

Universidad Mayor de San Andrés
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
Carrera de Química Farmacéutica



**ELABORACIÓN Y EVALUACIÓN DE UNA FORMA
GALÉNICA DE ORIGEN VEGETAL CON
ACTIVIDAD FOTOPROTECTORA**

**TESIS DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIATURA EN
QUÍMICA FARMACÉUTICA**

POSTULANTE: Luis Nestor Apaza Ticona

ASESORES
Dra. Patricia Mollinedo P.
Dr. Arturo Mallea A.

La Paz – Bolivia
2006

Universidad Mayor de San Andrés

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS

Carrera de Química Farmacéutica



**ELABORACIÓN Y EVALUACIÓN DE UNA FORMA
GALÉNICA DE ORIGEN VEGETAL CON ACTIVIDAD
FOTOPROTECTORA**

Realizado en:

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS
CARRERA DE CIENCIAS QUÍMICAS
FACULTAD DE CIENCIAS PURAS Y NATURALES**

**DEPARTAMENTO DE ANÁLISIS QUÍMICO Y AMBIENTAL
INSTITUTO DE SERVICIO DE LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E
INVESTIGACIÓN EN SALUD**

**DEPARTAMENTO DE NEUROQUÍMICA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS CLEMENTE ESTABLE
(MONTEVIDEO – URUGUAY)**

**LA PAZ – BOLIVIA
2006**

*La pobreza no es una desgracia; la desgracia está en
la pobreza sin ambición.*

*La vejez no es causa de tristeza; la tristeza es para aquel que
ha vivido una vida en vano.*

*La muerte no es causa de pena; es pena para el que muere sin
haber dejado al mundo beneficio alguno.*

PROVERBIO CHINO

DEDICATORIA

“Dedicado a mi madre, por darme su infinito cariño y amor.

A mi padre, por enseñarme a servir a los demás.

A mi hermana, por ser la alegría de mi vida

A Dios por protegerme cada día.”

RESUMEN

El presente trabajo de tesis se realizó en el Instituto de Investigaciones Químicas, el Departamento de Análisis Químico – Ambiental y el Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, (Montevideo – Uruguay).

El progresivo deterioro de la capa de ozono ha ido originando cambios sobre muchos organismos debido al incremento de la radiación ultravioleta que conduce a la sobre producción de EROs (Especies Reactivas de Oxígeno), que actúan sobre la piel provocando un daño en las biomoléculas de los tejidos.

Para contrarrestar los efectos deletéreos de las EROs, existen mecanismos antioxidantes endógenos que actúan capturando las EROs.

Sin embargo, en ciertos estados patológicos estos mecanismos se ven sobrepasados. Una de las estrategias para disminuir el impacto negativo de las EROs ha sido reforzar los mecanismos antioxidantes endógenos mediante la suplementación de compuestos fenólicos antioxidantes, como los contenidos en extractos de especies vegetales de *A. spinosissima* Meyen ex Vogel y *S. ramulosum* Rausch.

El objetivo del presente estudio fue determinar si la elaboración de los preparados galénicos a partir de estas especies vegetales, poseen efectos antioxidantes *in vitro*, contra la decoloración del radical catiónico ABTS⁺ y efectos fotoprotectores *in vivo*, contra la radiación ultravioleta producido por una lámpara de luz ultravioleta sobre la piel de conejos y determinar su posible dependencia respecto a su concentración.

Los resultados sugieren que los preparados galénicos elaborados a partir de estas especies vegetales a una concentración de 5%, mostraron efectos fotoprotectores, sobre la piel de conejos sometidos a un modelo fisiológico de daño por EROs inducido por una lámpara de luz ultravioleta. Si bien ha sido demostrado la acción antioxidante / fotoprotectora de flavonoides y dépsidos en diversos modelos físico – químicos *in vitro*, se sugiere ensayar su potencial farmacológico de protección contra la radiación ultravioleta y las EROs en otros modelos fisiológicos.

PALABRAS CLAVE: *A. spinosissima*, *S. ramulosum*, Flavonoides, EROs, Antioxidantes.

SUMMARY

The present work was carried out at The Chemical Reserches, The Department of Chemical – Environmental Analisis and The Institute of Biological Reserches Clemente Estable (Montevideo – Uruguay).

The progressive deterioration in the ozone layer has originated changes over many organisms due to the increase of the ultraviolet radiation that leads to EROs (Reactive Oxigen Species) over production that acts over the skin causing damage in the biomolecules of tissues.

To counteract the EROs deleterious effects, there are endogenous antioxidants mechanisms that act capturing them.

However, these mechanisms are supressed in certain pathological states. And one of the strategies to decrease the EROs negative impact has been to reinforce the endogenous antioxidants mechanisms through the supplementation of phenólic antioxidants compounds, as the ones that are in vegetable species of *A. spinosissima* Meyen ex Vogel and *S. ramulosum* Rausch.

The objetive of this study was to determanate if the elaborations of galenic – prepared samples obtained from vegetable species have antioxidants effects *in vitro*, against the ABTS⁺ catiónico radical fading and photoprotectors *in vivo* against the ultraviolet radiation taken place by a ultraviolet light lamp over the rabbit skins and to determine its possible dependence related to its concentration.

The results suggest that the galenic – prepared samples elaborated obtained from these species vegetable to a concentration of 5% showed photoprotector effects over the rabbit skins after the damage by a ultraviolet light lamp. Even though, the antioxidant and photoprotective action of flavonoids and depsides has been demonstrated *in vitro* in different kinds of physical and chemical models, it is suggested to rehearse its protective pharmacological potential against the ultraviolet radiation and EROs in other physiologic models.

WORDS KEY: *A. spinosissima*, *S. ramulosum*, Flavonoids, EROs, Antioxidant.



ABREVIATURAS

ABTS: Ácido – 2,2' – azinobis – 3 – etilbenzotiazolina – 6 – sulfúrico.

ABTS⁺: Radical catiónico del ácido – 2,2' – azinobis – 3 – etilbenzotiazolina – 6 – sulfúrico.

ADN: Ácido desoxi ribonucleico.

AE: *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel.

ATP: Adenosin trifosfato.

CoA: Coenzima A.

DHBA: Ácido dihidri Benzoico.

DMSO: Dimetil sulfóxido.

DPPH: Radical 2,2 – Difenil – 1 – Picrilhidrazilo.

e⁻: Electrón.

EDTA: Etilen diamino tetraacético.

EROs : Especies reactivas del oxígeno.

FS: Fotosistema.

FSP: Factor de Protección Solar.

GSH: Glutati3n reducido.

GMP: Good Manufacturing Practice.

H⁺: Prot3n.

H: Hidrogeno.

HPLC: Cromatograf3a Liquida de Alta Eficacia.

HO₂: Radical hidroperoxido.

H₂O₂: Peroxido de Hidr3geno.

IIQ: Instituto de Investigaciones Qu3micas.



IIBCE: Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.

LDL: Lipoproteínas de Baja Densidad.

NADPH: Fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina reducida.

NADP⁺: Fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidada.

OH: Oxhidrilo.

OH·: Radical hidroxilo.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

O₂: Oxígeno.

O₂⁻: Anión superóxido.

¹O₂: Oxígeno singlete.

PABA: Ácido para amino Benzoico.

PBS: Solución Buffer Fosfato.

Rf: Razón de Frente.

SOS: Octil sulfato de sodio.

TROLOX: Ácido (+/-) – 6 – hidroxil – 2, 5, 7,8 – tetrametil – croman – 2 – Carboxílico.

TLC: Cromatografía en Capa Delgada.

UMSA: Universidad Mayor de San Andrés.

UV: Ultravioleta.

VLC: Cromatografía en Columna Cerrada.

(H): Hoja.

(T): Tallo.

(uy): Uruguay.

AGRADECIMIENTOS

Para la elaboración del presente trabajo de Tesis, se ha recurrido a la colaboración y aceptación de los valiosos consejos de personas que han contribuido para la culminación de esta meta, para quienes expreso mi más profundo agradecimiento.

En este momento deseo hacer llegar mis más sinceros agradecimientos a todos aquellos que colaboraron de una u otra manera al desarrollo y culminación de esta tesis:

A mi asesores la **Dra. Patricia Mollinedo** y el **Dr. Arturo Mallea**, que me guiaron en cada paso de mi investigación, como también por la dedicación, enseñanza y amistad que me brindaron. Ya que son el espejo donde cualquier “aprendiz” quisiera verse reflejado, ejemplos de profesionalidad, y elegancia investigadora por excelencia.

A ASDI / SAREC, por solventar la investigación fitoquímica como al Instituto de Investigaciones Químicas de la Carrera de Química de la Facultad de Ciencias Puras y Naturales, donde se realizo la iniciación de este trabajo y a todos sus integrantes por apoyar el proyecto.

Al Departamento de Análisis Químico y Ambiental del Instituto de Servicio de Laboratorio de Diagnóstico e Investigación en Salud como a sus integrantes, donde se realizo la segunda fase (investigación galénica), del proyecto.

A LANBIO, por solventar la investigación biológica como al Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, (Montevideo – Uruguay) y sus integrantes, donde se culmino el proyecto.

A los Dres. Tito Estévez, Dra. Ninoska Flores, Dr. Alberto Jiménez, MSc. Luis Morales, Dr. José Luis Vila, Dr. Juan Luis Arias, Dra. Rosario Peñalosa, Dr. Federico Dajas (*uy*), Dra. Felicia Rivera (*uy*), por su desinteresada cooperación durante la elaboración del trabajo.

A los docentes de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, por impartirme sus conocimientos y amistad, en especial a los Dres. Wilma Strauss, Dr. Gonzalo Reyes, Dra. Aurelia Curtino (*uy*), Dra. Lourdes Rodrigo, Dra. Amelia Guzmán, Dr. Rene Rojas, Dra. Maria Luisa Daza, Dr. Pablo Irahola y Dra. Carola Loza.

A mis compañeros y amigos en especial a Marcelo Colque, Nelson Sirpa, Enrique Curtino (*uy*), Oscar Gandarillas, Pamela Canaviri, Andrea Morquio (*uy*).

A mi hermana Daly Apaza, por el apoyo constante que me brindo en todas las fases de la realización de este trabajo.

A mis padres **Luis y Natividad**, por su permanente apoyo y haber tenido siempre fé en que podía salir adelante.

INDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.	iv
SUMMARY.	v
ABREVIATURAS.	vi
AGRADECIMIENTOS.	vii
INDICE DE CONTENIDO.	viii
1. <u>INTRODUCCIÓN.</u>	1
2. <u>MARCO TEORICO.</u>	3
2.1. ANTECEDENTES.	3
2.2. RADIACIÓN ULTRAVIOLETA.	5
2.2.1. TIPOS DE RADIACIÓN SOLAR	5
2.2.2. EFECTO DE LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA – B EN LOS SERES HUMANOS.	6
2.2.3. TIPOS DE PIEL SEGUN SU REACCIÓN FRENTE A LA EXPOSICIÓN A LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA – B SOLAR.	6
2.2.4. FACTORES QUE RIGEN LA INTENSIDAD DE RADIACIÓN ULTRAVIOLETA – B.	8
2.3. ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO (EROs).	9
2.3.1. ESTRÉS OXIDATIVO.	9
2.3.2. PRODUCCIÓN DE EROs.	10
2.3.3. REACCIONES EN CADENA DE LAS EROs.	11
2.3.4. SISTEMAS ANTIOXIDANTES.	11
2.4. COMPUESTOS FENOLICOS.	12
2.4.1. CLASIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS.	13
2.4.2. FLAVONOIDES.	14
2.4.2.1. DISTRIBUCIÓN.	15
2.4.2.2. FUNCIÓN DE LOS FLAVONOIDES EN LAS PLANTAS.	15
2.4.2.3. CATABOLISMO.	15

2.4.2.4. METABOLISMO LOS FLAVONOIDES EN EL ORGANISMO HUMANO	15
2.4.2.5. PROPIEDAD ANTIOXIDANTE.	16
2.4.2.6. PROPIEDAD PROOXIDANTE.	18
2.4.3. METABOLITOS LIQUÉNICOS.	19
2.4.3.1. PROPIEDADES.	19
2.5. ESPECIES VEGETALES.	21
2.5.1. <i>Adesmia spinosissima</i> Meyen ex Vogel.	21
2.5.1.1. CLASIFICACIÓN.	21
2.5.1.2. PARTE UTILIZADA.	21
2.5.1.3. HÁBITAT.	21
2.5.1.4. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS.	21
2.5.1.5. COMPOSICION QUIMICA.	21
2.5.1.6. RECOLECCIÓN.	21
2.5.1.7. PROPIEDADES.	21
2.5.2. <i>Stereocaulon ramulosum</i> Rausch.	22
2.5.2.1. CLASIFICACIÓN.	22
2.5.2.2. PARTE UTILIZADA.	22
2.5.2.3. HABITAT.	22
2.5.2.4. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS.	22
2.5.2.5. FISILOGIA	22
2.5.2.6. ESTRUCTURAS REPRODUCTIVAS.	22
2.5.2.7. PROPAGACIÓN.	22
2.5.2.8. COMPOSICION QUIMICA.	23
2.5.2.9. PROPIEDADES.	23
2.6. FARMACIA GALÉNICA.	24
2.6.1. PREFORMULACIÓN.	24
2.6.2. FORMULACIÓN.	24
2.6.3. ASPECTOS GENERALES DE LAS CREMAS.	25
2.6.4. FUNCIONES Y PROPIEDADES DE LOS COMPONENTES DE LAS BASES DE LAS CREMAS.	25
2.6.4.1. AGUA.	25
2.6.4.2. HUMECTANTES.	25
2.6.4.3. EMULSIFICANTES.	26
2.6.4.4. BASES GRASAS.	30
2.6.5. DETERMINACIÓN DE LA ORIENTACIÓN DE LAS BASES	32
2.6.5.1. PRUEBA DE DILUCIÓN.	32

2.6.5.2. PRUEBA DEL COLORANTE.	32
2.6.6. FOTOPROTECTORES.	33
2.6.6.1. PRINCIPIOS DE FOTOPROTECCIÓN.	33
2.6.6.2. CLASIFICACIÓN.	33
2.6.6.3. TIPOS DE FOTOPROTECTORES.	36
2.6.6.4. ESPECTRO DE ABSORCIÓN DE LOS FOTOPROTECTORES.	36
2.6.6.5. FACTORES QUE INFLUENCIAN LA EFICACIA DE LOS FOTOPROTECTORES.	37
2.6.7. ESTABILIDAD DEL PRODUCTO GALÉNICO.	38
2.6.7.1. INCOMPATIBILIDAD.	39
2.6.7.2. CAUSAS DE INESTABILIDAD DEL PRODUCTO.	39
2.6.7.3. DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DEL PREPARADO GALÉNICO.	39
2.6.7.4. DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE VIDA MÍNIMO DEL PREPARADO GALÉNICO TERMINADO.	40
3. <u>JUSTIFICACIÓN</u>	42
4. <u>OBJETIVOS</u>	44
4.1. OBJETIVOS GENERALES.	44
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	44
5. <u>HIPOTESIS</u>	45
5.1. VARIABLES.	45
5.1.1. VARIABLE INDEPENDIENTE.	45
5.1.2. VARIABLE DEPENDIENTE.	45
6. <u>DISEÑO DE INVESTIGACIÓN</u>	46
7. <u>DISEÑO METODOLÓGICO</u>	47
8. <u>MATERIAL</u>	50
8.1. MATERIAL FITOQUÍMICO.	50
8.2. MATERIAL GALÉNICO.	52
8.3. MATERIAL BIOLÓGICO.	53

9. METODOS	55
9.1. INVESTIGACIÓN FITOQUIMICA	55
9.1.1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS.....	55
9.1.1.1. RECOLECCIÓN DE LA PLANTA <i>Adesmia spinosissima</i> Meyen ex Vogel.....	55
9.1.1.2. RECOLECCIÓN DEL LIQUEN <i>Stereocaulon ramulosum</i> Rausch.....	55
9.1.2. EXTRACCIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS.....	55
9.1.2.1. MACERACIÓN DE LA PLANTA <i>Adesmia spinosissima</i> Meyen ex Vogel.....	55
9.1.2.2. MACERACIÓN DEL LIQUEN <i>Stereocaulon ramulosum</i> Rausch.....	55
9.1.3. PROCESO DE CONCENTRACIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS	55
9.1.3.1. PROCESO DE CONCENTRACIÓN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS DE <i>Adesmia spinosissima</i> Meyen ex Vogel.....	55
9.1.3.2. PROCESO DE CONCENTRACIÓN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS DE <i>Stereocaulon ramulosum</i> Rausch.....	56
9.1.4. SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS.....	56
9.1.4.1. SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS DE <i>Adesmia spinosissima</i> Meyen ex Vogel.....	56
9.1.4.2. SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS DE <i>Stereocaulon ramulosum</i> Rausch.....	59
9.1.5. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS.....	61
9.1.5.1. ENSAYO DE LA DECOLORACIÓN DEL RADICAL CATIONICO ABTS (<i>TEST QUIMICO</i>).....	61
9.2. INVESTIGACIÓN GALENICA	62
9.2.1. PREFORMULACIÓN DE LA BASE.....	62
9.2.2. FORMULACIÓN DE LA BASE.....	62
9.2.3. DETERMINACION DE LA ORIENTACIÓN DE LAS BASES.	63
9.2.4. DETERMINACIÓN DEL pH DE LAS BASES.....	63
9.2.5. DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LAS BASES.	63
9.2.5.1. VARIACIÓN DE TEMPERATURA.....	64
9.2.5.2. METODO DE CENTRIFUGACIÓN.....	6

9.2.6. INCORPORACION DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES EN LAS BASES ESTABLES.	64
9.2.7. DETERMINACIÓN DEL pH DE LOS PREPARADOS GALÉNICOS.	65
9.2.8. DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LOS PREPARADOS GALÉNICOS.	65
9.2.8.1. VARIACIÓN DE TEMPERATURA.	65
9.2.8.2. METODO DE CENTRIFUGACIÓN.	66
9.2.9. DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE VIDA MINIMO DE LOS PREPARADOS GALÉNICOS TERMINADOS.	66
9.3. INVESTIGACIÓN BIOLÓGICA.	67
9.3.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.	67
9.3.2. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD FOTOPROTECTORA DE LOS PREPARADOS GALÉNICOS.	67
9.3.2.1. MODELO EXPERIMENTAL DE PIEL DE CONEJOS (<i>IN VIVO</i>).	67
9.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	69
<u>10. RESULTADOS.</u>	70
10.1. INVESTIGACIÓN FITOQUÍMICA.	70
10.1.1. SEPARACIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS DE <i>Adesmia spinosissima</i> Meyen ex Vogel.	70
10.1.1.1. PLACAS CROMATOGRAFICAS DE LA SEPARACIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS DE <i>Adesmia spinosissima</i> Meyen ex Vogel.	73
10.1.2. SEPARACIÓN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS DE <i>Stereocaulon ramulosum</i> Rausch.	76
10.1.2.1. PLACAS CROMATOGRAFICAS DE LA SEPARACIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS DE <i>Stereocaulon ramulosum</i> Rausch.	77
10.1.3. ENSAYO DE LA DECOLORACIÓN DEL RADICAL CATIONICO ABTS ⁺ (<i>TEST QUÍMICO</i>).	78

10.1.3.1. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS AISLADOS DE <i>Adesmia spinosissima</i> Meyen ex Vogel.	78
10.1.3.2. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS AISLADOS DE <i>Stereocaulon ramulosum</i> Rausch	81
10.1.3.3. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS MUESTRAS DE <i>Adesmia spinosissima</i> Meyen ex Vogel Y <i>Stereocaulon ramulosum</i> Rausch, RESPECTO A LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL PATRON DE QUERCETINA.	82
10.2. INVESTIGACIÓN GALÉNICA.	83
10.2.1. PREFORMULACIÓN DE LA BASE.	83
10.2.2. DETERMINACIÓN DE LA ORIENTACIÓN DE LAS BASES. . .	84
10.2.3. DETERMINACIÓN DEL pH (5.50) DE LAS BASES.	85
10.2.4. DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LAS BASES. . .	85
10.2.5. INCORPORACIÓN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS EN LAS CONCENTRACIONES DE 2%, 5%, 10% A LAS BASES ESTABLES.	86
10.2.6. DETERMINACIÓN DEL pH (5.50) DE LOS PREPARADOS GALÉNICOS.	86
10.2.7. DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LOS PREPARADOS GALÉNICOS.	87
10.2.8. DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE VIDA MINIMO DEL PREPARADO GALÉNICO TERMINADO.	89
10.3. INVESTIGACIÓN BIOLÓGICA.	90
10.3.1. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD FOTOPROTECTORA DEL PREPARADO GALÉNICO DE <i>Adesmia spinosissima</i> Meyen ex Vogel	90
10.3.2. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD FOTOPROTECTORA DEL PREPARADO GALÉNICO DE <i>Stereocaulon ramulosum</i> Rausch.	91
11. <u>DISCUSIONES.</u>	92
12. <u>CONCLUSIONES.</u>	103

