W. (2015). Combination of elastic liposomes and low frequency ultrasound for skin permeation enhancement of hyaluronic acid. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 135, 458-464.
- Kasote, D., Ahmad, A., & Viljoen, A. Proangiogenic Potential of Medicinal Plants in Wound Healing.(2015)
- Kim, H. A., Jeong, K. S., & Kim, Y. K. (2008). Soy extract is more potent than genistein on tumor growth inhibition. *Anticancer research*, 28(5A), 2837-2841.
- Kokanova-Nedialkova, Z., Nedialkov, P. T., & Nikolov, S. D. (2009). The genus *Chenopodium*: phytochemistry, ethnopharmacology and pharmacology. *Pharmacognosy Reviews*, 3(6), 280.

- Krasner, D., Rodeheaver, G., Woo, K., & Sibbald, G. (2012). *Chronic Wound Care 5*. BookBaby.
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology (Campinas)*, 25(4), 726-732.
- Lazarus, G. S., Cooper, D. M., Knighton, D. R., Margolis, D. J., Percoraro, R. E., Rodeheaver, G., & Robson, M. C. (1994). Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. *Wound Repair and Regeneration*, 2(3), 165-170.
- Le Vay, D. (2008). *Anatomía y fisiología humana*. Editorial Paidotribo.
- Li G, Fan Y, Fan C, et al. Tacrolimus-loaded ethosomes: physicochemical characterization and in vivo evaluation. *Eur J Pharm Biopharm*. 2012; 82(1):49–57.
- Li, K., Diao, Y., Zhang, H., Wang, S., Zhang, Z., Yu, B., ... & Yang, H. (2011). Tannin extracts from immature fruits of *Terminalia chebula* Fructus Retz. promote cutaneous wound healing in rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11(1), 86.
- Limsuwan, T., & Amnuakit, T. (2012). Development of ethosomes containing mycophenolic acid. *Procedia Chemistry*, 4, 328-335.
- López-Pinto JM, González-Rodríguez ML, Rabasco AM. Effect of cholesterol and ethanol on dermal delivery from DPPC liposomes. *Int J Pharm*. 2005;298(1):1–12.
- Lopez-Rubio, A., Gavara, R., & Lagaron, J. M. (2006). Bioactive packaging: turning foods into healthier foods through biomaterials. *Trends in Food Science & Technology*, 17(10), 567-575.
- Lorke, D. (1983). A new approach to practical acute toxicity testing. *Archives of toxicology*, 54(4), 275-287
- Lu, B., Wang, T., Li, Z., Dai, F., Lv, L., Tang, F., ... & Lan, G. (2016). Healing of skin wounds with a chitosan–gelatin sponge loaded with tannins and platelet-rich plasma. *International journal of biological macromolecules*, 82, 884-891.
- Makkar, H., Blümmel, M., Borowy, N. K., & Becker, K. (1993). Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 61(2), 161-165.
- Manca, M. L., Zaru, M., Bacchetta, G., Biggio, T., Cappai, N., Cabras, A., ... & Fadda, A. M. (2015). A new technological approach to improve the efficacy of a traditional herbal medicinal product in wound healing. *Industrial Crops and Products*, 63, 71-78.
- Mechant, E., De Marez, T., Aper, J., & Bulcke, R. (2010). Chlorophyll fluorescence protocol for quick detection of triazinone resistant *Chenopodium album* L. *Communications in agricultural and applied biological sciences*, 75(2), 83-90.
- Medina, O. P., Zhu, Y., & Kairemo, K. (2004). Targeted liposomal drug delivery in cancer. *Current pharmaceutical design*, 10(24), 2981-2989.
- Mena, F., Mena, A., & Mena, B. (2014). Polyphenols Nano-Formulations for Topical Delivery and Skin Tissue Engineering-Chapter 65.
- Mishra, A. D., Khunt, D. M., Ghayal, A. H., Patel, C. N., & Shah, D. R. (2012). Formulation and optimization of ethosomes for transdermal delivery of felodipine. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 5(12), 1509-1517.
- Mishra, D., Mishra, P. K., Dabadghao, S., Dubey, V., Nahar, M., & Jain, N. K. (2010). Comparative evaluation of hepatitis B surface antigen–loaded elastic liposomes and ethosomes for human dendritic cell uptake and immune response. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6(1), 110-118.
- Miyata, H., & Hotani, H. (1992). Morphological changes in liposomes caused by polymerization of encapsulated actin and spontaneous formation of actin bundles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(23), 11547-11551.

- Monsonís Filella, B. (2013). *Abordaje en las heridas de difícil cicatrización* (Bachelor's thesis).
- Montes LR, Alonso A, Goñi FM, Bagatolli LA (2007) Giant unilamellar vesicles electroformed from native membranes and organic lipid mixtures under physiological conditions. *Biophys J* 10:3548–3554
- Moon, E. J., Lee, Y. M., Lee, O. H., Lee, M. J., Lee, S. K., Chung, M. H., ... & Kim, K. W. (1999). A novel angiogenic factor derived from Aloe vera gel:  $\beta$ -sitosterol, a plant sterol. *Angiogenesis*, 3(2), 117-123.
- Moon, E. J., Lee, Y. M., Lee, O. H., Lee, M. J., Lee, S. K., Chung, M. H., ... & Kim, K. W. (1999). A novel angiogenic factor derived from Aloe vera gel:  $\beta$ -sitosterol, a plant sterol. *Angiogenesis*, 3(2), 117-123.
- Morgan, C., & Nigam, Y. (2013). Naturally derived factors and their role in the promotion of angiogenesis for the healing of chronic wounds. *Angiogenesis*, 16(3), 493-502.
- Moulaoui, K., Caddeo, C., Manca, M. L., Castangia, I., Valenti, D., Escribano, E., ... & Manconi, M. (2015). Identification and nanoentrapment of polyphenolic phytocomplex from *Fraxinus angustifolia*: in vitro and in vivo wound healing potential. *European journal of medicinal chemistry*, 89, 179-188.
- Nascimento, F. R., Cruz, G. V., Pereira, P. V. S., Maciel, M. C., Silva, L. A., Azevedo, A. P. S., ... & Guerra, R. N. (2006). Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment. *Life Sciences*, 78(22), 2650-2653.
- Nowak, R., Szewczyk, K., Gawlik-Dziki, U., Rzymowska, J., & Komsta, Ł. (2016). Antioxidative and cytotoxic potential of some *Chenopodium* L. species growing in Poland. *Saudi journal of biological sciences*, 23(1), 15-23.
- Olivás-Aguirre, F. J., Wall-Medrano, A., González-Aguilar, G. A., López-Díaz, J. A., Álvarez-Parrilla, E., de la Rosa, L. A., & Ramos-Jimenez, A. (2015). Taninos hidrolizables; bioquímica, aspectos nutricionales y analíticos y efectos en la salud. *Nutrición Hospitalaria*, 31(1).
- Oskue, A. B., Nasrollahi, S. A., & Nafisi, S. (2018). Design, synthesis of novel vesicular systems using turpentine as a skin permeation enhancer. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 43, 327-332.
- Paco, K., Ponce-Soto, L. A., Lopez-Illasaca, M., & Aguilar, J. L. (2016). Determinación del efecto cicatrizante de *Piper aduncum* (matico) en fibroblastos humanos. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 33(3), 438-447.
- Paixão, A., Mancebo, B., Sánchez, L. M., Walter, A., de Fontes-Pereira, A. M. A., Soca, M., ... & Nicolau, S. (2014). Tamizaje fitoquímico de extractos metanólicos de *Tephrosia vogelii* Hook, *Chenopodium ambrosioides*, *Cajanus cajan* y *Solanum nigrum* L. de la provincia de Huambo, Angola. *Revista de Salud Animal*, 36(3), 164-169.
- Paolino D, Celia C, Trapasso E, Cilurzo F, Fresta M. Paclitaxel-loaded ethosomes®: potential treatment of squamous cell carcinoma, a malignant transformation of actinic keratoses. *Eur J Pharm Biopharm*. 2012; 81(1):102–112.
- Parente, L. M. L., Andrade, M. A., Brito, L. A. B., Moura, V. M. B. D. D., Miguel, M. P., Lino-Júnior, R. D. S., ... & Paulo, N. M. (2011). Angiogenic activity of *Calendula officinalis* flowers L. in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 26(1), 19-24.
- Patel, A. R., & Velikov, K. P. (2011). Colloidal delivery systems in foods: A general comparison with oral drug delivery. *LWT-Food Science and Technology*, 44(9), 1958-1964.
- Payá, M., Ferrándiz, M. L., Sanz, M. J., Bustos, G., Blasco, R., Rios, J. L., & Alcaraz, M. J. (1993). Study of the antioedema activity of some seaweed and sponge extracts from the mediterranean coast in mice. *Phytotherapy Research*, 7(2), 159-162.