<u>13. PROYECCIONES</u>	105
<u>14. BIBLIOGRAFIA</u>	106
<u>ANEXOS</u>	114
Anexo 1: GENERACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXIGENO. .	115
Anexo 2: METABOLITOS TIPO FLAVONOIDES.	117
Anexo 3: METABOLITOS TIPO LIQUENICOS.	120
Anexo 4: METABOLITOS ACTIVOS DE LA PLANTA <i>Adesmia</i> <i>spinosissima</i> Meyen ex Vogel.	124
Anexo 5: METABOLITOS ACTIVOS DEL LIQUEN <i>Stereocaulon</i> <i>ramulosum</i> Rausch.	125
Anexo 6: MECANISMO DE DEFENSA DE UN COMPUESTO ANTIOXIDANTE.	126
Anexo 7: REGENERACIÓN DEL COMPUESTO ANTIOXIDANTE RADICALARIO.	127
Anexo 8: RUTAS DE PENETRACIÓN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS.	129
<u>APENDICE</u>	130
<u>Fotografías</u>	131
<u>Glosario</u>	137



1. INTRODUCCIÓN

Desde los años 70 se observó un incremento importante de casos de cáncer de piel. La Organización Mundial de la Salud (OMS), utiliza el término de "Epidemia" para calificar el significativo incremento en número de nuevos casos de cáncer cutáneo. En los últimos diez años el cáncer de piel creció 8,3%, principalmente por la sobre exposición al Sol.⁽⁹¹⁾

Esta situación se debe en gran parte, a un cambio en los hábitos relacionados con la exposición al sol, y en concreto a la radiación ultravioleta. Por otro lado, el lento pero continuo deterioro de la capa de ozono registrado en latitudes medias y altas viene a agravar la situación, dado que es ampliamente conocido, que el ozono estratosférico es un filtro natural de la radiación U. V.

Este problema aflige a nuestra sociedad, por la incidencia cada vez mayor de alteraciones de la piel, que se relaciona estrechamente con la exposición a estas radiaciones solares, en el sentido sobre los efectos adversos que provoca la radiación ultravioleta, contenida en ellas. Entre los principales efectos inducidos por la radiación ultravioleta, se destaca el incremento en la formación de especies reactivas del oxígeno y una disminución de la capacidad antioxidante de la piel, que conduce al aumento en la incidencia de cáncer de piel.⁽²¹⁾

Las plantas han sido utilizadas como fuente primaria de medicina desde hace milenios, los antecedentes más antiguos de plantas con usos terapéuticos se remontan a Babilonia en el año de 1.770 a. c., en el código de Hammurabi. En numerosas ocasiones, la medicina tradicional de diferentes culturas ha proporcionado plantas líderes por sus propiedades medicinales.⁽¹⁹⁾

Como consecuencia del resurgimiento del interés por todo lo natural, hoy gozan de creciente popularidad muchas plantas que han sido estudiadas durante los últimos 40 años. En el transcurso de estos estudios se han alcanzado avances significativos con respecto de la elucidación estructural, configuracional y síntesis de metabolitos secundarios aislados, muchos de los cuales han sido sometidos a estudios biológicos.⁽²⁾

Se estima que existen entre 500.000 y 700.000 especies vegetales en el mundo y en la actualidad se conocen alrededor de 350.000. Aproximadamente 250.000 de las especies conocidas, poseen propiedades medicinales, como ser scavengers de radicales libres. Pero menos del 15% han sido sometidos a estudios fitoquímicos y farmacológicos.

Los estudios dirigidos sobre las especies vegetales, hoy en día se encuentran en boga, de todo el mundo. Aproximadamente se desarrollan estudios de un 4% en Australia, un 12% en Europa, el 20% en África y el 23% en Asia, mientras que en América se desarrolla el 42%, lo cual no es sorprendente dada



la diversidad biológica, cultural y étnica de cada región. Se estima que solo entre 5% – 19% de cada 250. 000 especies vegetales se han estudiado por su contenido en productos bioactivos, dada la alarmante velocidad con la que muchas especies están desapareciendo, es muy importante apoyar e incentivar el estudio de las plantas medicinales.⁽⁷⁰⁾

Bolivia se encuentra ubicado en el centro de Sur América, y presenta una topografía variable, debido a que se sitúa en una región de transición climática originando zonas diferentes que contribuyen a que posea una gran variedad de especies vegetales.

En todas y cada una de las regiones, se cuenta con un vasto conocimiento de medicina natural, tomando como fuente la flora propia, siendo la zona Altiplanica ubicada en la región Andina, nuestro punto de partida porque presenta características particulares como una elevada radiación U. V, sin embargo la biodiversidad vegetal que se encuentra en esta zona nos demuestra que especies vegetales han logrado adaptarse a estas condiciones a través de mecanismos de autodefensa utilizando medios físicos y químicos como la producción de principios activos con actividad antioxidante / fotoprotectora, relacionados a la morfología misma de estas especies vegetales de acuerdo a sus requerimientos y mecanismos de autodefensa.⁽²⁹⁾

La búsqueda de especies vegetales con propiedades antioxidantes / fotoprotectoras y su papel para prevenir algunos tipos de cáncer de piel, producidos probablemente por la radiación ultravioleta, son la base para la búsqueda de productos naturales como agentes preventivos de los procesos oxidativos provocados por el exceso de radiación U. V.

No cabe duda que existe un renovado interés en el mundo de la industria farmacéutica y la medicina por este tipo de especies vegetales con actividad fotoprotectora. La razón fundamental es que existe la conciencia que aproximadamente el 80% de los 5200 millones de habitantes del mundo viven en países poco desarrollados.⁽²⁷⁾

Por lo tanto el presente trabajo de tesis, tiene como objetivo principal, elaborar un producto natural boliviano, que pueda ser accesible a la población que no puede costearse los medicamentos existentes en el mercado. Constituyendo un impacto de carácter social acorde con la formación del químico farmacéutico, promoviendo así nuestros recursos naturales.



2. MARCO TEORICO

2. 1. ANTECEDENTES

El progresivo deterioro de la capa de ozono en las tres últimas décadas ha originado cambios sobre muchos organismos debido al incremento de la radiación ultravioleta B (En el rango de 280 – 320 nm, denominada UV – B.) que era atenuada por la capa de ozono. La radiación UV – B, tiene una energía suficiente para producir una serie de daños en los sistemas biológicos existentes. ⁽²²⁾

La elevada radiación UV – B, conduce a la sobre producción de especies reactivas del oxígeno que actúan sobre la piel, de diversas formas: alterando la bicapa fosfolipídica (especialmente vulnerable a la oxidación) que constituye las membranas celulares; interfiriendo el funcionamiento de las enzimas y sobre el ADN de los fibroblastos (células) del tejido conjuntivo. ⁽¹⁰⁾

Las especies reactivas del oxígeno, no son moléculas extrañas para la piel, ya que son producidas habitualmente en los procesos de respiración celular. Existen diversos neutralizadores endógenos de radicales libres (enzimas y antioxidantes) que permiten reducir su concentración a niveles no perjudiciales para la piel, pero muchas veces estos mecanismos no son suficientes, ya que su producción excede al proceso de neutralización. ⁽¹⁵⁾

El tema de la biodiversidad vegetal ha cobrado vital importancia como fuente de recursos medicinales, teniendo en cuenta que 3/4 partes de la población mundial no tiene acceso a una atención primaria de salud. Paradójicamente los países que no cuentan con ese acceso, son los más ricos en biodiversidad vegetal.

Dentro de las 250.000 plantas existentes en el planeta, casi 3/4 partes crecen en zonas correspondientes a las selvas y bosques tropicales. Por ejemplo, en el área amazónica crece una de cada 4 plantas existentes en el mundo. Se ha calculado que 90.000 especies vegetales se ubican en la región neotropical que va desde México hasta el norte de Argentina. Con menor cantidad de ejemplares las zonas tropicales de África y Asia que concentran entre 30.000 y 45.000 especies vegetales. ⁽²⁾

El país que mayor biodiversidad tiene en el mundo es Brasil (55.000 especies), sin embargo sólo un 5% de su flora ha sido investigada desde el punto de vista medicinal. Los países de Colombia con 45.000 especies y Bolivia con 30.000 especies continúan en la lista de países con mayor biodiversidad vegetal. Esto muestra la importancia que reviste la actual franja Ecuatorial donde asienta el 90% de la investigación mundial actual. ⁽³⁰⁾



Cada uno de estos países presenta una cultura diferente respecto a su propia medicina tradicional que pervive, sobre todo cuando las condiciones sociales son de exclusión y supervivencia, como en Bolivia.⁽⁹⁾

Hoy en día científicos realizan a través de técnicas de screening, entre 50 y 100 ensayos biológicos sobre todo tipo de plantas que presenten alguna actividad farmacológica, estos estudios están basados en diferentes propósitos como:

- ♣ Fijar una mayor atención en el cultivo de especies autóctonas con aplicación medicinal, que podrían ser utilizados como posibles recursos sostenibles.
- ♣ Muchas de las actividades farmacológicas están vinculadas al control de la producción excesiva de EROs. Tales como procesos de inflamación, cancerígenos y otros anteriormente mencionados. Los compuestos fenólicos han demostrado particularmente ser muy efectivos en el control sobre la producción de agentes oxidantes (EROs).
- ♣ Son recursos constitutivos del patrimonio cultural y económico de cada país, existiendo importantes investigaciones en Universidades y Facultades con productos herbarios y por la falta de posibilidades de obtener una patente, los laboratorios no apoyan los estudios clínicos con pacientes que deberían seguir a continuación.

Por esta razón muchos estudios se enfocan al estudio de plantas que presentan en su composición compuestos fenólicos con acción antioxidante denominados scavengers, que se basan en la neutralización de partículas conocidas como especies reactivas de oxígeno.

Estas moléculas con capacidad de controlar el exceso de EROs, pueden actuar a través de diferentes mecanismos, pero siempre con el mismo fin, el de reaccionar fácilmente para poder prevenir o retardar el daño oxidativo a las macromoléculas biológicas.⁽⁴²⁾

La elaboración de protectores solares en base a moléculas con actividad antioxidante y que además tengan la capacidad de absorber la luz en el rango del UV – B, podrían ayudar a proteger el cuerpo humano, contra la radiación UV – B, y ayudar a reducir el riesgo de daños a la piel.