- Pereira, V. A., de Arruda, I. N. Q., & Stefani, R. (2015). Active chitosan/PVA films with anthocyanins from Brassica oleraceae (Red Cabbage) as Time–Temperature Indicators for application in intelligent food packaging. *Food Hydrocolloids*, 43, 180-188.
- Perez, A. P., Altube, M. J., Schilrreff, P., Apezteguia, G., Celes, F. S., Zacchino, S., ... & Morilla, M. J. (2016). Topical amphotericin B in ultradeformable liposomes: Formulation, skin penetration study, antifungal and antileishmanial activity in vitro. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 139, 190-198.
- Petersen, M., Hans, J. and Matern, U. (2010) Biosynthesis of phenylpropanoids and related compounds, in *Annual Plant Reviews*, Vol. 40: Biochemistry of Plant Secondary Metabolism (ed. M.Wink.), Blackwell, Oxford, Chapter 4.
- Pierre, E. J., Perez-Polo, J. R., Mitchell, A. T., Matin, S., Foyt, H. L., & Herndon, D. N. (1997). Insulin-like growth factor-I liposomal gene transfer and systemic growth hormone stimulate wound healing. *The Journal of burn care & rehabilitation*, 18(4), 287-291.
- Popova, A. V., & Hinch, D. K. (2016). Effects of flavonol glycosides on liposome stability during freezing and drying. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1858(12), 3050-3060.
- Porras-Reyes, B. H., & Mustoe, T. A. (1992). Cicatrización: conceptos actuales. *AMC Acta médica colombiana*, 17(1), 31-45.
- Potawale, S. E., Luniya, K. P., Mantri, R. A., Mehta, U. K., Waseem, M. D., Sadiq, M. D., ... & Deshmukh, R. S. (2008). *Chenopodium ambrosioides*: an ethnopharmacological review. *Pharmacologyonline*, 2, 272-286.
- Prista, L.N., Alves, A.C., Morgado, R., 2011. *Tecnologia Farmacêutica*, 8th ed. Fundac , ão Calouste Gulbenkian, Lisbon.
- Qing, C. (2017). The molecular biology in wound healing & non-healing wound. *Chinese Journal of Traumatology*, 20(4), 189-193.
- Rando, G., Ramachandran, B., Rebecchi, M., Ciana, P., & Maggi, A. (2009). Differential effect of pure isoflavones and soymilk on estrogen receptor activity in mice. *Toxicology and applied pharmacology*, 237(3), 288-297.
- Rates, S. M. K. (2001). Plants as source of drugs. *Toxicon*, 39(5), 603-613
- Rawat, S., Singh, R., Thakur, P., Kaur, S., & Semwal, A. (2012). Wound healing agents from medicinal plants: a review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(3), S1910-S1917.
- Rodríguez, R., & González J. H. (2011). Métodos alternativos para el tratamiento de pacientes con heridas infectadas. *Medisan*, 15(4), 503-514.
- Romero, M. D., Martínez, J. A. G., & Vega, F. J. P. (2002). *Manual de cirugía menor*. Arán Ediciones
- Romo de Vivar Romo, A. (2006). Química de la flora mexicana: investigaciones en el Instituto de Química de la UNAM (No. Sirsi) a421887).
- Rutherford, H. (2011). *Structural Investigations of Liposomes: Effect of Phospholipid Hydrocarbon Length and the Incorporation of Sphingomyelin*(Doctoral dissertation, University of Saskatchewan).
- Rzedowski, G. D., & Rzedowski, J. (2005). *Flora Fanerogámica del Valle de México*. 1 a reimp. Instituto de Ecología, AC y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, 1406pp.
- Sabeti, B., Noordin, M. I., Mohd, S., Hashim, R., Dahlan, A., & Akbari Javar, H. (2014). Development and characterization of liposomal doxorubicin hydrochloride with palm oil. *BioMed research international*, 2014.
- Saini, R. K., & Keum, Y. S. (2016). Tocopherols and tocotrienols in plants and their products: A review on methods of extraction, chromatographic separation, and detection. *Food Research International*, 82, 59-70.

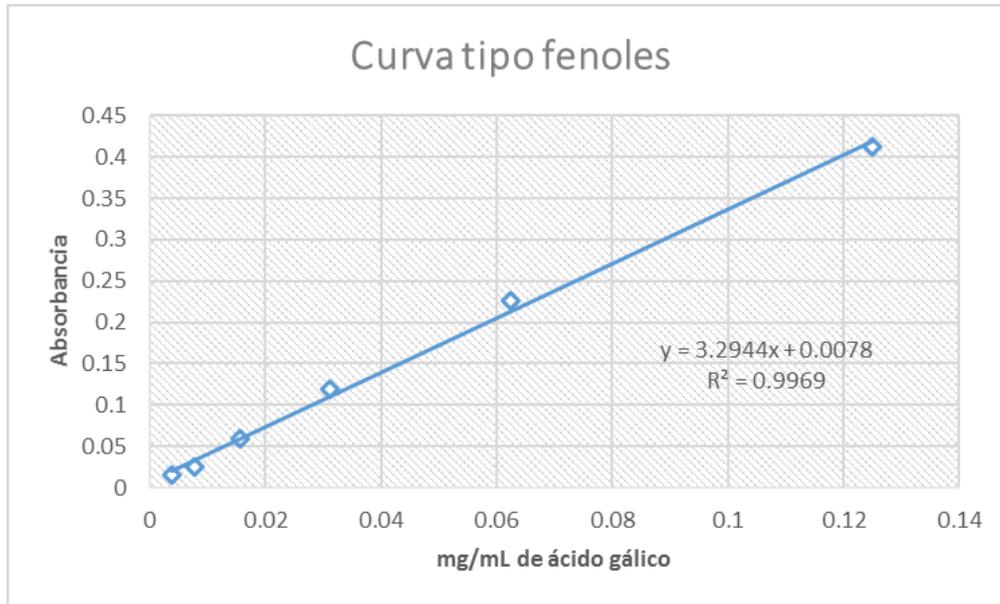
- Salazar, J. J., Ennis, W. J., & Koh, T. J. (2015). Diabetes Medications: Impact on Inflammation and Wound Healing. *Journal of Diabetes and its Complications*.
- Samad, A., Sultana, Y., & Aqil, M. (2007). Liposomal drug delivery systems: an update review. *Current drug delivery*, 4(4), 297-305.
- Sánchez, M. A. R., & Lobertini, M. H. (2017). *Medicina estética: Claves, abordajes y tratamientos actuales*. Formación Alcalá Editorial.
- Sandjo, L. P., & Kuete, V. (2013). 4 Triterpenes and Steroids from the Medicinal Plants of Africa. *Medicinal Plant Research in Africa*. Oxford: Elsevier, 135-202.
- Saraf, S. (2010). Applications of novel drug delivery system for herbal formulations. *Fitoterapia*, 81(7), 680-689.
- Sarwa, K., K Suresh, P., Rudrapal, M., & K Verma, V. (2014). Penetration of tamoxifen citrate loaded ethosomes and liposomes across human skin: a comparative study with confocal laser scanning microscopy. *Current drug delivery*, 11(3), 332-337.
- Shefer, A., & Shefer, S. (2008). The application of nanotechnology in the food industry.
- Shivanand, P., & Kinjal, P. (2010). Phytosomes: technical revolution in phytomedicine. *International Journal of PharmTech Research*, 2(1), 627-631.
- Shivhare, Y., Singh, P., Upadhyay, U., Sharma, S., Shukla, S., Singhai, A. K., & Soni, P. (2010). Determination of Physicochemical parameters and DPPH radical scavenging activity of *Chenopodium album* Linn. *Pharmacognosy Journal*, 2(14), 7-10.
- Singhai, S. L. A. K. (2013). Wound healing effect of flavonoid rich fraction and luteolin isolated from *Martynia annua* Linn. on streptozotocin induced diabetic rats.
- Singleton, V., & Rossi, J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal Enology Viticulture*, 16, 144-158.
- Song, C. K., Balakrishnan, P., Shim, C. K., Chung, S. J., Chong, S., & Kim, D. D. (2012). A novel vesicular carrier, transethosome, for enhanced skin delivery of voriconazole: characterization and in vitro/in vivo evaluation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 92, 299-304.
- Straubinger, R. M., Hong, K., Friend, D. S., & Papahadjopoulos, D. (1983). Endocytosis of liposomes and intracellular fate of encapsulated molecules: encounter with a low pH compartment after internalization in coated vesicles. *Cell*, 32(4), 1069-1079.
- Strodtbeck, F. (2001). Physiology of wound healing. *Newborn and infant nursing reviews*, 1(1), 43-52.
- Sun, D. W. (Ed.). (2009). *Infrared spectroscopy for food quality analysis and control*. Academic Press.
- Sun, J., Ge, J., Liu, W., Wang, X., Fan, Z., Zhao, W., ... & Lee, S. T. (2012). A facile assay for direct colorimetric visualization of lipopolysaccharides at low nanomolar level. *Nano Research*, 5(7), 486-493.
- Süntar, I., Akkol, E. K., Nahar, L., & Sarker, S. D. (2012). Wound healing and antioxidant properties: do they coexist in plants?. *Free Radicals and Antioxidants*, 2(2), 1-7.
- Tettegah, M., Eklu-Kadegbeku, K., Aklikokou, A. K., Agbonon, A., De Souza, C., & Gbeassor, M. (2009). Infected wound healing and antimicrobial effects of *Chenopodium ambrosioides* and *Mitracarpus scaber*. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 3(3).
- Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G., & Kaur, H. (2011). Phytochemical screening and extraction: a review. *Internationale pharmaceutica scientia*, 1(1), 98-106.
- Torchilin, V. P. (2005). Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature reviews Drug discovery*, 4(2), 145-160.
- Torelló, M., Viscasillas, A., & Pozo, A. D. (2002). Liposomas (I). Conceptos generales y relación con las estructuras cutáneas. *Offarm: Farmacia y Sociedad*, 21(9), 188-190.