2. 2. RADIACIÓN ULTRAVIOLETA

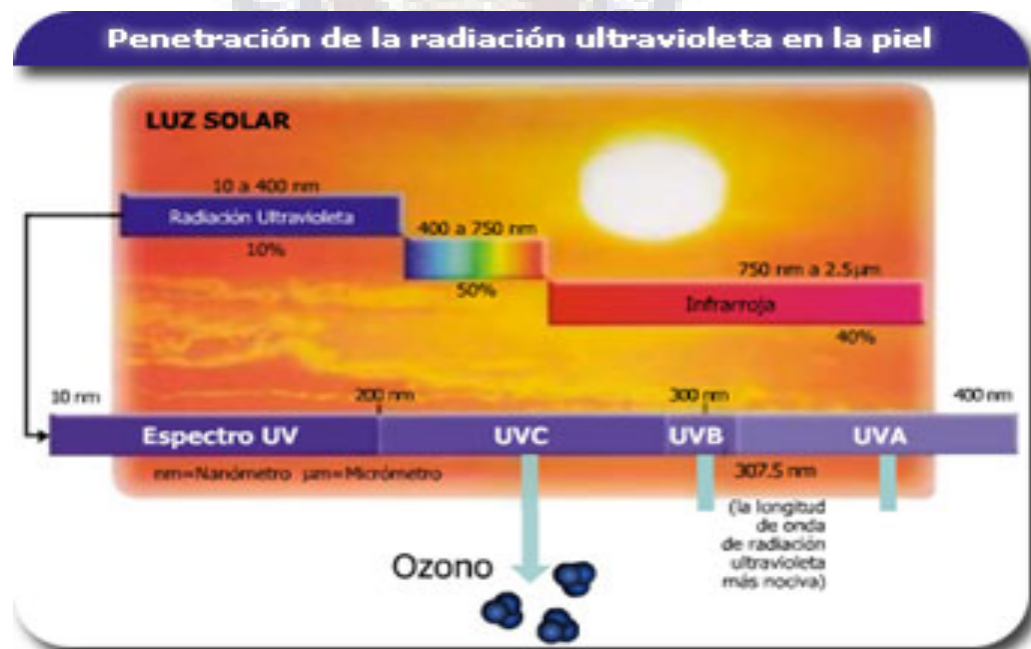
En la actualidad existe un cúmulo de evidencias y resultados, que vinculan la excesiva producción de especies reactivas del oxígeno, por la exposición a la radiación UV, como agente causal principal en la creciente incidencia (aproximadamente 6 % anual) de afecciones malignas de la piel.

Estos antecedentes constituyen una base que justifica el desarrollo de investigaciones, en relación a las alteraciones que provoca la exposición prolongada de los seres vivos a la radiación UV, en la búsqueda de vías para prevenir, atenuar o eliminar las afecciones, que se puedan producir por esa causa.⁽⁵⁸⁾

La exposición de células a la radiación UV induce la expresión de numerosos genes, razón por la cual se consideran como el principal iniciador y promotor de procesos malignos en la piel.

Del espectro de la radiación UV, emitidas por el sol, que alcanzan la superficie terrestre, la radiación UV – B (comprendida entre los 280 a 320 nm.) es considerada como la más dañina, Ya que la radiación UV – A (de 315 a 400 nm.) es de menor energía aunque dañina en sobre exposición y la radiación UV – C (200 – 290 nm) es de mucha mayor energía, que es controlada por la capa de ozono estratosférico.⁽⁶⁵⁾

2. 2. 1. TIPOS DE RADIACIÓN SOLAR



- ♣ **RAYOS UV – C:** (200 – 290 nm). También conocidos como rayos germicidas, responsables de la eliminación de los microorganismos patógenos, bacterias, virus de aguas y virus de suelos, etc.).



- ♣ **RAYOS UV – B:** (290 – 320 nm). 0,1% del total de energía electromagnética que alcanza la tierra. Producen intenso foto deterioro fisiopatológico, no penetran profundamente las capas de la piel, son mayormente absorbidos justo encima de la dermis, siendo los causantes de la pigmentación dilatada de la piel (20 – 35 mL / cm).
- ♣ **RAYOS UV – A:** (320 – 400 nm). 4,9% del total de energía electromagnética que alcanza la tierra. Presentan efectos foto biológicos acumulativos (efecto largo – proceso). Penetran profundamente dentro de la dermis y mas allá (50 – 60 mL / cm).
- ♣ **LUZ VISIBLE:** (400 – 700 nm). 40% del total de energía electromagnética que alcanza la tierra. Se ha demostrado que presentan efectos de fotoenvejecimiento de poca importancia.
- ♣ **INFRARROJO:** (700 – 3000 nm). El calor prolongado por estos rayos, ocasiona efectos adversos serios para la piel humana.

2. 2. 2. EFECTO DE LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA – B EN LOS SERES HUMANOS

Una exposición prolongada a la luz solar, representa el principal factor ambiental dañino para la piel del hombre. Entre las alteraciones que induce la exposición a la radiación UV – B se puede mencionar la dermatoheliosis, causada por la generación de EROs (Especies Reactivas del Oxígeno), que pueden ocasionar daños sobre el DNA y las membranas celulares, provocando carcinogénesis y cambios asociados al fotoenvejecimiento.⁽²¹⁾

Fuertes evidencias epidemiológicas relacionan la exposición a la radiación UV – B solar con la aparición de melanomas cutáneos, existiendo una estrecha correlación entre determinados fenotipos y la aparición de melanomas por exposición a esta radiación UV – B solar.

Las exposiciones intermitentes y continuadas, y sobre todo, las exposiciones en períodos tempranos de la vida (particularmente en la infancia), se relacionan con mayor riesgo en la aparición de melanomas.⁽²²⁾

2. 2. 3. TIPOS DE PIEL SEGÚN SU REACCIÓN FRENTE A LA EXPOSICIÓN A LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA – B, SOLAR

El color de la piel es un factor importante, ya que determina la facilidad con la que esta se irrita ante el sol. Mientras que una piel clara requiere desde 15 a 30 minutos de exposición al sol del mediodía del verano, las personas que tienen una piel moderadamente pigmentada requieren de 1 a 2 horas de exposición.



Otros factores que influyen en la exposición de la radiación UV – B solar, de la piel humana son: color de cabello, pecas y el color de ojos. En la siguiente tabla se presentan los 6 grupos de piel determinados por sus reacciones ante la luz solar y sus componentes, dando el nivel de protección que se requiere.⁽⁸⁰⁾

Fototipo I	Piel de individuos que presenta intensas irritaciones solares, prácticamente no se pigmenta nunca y se descama de forma ostensible.	Individuos de piel muy clara, ojos azules, con pecas en la piel. Su piel, habitualmente no expuesta al Sol, es blanco – lechosa.	Ultra protección
Fototipo II	Piel de individuos que se irrita fácil e intensamente, se pigmenta ligeramente y se descama de forma notoria.	Individuos de piel clara, pelo rubio o pelirrojo, ojos azules y pecas, cuya piel no expuesta habitualmente al Sol, es blanca.	Ultra Máxima
Fototipo III	Piel de individuos que se irrita moderadamente y se pigmenta.	Razas caucásicas (euro), piel blanca no expuesta habitualmente al Sol.	Máxima Extra
Fototipo IV	Piel de individuos que se irrita moderada o mínimamente, se pigmenta con bastante facilidad y de forma inmediata al ponerse al Sol.	Individuos de piel blanca o ligeramente amarronada, pelo y ojos oscuros (razas mediterráneas, mongólicas, orientales). Piel algo amarronada o habitualmente morena.	Extra Moderada
Fototipo V	Piel de individuos que se irrita raras veces y se pigmenta con facilidad e intensidad; siempre presentan reacción de pigmentación inmediata.	Individuos de piel amarronada (amerindios, indostánicos, hispanos).	Moderada Mínima
Fototipo VI	No se irrita nunca y se pigmenta intensamente. Siempre presentan reacción de pigmentación inmediata.	Razas negras.	Mínima No

También existen diferencias anatómicas en cuanto a la exposición, ya que la cara, tronco y cuello reciben aproximadamente el 75% de la radiación UV – B, más que las piernas o los brazos. La sensibilidad a la radiación UV – B, no parece estar influida por el sexo, pero si por la edad, siendo los ancianos y los niños los más susceptibles.⁽⁸⁰⁾



2. 2. 4. FACTORES QUE RIGEN LA INTENSIDAD DE RADIACIÓN ULTRAVIOLETA – B

Los principales factores influyen en la intensidad y composición de la radiación UV – B, son:

2. 2. 4. 1. ELEVACIÓN SOLAR

Para elevaciones solares altas la radiación UV – B, es mas intensa debido a que los rayos solares atraviesan un camino menor a través de la atmósfera, pasando por lo tanto por una menor cantidad de absorbentes. ⁽⁹³⁾

2. 2. 4. 2. LATITUD

La latitud tiene una influencia directa en la intensidad y composición de la radiación UV – B. Por ejemplo, un incremento de altitud de 1.000 m, causa un aumento de 15% de UV – B, y el resto de UV – A, es constante. Mientras que a nivel del mar Muerto (400 m. b. n. m.), el UV – B, esta ausente. ⁽⁹³⁾

2. 2. 4. 3. ESTACIÓN

A latitudes de 50° para arriba, poca o ninguna radiación UV – B, es detectable durante los meses de invierno. La radiación UV – A, por otro lado menos afectada por el ángulo del sol, esta presente alrededor de todo el año y puede producir eritemas en gente de piel con tez blanca. Por ejemplo en Copenhagüe (55° latitud norte), en invierno, las intensidades de UV – A directa y UV – B son 10% y 1% respectivamente de los valores de verano. ⁽⁷⁹⁾

2. 2. 4. 4. HORA DEL DIA

La irradiación espectral solar para longitudes de onda por debajo de 330 nm., decrece más rápidamente que lo que el ángulo de apogeo solar se incrementa por longitudes de onda por encima de 330 nm. Entonces, las longitudes de onda UV – B, solares que alcanzan la tierra son mas fuertes dependiendo del ángulo de apogeo solar que los UV – A, o longitudes de onda en visibles.