- Touitou, E. (1996). U.S. Patent No. 5,540,934. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Touitou, E., Dayan, N., Bergelson, L., Godin, B., & Eliaz, M. (2000). Ethosomes—novel vesicular carriers for enhanced delivery: characterization and skin penetration properties. *Journal of Controlled Release*, 65(3), 403-418.
- TrivellatoGrassi, L., Malheiros, A., Meyre-Silva, C., da Silva Buss, Z., Monguilhott, E. D., Fröde, T. S., ... & de Souza, M. M. (2013). From popular use to pharmacological validation: A study of the anti-inflammatory, anti-nociceptive and healing effects of *Chenopodium ambrosioides* extract. *Journal of ethnopharmacology*, 145(1), 127-138.
- Tuero, J. H. G., Ramírez, R. R., Pineda, M. M., Quiala, M. J. G., & Salazar, J. C. (2004). Heridas. *Métodos de tratamiento. Medisan*, 8(1), 33-42.
- Tyagi, R. K., Garg, N. K., Jadon, R., Sahu, T., Katare, O. P., Dalai, S. K., ... & Marepally, S. K. (2015). Elastic liposome-mediated transdermal immunization enhanced the immunogenicity of *P. falciparum* surface antigen, MSP-1 19. *Vaccine*, 33(36), 4630-4638.
- Upadhyay, N. K., Kumar, R., Siddiqui, M. S., & Gupta, A. (2011). Mechanism of wound-healing activity of *Hippophae rhamnoides* L. leaf extract in experimental burns. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2011.
- Valencia, G., Garín, M.(2010). *Manual de prácticas de productos naturales(1a Ed.)*. México D.F
- Valenzuela, G. M., Cravzov, A. L., Soro, A. S., Tauguinias, A. L., Giménez, M. C., & Gruszycki, M. R. (2014). Relación entre actividad antioxidante y contenido de fenoles y flavonoides totales en semillas de *Cucurbita* spp. *Dominguezia*, 30(1), 19-24.
- Villaseñor, J. L., & Espinosa, F. J. (1998). *Catálogo de Malezas de México*. Universidad Nacional Autónoma de México. Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario.
- Vrignaud, S., Benoit, J. P., & Saulnier, P. (2011). Strategies for the nanoencapsulation of hydrophilic molecules in polymer-based nanoparticles. *Biomaterials*, 32(33), 8593-8604.
- Weissig, V. (Ed.). (2010). *Liposomes: Methods and protocols (Vol. 2)*. New York (NY): Humana Press.
- Wetzler, C., Kämpfer, H., Stallmeyer, B., Pfeilschifter, J., & Frank, S. (2000). Large and sustained induction of chemokines during impaired wound healing in the genetically diabetic mouse: prolonged persistence of neutrophils and macrophages during the late phase of repair. *Journal of Investigative Dermatology*, 115(2), 245-253.
- Wink, M. (2010). Functions and biotechnology of plant secondary metabolites. *Annual Plant Reviews* 39.
- Xu, R. (2008). Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement. *Particuology*, 6(2), 112-115.
- Yeh, M. I., Huang, H. C., Liaw, J. H., Huang, M. C., Wu, T. H., Huang, K. F., & Hsu, F. L. (2013). Ethosomes in hair dye products as carriers of the major compounds of black tea extracts. *International journal of dermatology*, 52(7), 868-875.
- Yin, F., Guo, S., Gan, Y., & Zhang, X. (2014). Preparation of redispersible liposomal dry powder using an ultrasonic spray freeze-drying technique for transdermal delivery of human epithelial growth factor. *International journal of nanomedicine*, 9, 1665.
- Zhang JP, Wei YH, Zhou Y, Li YQ, Wu XA. Ethosomes, binary ethosomes and transfersomes of terbinafine hydrochloride: a comparative study. *Arch Pharm Res*. 2012;35(1):109–117
- Zhou, Y., Wei, Y., Liu, H., Zhang, G., & Wu, X. A. (2010). Preparation and in vitro evaluation of ethosomal total alkaloids of *Sophora alopecuroides* loaded by a transmembrane pH-gradient method. *Aaps Pharmscitech*, 11(3), 1350-1358.

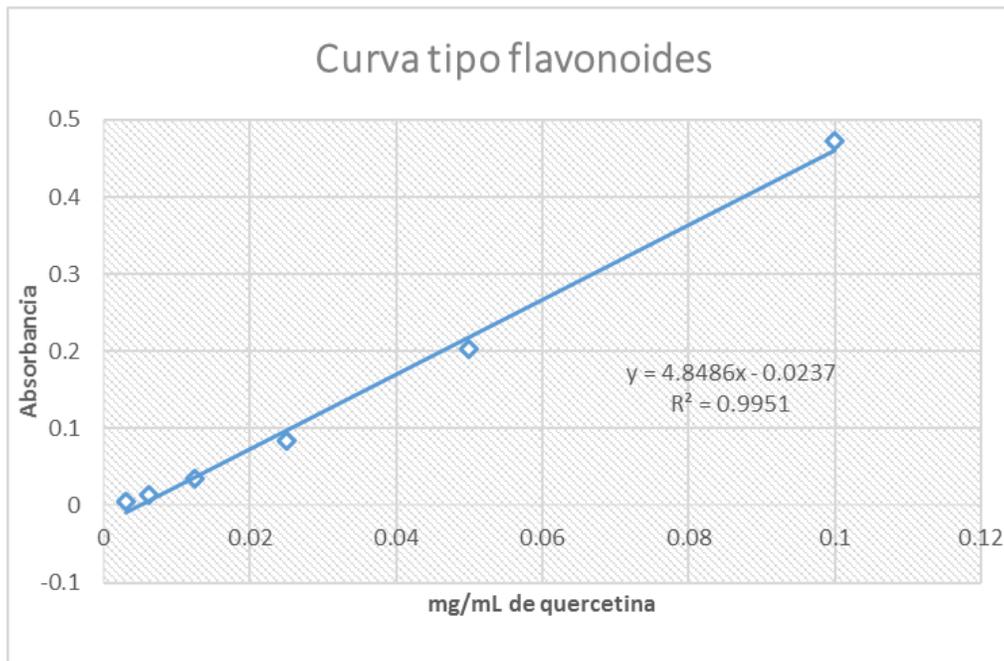
- Zhu X, Li F, Peng X, Zeng K. Formulation and evaluation of lidocaine base ethosomes for transdermal delivery. *Anesth Analg*. 2013;117(2): 352–357.
- Zorzi, G. K., Carvalho, E. L. S., von Poser, G. L., & Teixeira, H. F. (2015). On the use of nanotechnology-based strategies for association of complex matrices from plant extracts. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25(4), 426-436

## VIII. - ANEXOS

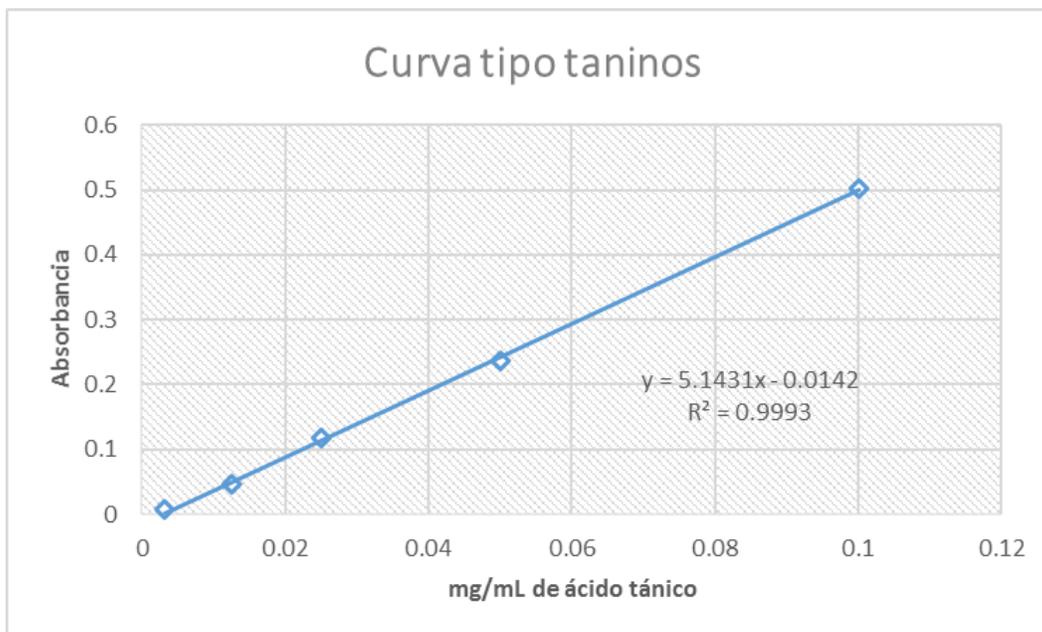
Anexo 1.- Curvas tipo de fenoles.