Por lo tanto se interpreta que a medida que el sol llega al zenith (mediodía), los rayos UV – A, decrecen entre las 11:00 a. m. y 14:00 p. m., y los rayos UV – B, se encuentran en su valor mas alto. ⁽⁷⁹⁾

2. 2. 4. 5. NUBES

La radiación UV – B es mayor, generalmente para cielos totalmente despejados. Las nubes normalmente reducen la cantidad de radiación UV – B, pero la atenuación depende del espesor y tipo de estas. En ciertas condiciones, y por periodos cortos de tiempo, una pequeña cantidad de nubes finas o dispersas pueden hacer aumentar la cantidad de radiación UV – B, esto sucede normalmente en condiciones de cielos parcialmente cubiertos y con el sol visible. ⁽⁹³⁾



2. 3. ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO (EROs)

Los radicales libres son especies químicas con existencia propia que contienen electrones desapareados en los orbitales que participan de las uniones químicas. Las EROs son especies reactivas derivadas del oxígeno que incluyen moléculas químicas radicalarias y no radicalarias, siendo estas últimas, agentes oxidantes.⁽⁸¹⁾

Una de las principales fuentes de origen de las EROs es el proceso de respiración, ya que entre un 1 y un 5% del oxígeno restante, del 100% de la vida habitual del organismo consumido, se reduce a agua por la llamada vía univalente en el cual se generan diversos compuestos intermedios.⁽¹⁵⁾

Las especies radicalarias, son moléculas intermediarias con una vida muy corta (milésimas de segundos) que cumplen dos características:

- ♠ **GRAN INESTABILIDAD**, su estructura atómica presenta un electrón desapareado en su orbital externo, dando una configuración espacial altamente inestable.
- ♠ **ALTA REACTIVIDAD**, por su o sus electrones desapareados.

Ambas características vienen determinadas por la presencia de electrones desapareados en sus átomos y explican la agresividad con que actúan, ya que para lograr su "equilibrio" tienden a unirse con átomos vecinos, dando lugar a reacciones en cadena.⁽³⁴⁾

Sin embargo, las EROs se pueden generar tanto a partir de fuentes exógenas como endógenas. En el primer grupo en las fuentes exógenas, se encuentra la radiación ultravioleta que incrementa la concentración de las EROs, sometiendo al organismo a condiciones de estrés oxidativo.

Dentro de las fuentes endógenas, están la NADPH oxidasa, tanto la fagocítica como la no fagocítica, algunos organelos subcelulares como la mitocondria, retículo endoplásmico, peroxisomas, así como los metabolitos del ácido araquidónico y la xantina oxidasa.⁽²⁸⁾

Las EROs pueden ser formados tanto por la pérdida como por la ganancia de un electrón. En el primer caso se trata de una oxidación y en el segundo de una reducción. Los radicales libres también se forman a partir de la ruptura homolítica entre átomos en una molécula.⁽³⁰⁾

2. 3. 1. ESTRÉS OXIDATIVO

Cuando el equilibrio entre radicales libres y antioxidantes se pierde a favor de los primeros, se desencadenan procesos dañinos que se asocian al desarrollo de numerosas enfermedades, lo que se denomina *estrés oxidativo*. Esto puede deberse a una disminución de los sistemas antioxidantes, y un aumento de las especies prooxidantes o ambas.



En las plantas, el exceso de radiación UV – B, desencadena un estrés oxidativo por la inhibición de enzimas como ser: SOD (Súperoxido Dismutasa), MDAR (monodehidroascorbato reductasa), DHAR (dehidroascorbato reductasa), GR (glutación reductasa), Asc (ascorbato), MDAsc (monodehidroascorbato), GSSG (glutación oxidado), GSH (glutación reducido) en el ciclo de Calvin.⁽⁵⁰⁾

2. 3. 2. PRODUCCIÓN DE EROs

Las EROs pueden provenir de distintas fuentes. Durante el metabolismo aeróbico las células generan energía reduciendo al oxígeno molecular hasta la formación de agua.

Esta reacción ocurre en la mitocondria, catalizada por la citocromo C oxidasa, que involucra la transferencia de cuatro electrones al oxígeno sin formación de intermediarios. Una pequeña proporción del oxígeno, de 2 a 5%, puede aceptar un menor número de electrones, donde en vez de producirse agua se forman radicales como el $\cdot\text{OH}$ y el $\text{O}_2\cdot$.

En el plasma sanguíneo se genera H_2O_2 continuamente a partir de la oxidación del GSH y del ascorbato.

Los macrófagos y neutrófilos activados liberan EROs para destruir organismos patógenos dentro del proceso de fagocitosis.⁽²⁵⁾

Los lugares de máxima producción de sustancias oxidantes, son donde el oxígeno tenga una mayor actividad:

- ♣ Membrana Plasmática, Por acción de la lipooxigenasa y la prostaglandina sintetasa dentro de las reacciones inflamatorias mediadas por el ácido araquidónico.
- ♣ Mitocondrias, La ubiquinona y la NADH – deshidrogenasa pueden autooxidarse dando aumento de radicales libres $\text{O}_2\cdot$, H_2O_2 y $\text{OH}\cdot$.
- ♣ Peroxisomas Citoplásmicos.
- ♣ Retículo Endoplasmático, Los citocromos sufren reacciones de autooxidación con formación de radicales libres $\text{O}_2\cdot$ y H_2O_2 .

El oxígeno posee una alta biodisponibilidad para participar en reacciones que supongan sucesivos circuitos de reducción y dismutación, generando un variado repertorio de especies activas.

Es importante tener en cuenta que la producción de EROs es una consecuencia inevitable de la vida aeróbica y un aspecto negativo de las enormes ventajas energéticas que ofrece la utilización de O_2 respecto a los metabolismos fermentativos de los organismos anaeróbicos.



Aún bajo condiciones óptimas de funcionamiento, no menos de un 5 % de los electrones transferidos durante la fotosíntesis y la respiración van a parar al O_2 y producen EROs. Normalmente, los mecanismos protectores de las células pueden eliminar estos compuestos sin mayores dificultades.⁽¹²⁾

2. 3. 3. REACCIONES EN CADENA DE LAS EROs

Las reacciones en cadena producidas por las EROs, dependen de los siguientes factores:

- ♣ Actividad intrínseca de las EROs.
- ♣ Concentración de las EROs.
- ♣ Concentración de los substratos susceptibles de ser atacados.
- ♣ Temperatura (a menor temperatura, menor actividad).

2. 3. 4. SISTEMAS ANTIOXIDANTES

El organismo atenúa los efectos deletéreos de la producción de EROs por medio de la acción de sistemas antioxidantes.⁽²⁸⁾

Existen diferentes sistemas de defensa antioxidante en el organismo. Uno de ellos está conformado por sistemas enzimáticos como la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa, siendo éstas la primera defensa contra los radicales libres que actúan neutralizando a estas especies altamente reactivas en moléculas menos dañinas para la célula.⁽¹⁾

Otros sistemas, no enzimáticos, están conformado por compuestos como carotenoides, proantocianinas, polifenoles, y las vitaminas C y E, que estabilizan las EROs o también que provocan la quelación de iones metálicos de elementos de transición como hierro y cobre, que al estar en estado reducido potencian su autooxidación y generación de anión superóxido.⁽⁶⁾

Estos antioxidantes pueden ser hidrosolubles o liposolubles, operando en consecuencia a diferentes niveles. Entre los primeros se destacan el ascorbato y el glutatión, que reaccionan directamente con O_2^- y OH^- generados *in situ*.

Los antioxidantes liposolubles más abundantes son los carotenos, xantófilas y tocoferoles, que son capaces de eliminar H_2O_2 , O_2^- , 1O_2 y OH^- , e inhiben la peroxidación de lípidos, interrumpiendo la propagación de ciclos oxidativos entre radicales orgánicos.⁽¹³⁾

Cuando la intensidad del estrés es tal que la acumulación de EROs no puede ser contenida por la acción de los componentes de las dos primeras barreras, el resultado neto es un estrés oxidativo, provocando daño en los organismos.



2. 4. COMPUESTOS FENOLICOS

Son compuestos orgánicos que estructuralmente presentan un grupo -OH unido a un anillo aromático, que se conocen como compuestos fenólicos.

Son relativamente polares y tienden a ser solubles en agua, siendo detectados por el intenso color verde, púrpura, azul o negro que producen cuando se agrega una solución acuosa o alcohólica al 1% de cloruro férrico.⁽⁵⁴⁾

Según su naturaleza aromática, estos compuestos fenólicos, muestran una intensa absorción en la región del UV del espectro, siendo este un método espectral especialmente importante para su identificación y análisis cuantitativo.

Los compuestos de esta familia presentan variados efectos beneficiosos para la salud: prevención contra cáncer, propiedades antiinflamatorias, antialérgicas, antitumorales, antimicrobianas, vasorelajantes y antioxidantes.⁽⁴⁷⁾

Entre sus acciones antioxidantes encontramos la inhibición de la formación de EROs por medio de la inhibición de enzimas productoras de EROs como la xantin oxidasa, o la quelación de los elementos traza involucrados en la producción de EROs; el scavengers directo de EROs y el *up – regulation* de los sistemas antioxidantes endógenos.

Los compuestos fenólicos estabilizan las EROs al capturarlas formando el radical *aroxilo*, para luego reaccionar con un segundo radical, con lo cual adquieren una estructura quinona estable.⁽⁴⁾

Los compuestos fenólicos más estudiados son flavonas, antocianinas, proantocianidinas, dépsidos entre otros, los cuales son sustancias bioactivas. Estos actúan atrapando los radicales libres para luego transformarlos en especies no radicalarias, por inhibición de la acción enzimática de elastasa e hialuronidasa.

Las estructuras polifenolicas pueden proceder de las rutas:

- ♣ Ácido Skiquimico; fenoles simples, α – Pironas, γ – Pironas, Lignoides.
- ♣ Malonil – CoA; Quinonas, Dépsidos, Otros policétidos aromáticos.
- ♣ Combinación de Ácido Skiquimico y Malonil – CoA; Flavonoides, Isoflavonoides, Xantonas.⁽⁵¹⁾



2. 4. 1. CLASIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

2. 4. 1. 1. COMPUESTOS FENÓLICOS SIMPLES

- ♠ C₆: derivados de fenoles simples
- ♠ C₆C₁: derivados del ácido benzoico
- ♠ C₆C₂: derivados de la acetofenona
- ♠ C₆C₃: derivados del ácido cinámico

2. 4. 1. 2. FLAVONOIDES

- ♠ chalconas y auronas
- ♠ flavonas y flavonoles
- ♠ flavanonas y flavonoles
- ♠ flavonoles
- ♠ antocianinas

2. 4. 1. 3. ISOFLAVONOIDES

- ♠ isoflavonas
- ♠ isoflavanonas
- ♠ isoflavanos e isoflavenos
- ♠ rotenoides

2. 4. 1. 4. QUINONAS

- ♠ benzoquinona
- ♠ naftoquinona
- ♠ antraquinona
- ♠ bis – antraquinona

2. 4. 1. 5. α- PIRONAS

- ♠ cumarinas
- ♠ isocumarinas
- ♠ aflatoxinas

2. 4. 1. 6. γ- PIRONAS

- ♠ cromanos y cromonas
- ♠ cannabinoides

2. 4. 1. 7. XANTONAS

2. 4. 1. 8. LIGNOIDES

2. 4. 1. 9. DEPSIDOS

2. 4. 1. 10. OTROS POLICÉTIDOS AROMÁTICOS



2. 4. 2. FLAVONOIDES

Estos compuestos fueron descubiertos por el Szent – György, quien en 1.930 aisló de la cáscara del limón la citrina, que regula la permeabilidad de los capilares.

Identificados hasta ahora más de 5.000 flavonoides se denominaron en un principio vitamina P (permeabilidad) y también vitamina C₂ (propiedades similares a la vitamina C). Sin embargo, el hecho de que los flavonoides fueran vitaminas no pudo ser confirmado, y ambas denominaciones se abandonaron alrededor de 1.950.⁽¹¹⁾

Las estructuras de los principales grupos flavonoides (flavonol, flavanol, flavona, flavanona, dihidroflavanol, y antocianidina), se diferencian por:

- ♣ Grado de aromaticidad.
- ♣ Extensión.
- ♣ Número de hidroxilos sustituidos.
- ♣ Ordenamiento.
- ♣ Tipo de glicosilación de estos grupos. El sitio de glicosilación preferida es en la posición 3 y la glucosa constituye el residuo más usual. Existiendo otros residuos como ser; galactosa, xilosa, etc.

Las propiedades biológicas, farmacológicas y médicas de los flavonoides han sido extensamente revisadas. El amplio rango de efectos atribuidos a los flavonoides constituye una expresión de su grupo químico funcional, y expone sus propiedades en traducción de señales celulares, sistemas inmunomoduladores, anticarcinogénicas, mutagénicas, procesos inflamatorios, y su actividad antioxidante / prooxidante.⁽⁴⁾

Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, confiriéndoles una gran capacidad antioxidante.

Sus propiedades scavenger se dirigen fundamentalmente hacia los radicales hidroxilo y superóxido, especies altamente reactivas implicadas en el inicio de la cadena de peroxidación lipídica, describiéndose su capacidad de modificar la síntesis de eicosanoides (con respuestas anti – prostanoide y anti – inflamatoria), de prevenir la agregación plaquetaria (efectos antitrombóticos) y de proteger a las lipoproteínas de baja densidad de la oxidación (prevención de la placa de ateroma).⁽¹²⁾

Los flavonoides presentan otras propiedades que incluyen la estimulación de las comunicaciones a través de las uniones en hendidura, el impacto sobre la regulación del crecimiento celular y la inducción de enzimas de destoxicación tales como las monooxigenasas dependientes de citocromo P – 450, entre otras.⁽⁷²⁾



2. 4. 2. 1. DISTRIBUCIÓN

Los flavonoides están distribuidos en todas las plantas superiores, sobre todo en partes aéreas; hojas, flores y frutos. Una excepción son los tubérculos de la cebolla, que contienen quercitina 4' – D – glucósidos. Las principales familias que contienen flavonoides son; Compuestas, Poligonáceas, Rutáceas y Umbelíferas.⁽¹⁾

2. 4. 2. 2. FUNCIÓN DE LOS FLAVONOIDES EN LAS PLANTAS

Los flavonoides actúan como antioxidantes por mecanismos diferentes como: inhibidores enzimáticos, quelación de metales, scavenger, y actuarían como pantalla contra la radiación UV – B.

Se comprobó que los flavonoides acumulados en las vacuolas de las células epidérmicas absorben un 90% de la radiación UV – B administrada, protegiendo la maquinaria fotosintética como el proceso de floración y de crecimiento.⁽²⁴⁾

Ecológicamente estos pigmentos son responsables de la coloración de las flores, y serían una “guía del néctar” visible para muchos insectos polinizadores favoreciendo la reproducción vegetal.⁽⁵⁷⁾

2. 4. 2. 3. CATABOLISMO

Los flavonoides están en rápido intercambio en las plantas, las variaciones en su concentración o cambio del tipo de compuesto se dan con la edad del tejido, estadio del ciclo vital o época del año.

El primer paso en el catabolismo de los flavonoides es la eliminación de los azúcares glicosídicos, habiéndose aislado las enzimas que efectúan este trabajo a partir de muchas plantas. Estudios efectuados con suspensiones celulares demostraron que el anillo A es degradado completamente a CO₂, mientras que el anillo B es convertido en derivados del ácido benzoico.⁽³³⁾

2. 4. 2. 4. METABOLISMO LOS FLAVONOIDES EN EL ORGANISMO HUMANO

La transformación de los flavonoides tiene lugar en dos localizaciones:

- ♣ **Hígado**, Por medio de reacciones de biotransformación de fase I en las que se introducen o exponen grupos polares.⁽⁷²⁾
- ♣ **Colon**, Mediante reacciones de biotransformación de fase II, donde los microorganismos degradan los flavonoides no absorbidos. La conjugación con el ácido glucurónico, sulfatos, o glicina, parecen tener lugar tanto para los flavonoides como para sus metabolitos procedentes del colon. Los conjugados, solubles en agua, pueden excretarse por la orina.⁽⁷²⁾



2. 4. 2. 5. PROPIEDAD ANTIOXIDANTE

La capacidad de los compuestos fenólicos de origen natural para actuar como antioxidantes en los sistemas biológicos fue ya reconocida en los años treinta; sin embargo, el mecanismo antioxidante fue ignorado en gran medida hasta hace poco tiempo.

El creciente interés en los flavonoides se debe a la apreciación de su amplia actividad farmacológica.

Pueden unirse a los polímeros biológicos, tales como enzimas, transportadores de hormonas, y DNA, quelar iones metálicos transitorios, tales como Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , catalizar el transporte de electrones, y depurar radicales libres.⁽⁵⁾

Se pueden determinar tres tipos de mecanismos de defensas antioxidantes:

- ♣ La transferencia de electrones que determina que el antioxidante se transforme en una molécula radical activa.
- ♣ La transferencia de electrones que determina la formación de una molécula radical antioxidante inactiva o estable.
- ♣ Pequeñas moléculas que actúan como enzimas antioxidantes.

El concepto básico de la actividad antioxidante, comprende una transición redox mediante la cual la molécula antioxidante dona un electrón (o átomo de hidrógeno, equivalente a la donación de un electrón y un H^+ al radical libre).⁽⁶⁾

Durante el transcurso de esta transferencia de electrones, el carácter radical (inestabilidad), es transferido al antioxidante, formándose un antioxidante radical – derivado.

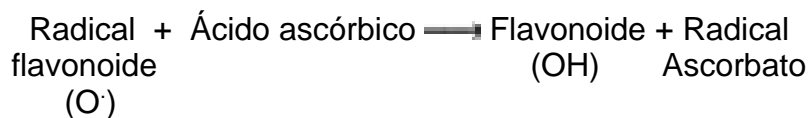


Todo flavonoide para ser antioxidante debe reunir dos requisitos básicos:

- ♣ Aun a bajas concentraciones debe proteger los compuestos contra la oxidación o el daño por radicales libres.
- ♣ El radical flavonoide aroxil, radical así formado debe ser lo suficientemente estable para que la función antioxidante sea efectiva. La falta de estabilidad que pueda tener el radical aroxilo está en base al efecto prooxidante de algunos flavonoides.



El radical aroxilo puede ser recuperado por otros antioxidantes, como el ascorbato.



Los criterios químicos para establecer la capacidad antioxidante de los flavonoides, son:

- ♣ Doble ligadura, en conjunción con la función 4 – oxo del anillo C.
- ♣ Grupos 3 – y 5 – OH con función 4 – oxo en los anillos A y C necesarios para ejercer el máximo potencial antioxidante.
- ♣ Presencia de estructura O – dihidroxi en el anillo B; que confiere una mayor estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización de los electrones.

Los resultados reportados a cerca de la quercetina como antioxidante, nos permiten usar esta molécula como patrón para investigaciones de futuros compuestos fenólicos vegetales.⁽²⁴⁾

Su capacidad antioxidante medida a través del parámetro TEAC y comparando su actividad con Trolox (Ácido (+/-) – 6 – hidroxil – 2, 5, 7,8 – tetrametil – cromano – 2 – carboxílico, 97%), una molécula de vitamina E modificada para ser hidrosoluble, es de 4,7 mM.

La función antioxidante de la quercetina muestra efectos sinérgicos con la vitamina C. El ácido ascórbico reduce la oxidación de la quercetina, de manera tal que combinado con ella permite al flavonoide mantener sus funciones antioxidantes durante más tiempo.

Por otra parte, la quercetina protege a la vitamina E, de la oxidación, presentando efectos sinergizantes.⁽⁸⁸⁾

Las propiedades antioxidantes de los flavonoides dependen en parte de su combinación con el hierro o el cobre, que aceleran o catalizan las reacciones químicas (Fenton), generadoras de radicales libres.

Por lo tanto al combinarse con el cobre o el hierro, los flavonoides los sustraen de las reacciones formadoras de radicales libres.⁽²⁵⁾





Los flavonoides han mostrado su eficiencia para eliminar los procesos de peroxidación lipídica del ácido linoleico, LDL, fosfolípidos de las membranas, peroxidación de los glóbulos rojos y la autooxidación de los homogeneizados de cerebro.

Los flavonoides protoantocianídicos pueden ser absorbidos por las membranas celulares y protegerlas de la acción de los radicales libres. Tienen la ventaja de ser liposolubles e hidrosolubles: es decir, se disuelven en lípidos o en agua.

En contraste con otros antioxidantes que no poseen esa doble cualidad, son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y pueden proteger a las células cerebrales, que son muy sensibles a las lesiones producidas por los radicales libres.⁽²⁰⁾

Además los flavonoides protoantocianídicos combaten la inflamación y las alergias y aumentan la efectividad de las células natural killer del sistema inmunológico.⁽⁶⁴⁾

Muchos de estos efectos antiinflamatorios y antialérgicos podrían explicarse a través de su acción inhibitoria sobre el factor de transcripción nuclear kappa β , activador de muchas citocinas proinflamatorias.