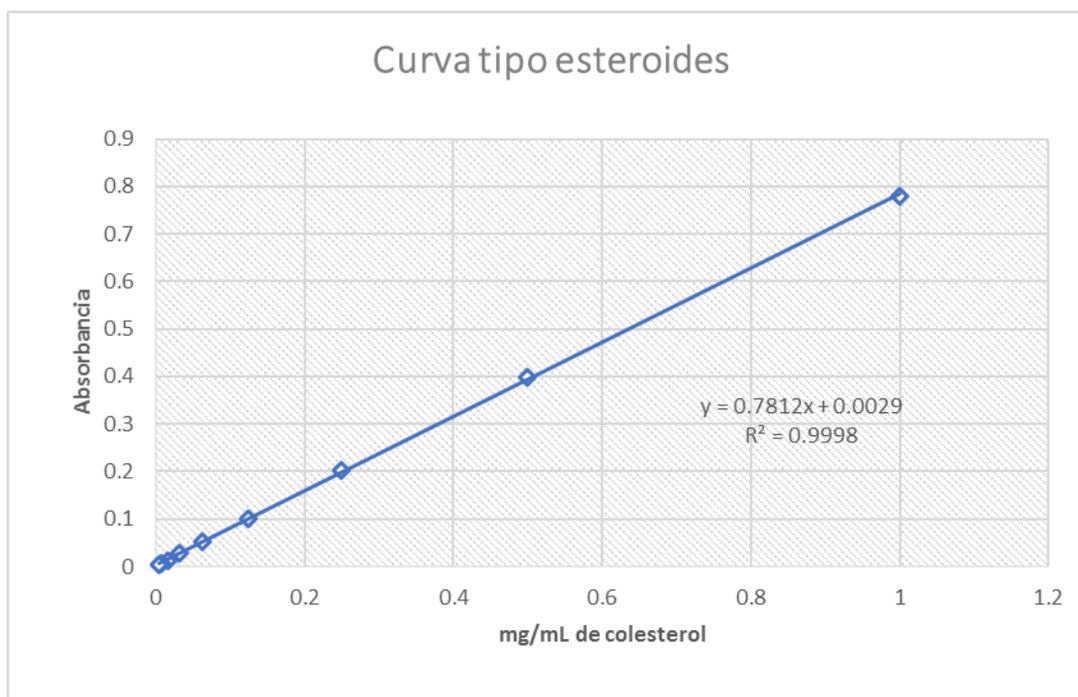
Anexo 2.- Curvas tipo de flavonoides.



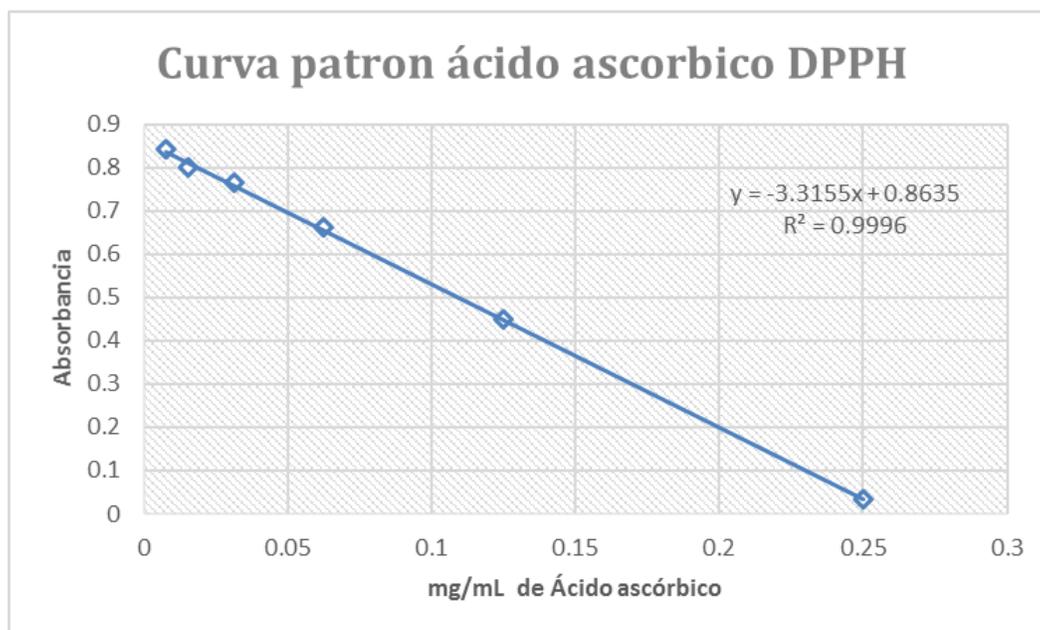
### Anexo 3 Curvas tipo de taninos.