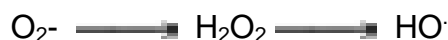
También ejercerían su acción antiinflamatoria al inhibir las actividades enzimáticas del metabolismo del ácido araquidónico por la vía de la 5 – lipooxigenasa, así como por actividad antiproteolítica al inhibir algunas proteasas de la matriz.⁽⁷⁷⁾

2. 4. 2. 6. PROPIEDAD PROOXIDANTE

Los flavonoides no constituyen un grupo homogéneo de compuestos y las mismas propiedades que caracterizan su actividad antioxidante, determinan sus efectos prooxidantes.

Los mecanismos moleculares que determinan la actividad prooxidante de los flavonoides, se basa en la formación de un radical aroxilo lábil o de un complejo flavonoide hierro redox lábil.⁽³³⁾

En el primer caso, la autooxidación del radical aroxilo genera anión superóxido (O_2^-), que genera el radical hidroxilo ($HO\cdot$)



Estos mecanismos pueden constituir la base de algunas acciones mutagénicas y citotóxicas de los flavonoides. Las propiedades prooxidantes y mutagénicas de los flavonoides se hallan unidas a las acciones scavengers que tienen estos compuestos.



El carácter antioxidante o prooxidante esta determinada por la estabilidad / labilidad redox del compuesto radical formado a partir del flavonoide original.⁽⁷²⁾

La auto oxidación del radical aroxilo o la formación de compuestos ternarios entre el DNA, el cobre y los flavonoides, son posibles explicaciones de la mutagenicidad mediada por los flavonoides.

Se requieren altas concentraciones de flavonoides para desarrollar mutagenicidad, ya que es en tales concentraciones que se genera el radical hidroxilo (HO·)⁽⁵⁹⁾

2. 4. 3. METABOLITOS LIQUÉNICOS

Los metabolitos liquénicos son sustancias orgánicas, acumuladas por líquenes, y que han venido siendo estudiadas, por muchos químicos orgánicos desde mediados del siglo XIX, como en los trabajos de los alemanes Zopf, Hesse y Brieger. Conociéndose más de 500 metabolitos secundarios producidos por los líquenes. Un importante avance constituyeron los trabajos de los japoneses Asahina y Shibata, que clasificaron los metabolitos secundarios liquénicos en base a su estructura química.⁽⁷⁴⁾

2. 4. 3. 1. PROPIEDADES

Las primeras referencias sobre la aplicación farmacológica de los líquenes se remontan a los siglos XVII y XVI a. c., en Egipto. Hipócrates recomendaba la *Usnea barbata* para problemas uterinos y los chinos empleaban la infusión de *Usnea longissima* como expectorante y el polvo de su corteza para el tratamiento de úlceras. Los malayos emplean aún las especies de *Usnea* para los resfrios y como tónico.

Mezclas de líquenes islandeses se han usado para el tratamiento de hemoptisis catarrales y tuberculosis pulmonar. En la medicina autóctona de Finlandia se encuentran múltiples aplicaciones de los líquenes. Así los líquenes amarillos han sido recomendados para el tratamiento de ictericia, la *Lobaria pulmonaria* ha sido utilizada contra la tuberculosis pulmonar y la tos, la *Peltigera aptosa* como fármaco para el afta infantil. Pero los líquenes de más amplio uso medicinal en Finlandia son las especies barbudas (géneros *Alectoria* y *Usnea*).⁽⁷⁴⁾

Investigaciones posteriores han comprobado la certeza de estas aplicaciones al demostrar la presencia en los líquenes de compuestos con potente acción antibiótica. Entre estos, el Ácido úsnico, presente en muchas especies, sobre todo del género *Usnea*, demostrado ser incluso más eficaz que la penicilina en algunos casos.



Sin embargo, los compuestos liquénicos no han sido explotados ampliamente como fármacos, a pesar del éxito obtenido por Lazarev en la Unión Soviética con el empleo de la sal sódica del Ácido úsnico como antibiótico. ⁽⁷⁵⁾

En Bolivia, por lo menos una decena de líquenes son empleados en la medicina nativa desde épocas precolombinas para el tratamiento de diversas afecciones, principalmente de tipo infeccioso o inflamatorio.

La distribución de porcentaje de sustancias liquénicas con diferente tipo de actividad farmacológica se expresa en: 2% actúan como antiinflamatorios, 13% son antitumorales, un 28% son antimicóticos y un 57 % han sido probados como antibióticos, todas estas propiedades fundamentalmente son debidas a los Dépsidos, Depsidonas y Dibenzofuranos. ⁽⁸⁹⁾





2. 5. ESPECIES VEGETALES

2. 5. 1. *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel

2. 5. 1. 1. CLASIFICACIÓN

Familia: Fabaceae

Genero: *Adesmia*

Especie: *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel

Nombre común: “Loma añawayá”, “Añaguaya”, “Añawiya”, “Añawa”.

La interpretación etimológica de la palabra **Añawayá loma**, es mata o arbusto espinoso.

2. 5. 1. 2. PARTE UTILIZADA

Las hojas y tallos principalmente, aunque toda la planta tiene propiedades.

2. 5. 1. 3. HÁBITAT

Se encuentra a 3.200 y 4.000 m. s. n. m., en la región de la Cuenca del Lago Poopo en el departamento de Oruro, en laderas y quebradas pedregosas o rocosas y secas. ⁽⁹⁰⁾

2. 5. 1. 4. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

Es una planta arbustiva erecta espinosa de 0.30 – 1.50 m de altura. Presenta las siguientes características:

- ♣ Hojas muy cortas paripinadas de color verde plateado.
- ♣ Flores pequeñas zigomorfas en racimo de color amarillo. Presenta dos épocas de floración: noviembre a diciembre y de marzo a abril.
- ♣ Tallos semileñosos – leñosos ramificados perennes.
- ♣ Raíz pivotante y ramificada.

2. 5. 1. 5. COMPOSICION QUIMICA

Los productos de la especie *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel, están aun en proceso de elucidación. ⁽⁶¹⁾

2. 5. 1. 6. RECOLECCIÓN

El arbusto se corta bastante bien en horas de la mañana mientras que en la tarde es muy duro por la pérdida de agua en los tallos.

2. 5. 1. 7. PROPIEDADES

La Loma añawayá es una de las especies vegetales que con frecuencia se usa en la medicina como antitusígeno, y empleado contra el sarampión. ⁽⁹⁰⁾



2. 5. 2. *Stereocaulon ramulosum* Rausch

2. 5. 2. 1. CLASIFICACIÓN

Familia: Stereocaulaceae

Genero: Stereocaulon

Especie: *Stereocaulon ramulosum* Rausch

Nombre común: Sin referencia

2. 5. 2. 2. PARTE UTILIZADA

Los talos principalmente, aunque todo el liquen tiene propiedades.

2. 5. 2. 3. HABITAT

Los líquenes del genero *Stereocaulon* abarcan 97 especies, subespecies y variedades distribuidas por todo el mundo, crecen muy lentamente y se adaptan a condiciones de hábitat muy variadas, por ello colonizan todas las zonas climáticas de la tierra.⁽⁸⁹⁾

2. 5. 2. 4. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

Los líquenes del genero *Stereocaulon* presentan un talo dimorfo, con algas verdes como ficobionte de morfología arbustiva pequeña, se fijan al sustrato mediante un disco de fijación. El talo primario es crustoso granuloso y suelen desaparecer pronto. El talo secundario es fruticuloso, erecto, escamoso, sólido, con pseudopodocios, compuesto por lóbulos cilíndricos, frecuentemente ramificados, crecen casi siempre aislados.

Las ramas del talo están cubiertas de excrecencias granulosas, o escumiformes (filocladios) y no presentan cavidad ni hilo central. Los talos son de colores grises o pardos grisáceos, suelen formar densas almohadillas y con espacios que permiten la aireación.⁽³⁷⁾

2. 5. 2. 5. FISILOGIA

Los líquenes del genero *Stereocaulon*, al igual que sus semejantes tienen una alta tolerancia a circunstancias ambientales desfavorables.

En momentos de desecación ya sea por el sol o por el viento suspenden su actividad, la cual inician nuevamente al recobrar el agua por medio de la lluvia o del rocío que absorben, ya que no poseen un órgano especializado para esta función.⁽⁷⁴⁾

2. 5. 2. 6. PROPAGACIÓN

Los líquenes pueden colonizar los más diversos sustratos, aproximadamente el 8% del total de la superficie terrestre está ocupada por líquenes, como vegetación dominante. De acuerdo al sustrato donde se encuentran los líquenes del género *Stereocaulon* se denominan:



- ♣ **Saxícolas:** Que crecen sobre rocas. Considerando aquí las especies Endolíticas. Pueden ser:
 - ♣ **Liquenícolas:** hallados sobre otros líquenes, en este caso se denominan parasimbioses.
 - ♣ **Terrícolas:** ubicados directamente sobre la tierra.

2. 5. 2. 7. COMPOSICION QUIMICA

Entre los productos detectados en la especie del líquen del género *Stereocaulon* se encuentran:

- ♣ **Ácidos Carboxílicos,** Ácido norrangifórmico, Ácido rangifórmico y Ácido ventósico.
- ♣ **Ácidos Úsnicos,** Ácido úsnico.
- ♣ **Antraquinonas,** Parietina.
- ♣ **Derivados de tipo β – Orcinol,** Ácido constictico, Ácido escuamático, Ácido fumarprotocetrarico, Ácido norstictico, Ácido protocetrarico, Ácido salazinic, Ácido stictico, Ácido tamnolico y Atranorina.
- ♣ **Derivados de tipo Orcinol,** Ácido anziaico, Ácido didimico, Ácido divaricático, Ácido gloméllico, Ácido glomelliferico, Ácido lecanórico, Ácido lobárico, Ácido miriquidico, Ácido perlatólico, y Ácido porfirílico.
- ♣ **Esteroles y Terpenos,** β – sitosterol, Ergosterol, Friedelina y Zeorina.