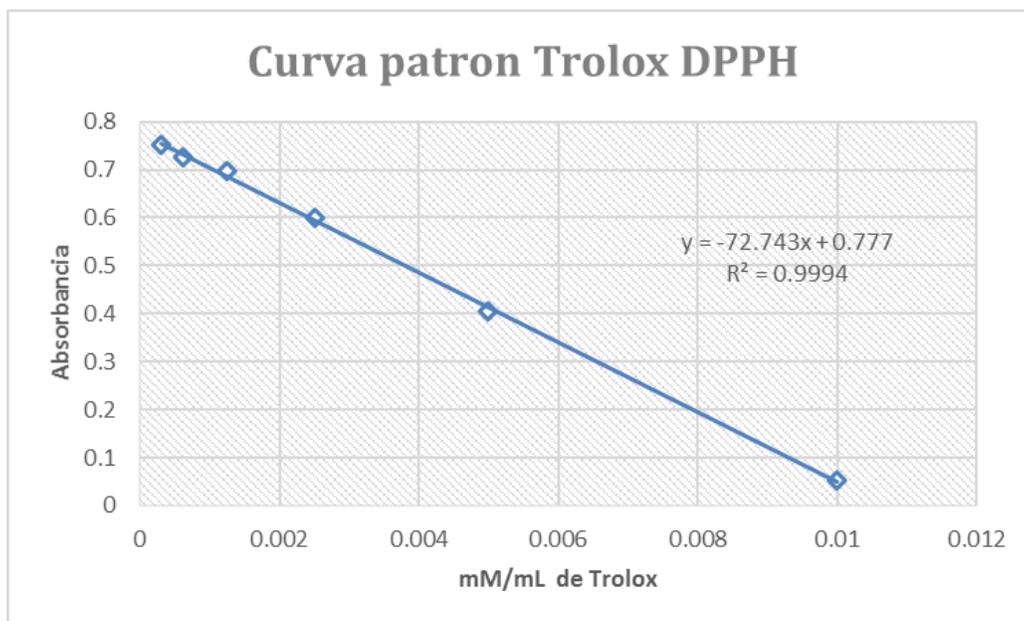
### Anexo 4.- Curvas tipo de esteroides.



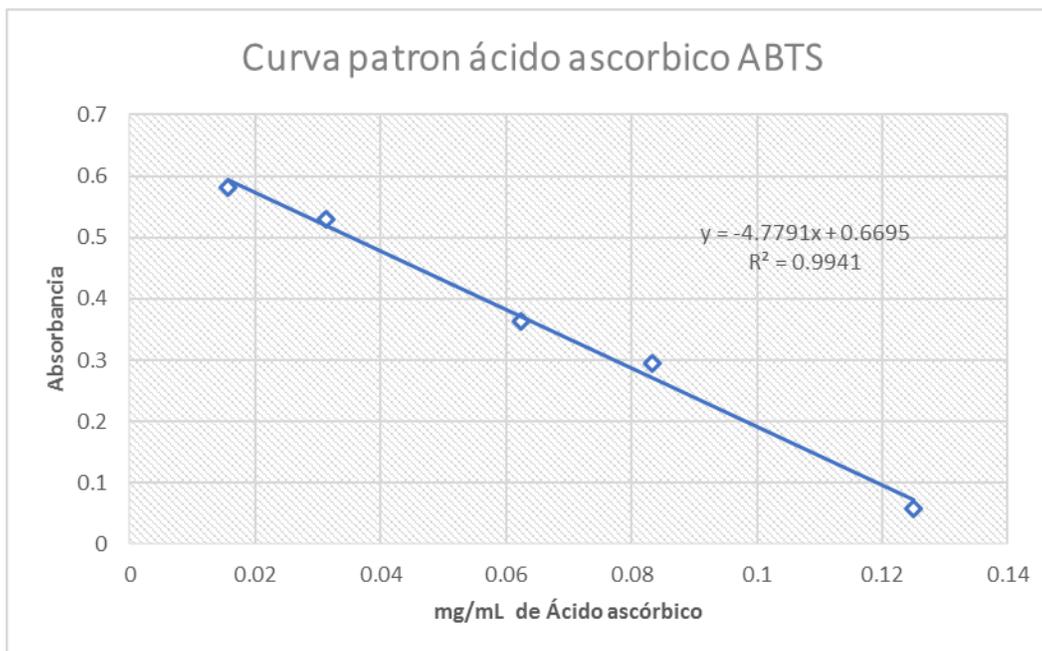
Anexo 5.- Curva tipo de ácido ascórbico para el ensayo de DPPH.



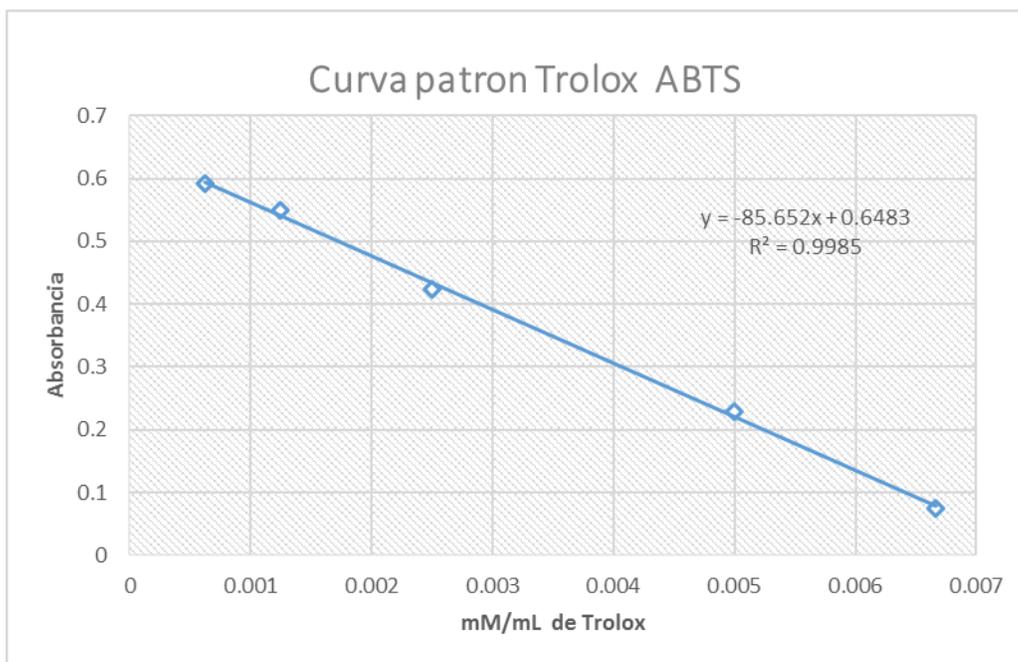
Anexo 5.1.- Curva tipo de trolox para el ensayo de DPPH.



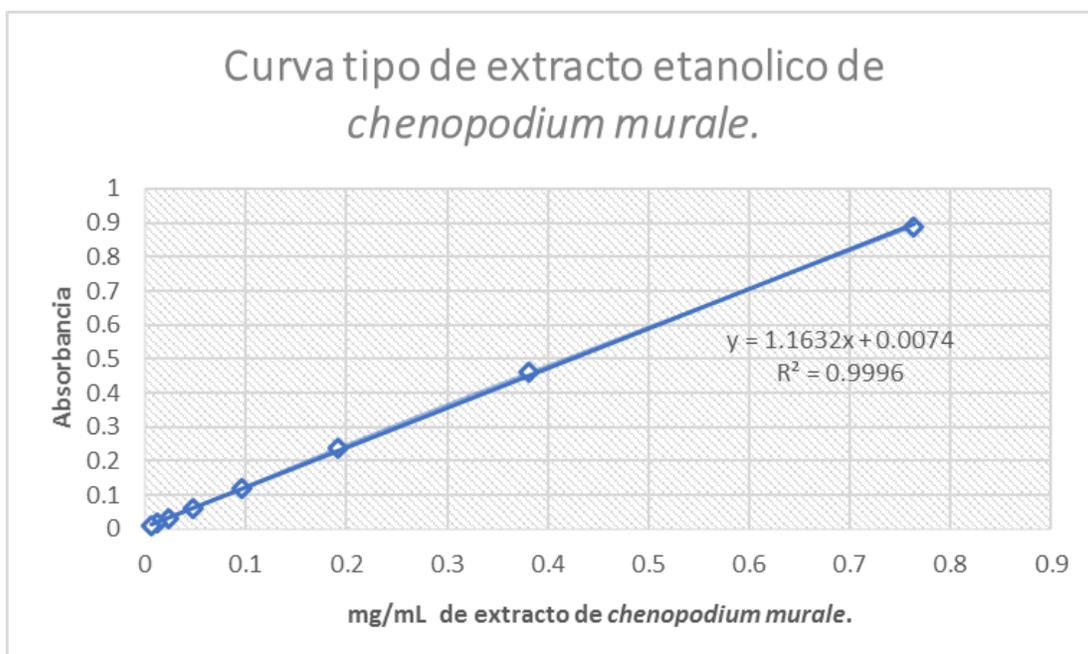
Anexo 6.- Curva tipo de ácido ascórbico para el ensayo de ABTS.



Anexo 6.1.- Curva tipo de trolox para el ensayo de ABTS.



Anexo 7.- Curva tipo de extracto etanólico de *Chenopodium murale*.



Anexo 8.- Datos para obtener IC50 de *Chenopodium murale* en línea CHO-K1

Datos para calcular IC50		
[mg/mL]extracto	Promedio de % de viabilidad	Desviación estándar.
3	10.789	1.353
2	48.707	5.702
1	71.041	4.175
0.5	79.762	4.068
0.25	86.572	3.321
Pendiente(m)= -26.621		
intersección =95.313		
R² =-0.989		
$IC50 = \frac{50 - \text{Intersección } (b)}{\text{Pendiente } (m)}$		IC50= 1.702 mg/mL

## Anexo 9.- Medición de herida y análisis de imagen.

En cada foto se capturo una regla milimétrica como referencia (1), se procesó la imagen con el software J image, se utilizó la regla como patrón de referencia y se asignó las unidades (2), finalmente se seleccionaba el área a medir (3).