2. 5. 2. 8. PROPIEDADES

Han sido utilizados en la medicina popular preparando pomadas para evitar infecciones en heridas superficiales, quemaduras y por sus propiedades antibióticas, sobre todo aquellos líquenes que producen ácido úsnico, como los representantes del género *Usnea*.⁽⁸⁹⁾



2. 6. FARMACIA GALÉNICA

Ciencia que estudia la transformación de los principios activos y productos auxiliares en preparados galénicos eficaces, seguros y estables. Se ocupa de estudiar la disposición adecuada de las sustancias medicamentosas y los fármacos para su administración a los seres vivos; que permite seleccionar las formas farmacéuticas más adecuadas para la acción terapéutica.⁽³⁾

2. 6. 1. PREFORMULACIÓN

Se llama preformular a la etapa primaria en el desarrollo racional de un preparado galénico y puede definirse como la investigación sistemática de las propiedades físicas y químicas de un solo principio activo o en combinación. Comprende los siguientes pasos:

- ♣ Selección de la forma de dosificación y vía de administración.
- ♣ Estudio de la compatibilidad del principio activo, con los excipientes y auxiliares de la formulación.
- ♣ Tipo de descomposición (hidrólisis, oxidación, reducción, racemización, etc.)
- ♣ Catalizadores de descomposición del principio activo (termoestabilidad, fotolabilidad).
- ♣ Efecto de pH, e interacciones moleculares.
- ♣ Efecto del medio ambiente (humedad, temperatura, luz).
- ♣ Estudios forzados de degradación en diferentes formas.

Durante el estudio de la preformulación es imprescindible mantener cierto grado de flexibilidad y detectar los aspectos que pueden causar problemas e identificarlos en forma temprana. Solucionados los problemas, se pasa a la etapa de formulación.⁽⁴⁰⁾

La integración de los datos farmacológicos, y los bioquímicos, proveen al formulador la información necesaria para elegir la forma posológica óptima que contenga los componentes deseables para usar en el desarrollo del producto.

2. 6. 2. FORMULACIÓN

Es el diseño del preparado galénico, para obtener formulaciones prototipo, e iniciar o continuar ensayos farmacológicos. Comprende las siguientes actividades:



- ♣ Evaluación de los estudios de preformulación.
- ♣ Selección del sistema de entrega del principio activo.
- ♣ Selección de los auxiliares de formulación.
- ♣ Selección del método de fabricación.
- ♣ Desarrollo de los estudios finales de estabilidad, para determinar la vida útil probable y condiciones de almacenamiento.
- ♣ Desarrollo de la fórmula muestra tipo.

Los factores fundamentales a considerarse en el diseño y formulación del preparado galénico son:

- ♣ Características del principio activo.
- ♣ Características de los auxiliares de formulación.
- ♣ Características de la forma de presentación.
- ♣ Características de la estabilidad.
- ♣ Características de la biodisponibilidad.
- ♣ Características del paciente.

2. 6. 3. ASPECTOS GENERALES DE LAS CREMAS

Las cremas cosméticas son preparados emulsionados de constitución pastosa destinada al cuidado y embellecimiento de la piel. Químicamente están constituidas por una base que contiene cuerpos grasos, agua, agentes emulsionantes, humectantes y aditivos de diferente naturaleza.

Las cremas cosméticas de manera general están destinadas a ser aplicadas, ya sea directamente al organismo cutáneo o a servir de vehículo a diferentes principios activos que van a producir efectos especiales. El método seguro para preparar las cremas, consiste en producir emulsiones, añadiendo la fase interna a la fase externa. ⁽⁴⁴⁾

2. 6. 4. FUNCIONES Y PROPIEDADES DE LOS COMPONENTES DE LAS BASES DE LAS CREMAS

Las propiedades (emoliente, viscosidad, tensión superficial, índice de refracción, actividad óptica, solubilidad y actividad dieléctrica), de los componentes básicos de las cremas, depende en gran parte no solo de las características químicas y físicas, sino también de las biológicas inmediatas, de estos cosméticos, destinados al tratamiento de la piel. ⁽⁸⁶⁾

Los constituyentes fundamentales o ingredientes de las cremas, son:

2. 6. 4. 1. AGUA

El agua a utilizar es destilada, exenta por lo tanto de sales minerales, productos orgánicos y bacteriológicamente pura (agua estéril). ⁽⁸⁶⁾

2. 6. 4. 2. HUMECTANTES

Son sustancias higroscópicas, tienen la propiedad de retener el agua en la masa de las cremas, satisfaciendo diversas exigencias como:



- ♣ Disminuyen la pérdida de agua en los productos acabados.
- ♣ Impiden la rotura de la emulsión, su desecación y formación de costra.
- ♣ Estabilizan la emulsión.
- ♣ Facilitan la distribución y la acción lubricante de las cremas sobre la epidermis, causando en ella una sensación agradable.
- ♣ En algunas cremas facilita la adherencia de los polvos a la epidermis.

Los humectantes más usados en la preparación de cremas, son productos orgánicos como el **propilenglicol**, glicerina y sorbitol porque presentan:

- ♣ Bajo índice de viscosidad.
- ♣ Bajo punto de congelación.
- ♣ Compatibilidad con un gran número de sustancias.
- ♣ Elevada higroscopicidad.
- ♣ Inocuidad.
- ♣ Pequeño intervalo de humectación.

2. 6. 4. 3. EMULSIFICANTES

Son los productos tenso – activos, aptos para convertir y hacer estables las emulsiones. En las cremas cosméticas existen dos fases no miscibles, una esta representada por el agua, y algunas veces también por el aire; la otra por los componentes grasos.

Las grasas concretas (acumulación de partículas grasas para formar una masa sólida), pueden incorporar establemente una mínima cantidad de agua y solo algunas grasas especiales forman emulsiones estables pudiendo incorporar hasta el 30% de agua, esto debido a los alcoholes alifáticos, esteroides y alcoholes triterpénicos como la lanolina que puede absorber una gran cantidad de agua, tal característica es debida a los componentes particulares y naturales de las cremas, como por ejemplo a los esteroides, fosfátidos y carbohidratos.

Las grasas líquidas y concretas absolutamente exentas de dichos componentes, son incapaces de incorporar agua en forma estable, y forman emulsiones solamente mientras se encuentran en presencia de productos tenso – activos.⁽⁸⁶⁾

Los emulsionantes son químicamente compuestos que contienen grupos, ya sean polares o apolares; los primeros muestran especial afinidad por la fase acuosa y los segundos por la fase oleosa en la cual se disuelven.



La solubilidad de la parte hidrofílica y de la lipofílica de la molécula de los emulsionantes en las respectivas fases opuestas, exige una disposición especial del tenso – activo en la interfase Agua – Aceite, que toma el nombre de adsorción orientada. (Refiriéndose estrictamente a la existencia de una concentración mas elevada de cualquier componente en la superficie de una fase líquida o sólida que la que hay en el interior de la misma, distinguiéndose claramente de la absorción, ya que esta se refiere a una penetración mas o menos uniforme). Se establece así en la superficie – límite entre las fases no miscibles, una película interfacial condensada de emulsionantes; cuyos grupos hidrófilos están inmersos en la fase acuosa y los lipófilos en la fase oleosa, de modo que resulta un enlace más o menos estable de la emulsión.⁽⁶⁶⁾

Son numerosos los parámetros que hacen posible el mecanismo de acción de los emulsionantes y dependen no solo de su naturaleza química, sino también de los constituyentes que intervienen.

Los fenómenos interfaciales están condicionados a la formación y estabilidad de la emulsión, por la solubilidad de los emulsionantes de las fases, por la tensión superficial, por la orientación molecular, por los fenómenos eléctricos, por alteraciones microbianas, y por los otros parámetros físico – químicos, que se consideran interesantes respecto a la estabilidad de la emulsión.

Las emulsiones se producen en los cuerpos en estado líquido, que constituyen las fases; dispersa y continua, cuando un cuerpo se distribuye en pequeñas gotas dentro de otro cuerpo, el primero toma el nombre de fase dispersa, mientras que el segundo constituye la fase continúa.⁽⁵⁵⁾

En las cremas, la fase dispersa puede estar formada por el agua y por los productos hidrosolubles, o bien por las grasas y productos similares liposolubles. Las emulsiones tipo agua en aceite A/O o aceite en agua O/A se atribuyen a los términos de “Agua” y “Aceite” un significado generalizado de productos solubles en agua y productos solubles en las grasas.

Las gotas de la fase dispersa toman en la fase continua una forma esférica y las fases resultan netamente separadas, incluso en un alto grado de dispersión, porque entre ellas existen las fuerzas inherentes a la superficie – límite entre las fases o interfaciales.

La superficie – limite, representa regiones en las cuales las fuerzas moleculares provocan la aparición de propiedades particulares. Son importantes en las emulsiones cosméticas la tensión superficial y la absorción.



La tensión superficial se explica como una fuerza de contracción que actúa sobre la superficie de los líquidos y tiende siempre a reducir esta a su mínimo; como consecuencia de ella, las diminutas gotas de la fase dispersa toman la forma esférica. La existencia de la tensión superficial se comprende por la acción de la presión interna, (equilibrio entre las fuerzas atractivas y repulsivas en el interior del líquido).

Las sustancias que influyen en gran manera sobre el valor de la tensión superficial de un líquido y que la disminuyen considerablemente están dotadas de actividad superficial. Tales son los emulsionantes usados en las emulsiones cosméticas.

La magnitud de la tensión superficial depende de la concentración de las moléculas dispuestas en la superficie y, puesto que el líquido puede considerarse como un sistema de volumen constante, que tiende siempre al estado de energía libre mínima (energía que acompaña a muchas reacciones químicas; a medida que avanza la reacción, se produce una energía eléctrica mensurable, esta energía eléctrica representa el máximo trabajo útil que se puede obtener de la energía desprendida durante la reacción) enviara a la superficie especialmente aquel tipo de moléculas que necesitan energía superficial mínima. Las sustancias que disminuyen la tensión superficial, en nuestro caso los emulsionantes de las cremas se encuentran hacia la superficie, por lo cual son positivamente absorbidas y el fenómeno toma el nombre de adsorción.⁽⁴⁸⁾

La intensidad del fenómeno de adsorción depende de la superficie, en las emulsiones, es importante que las superficies de contacto sean muy grandes con relación al volumen.

Los emulsionantes utilizados en la preparación de cremas son: Emulsionantes naturales representados por el colesterol y la lecitina; Emulsionantes aniónicos; Emulsionantes no iónicos; Tenso – activos.

2. 6. 4. 3. 1. EMULSIONANTES NATURALES

- ♣ *El colesterol o colestestina*, alcohol secundario monovalente no saturado, de estructura cíclica, perteneciente al grupo de los lípidos no fosforados. Desde un punto de vista biológico la colestestina es necesaria para la integridad celular y factor de importancia en el mecanismo de hidratación de los tejidos.⁽⁸⁶⁾
- ♣ *La lecitina*, fosfátido compuesto por ácido fosfoglicerico esterificado con la colina, un oxidrilo fosforico y con ácidos grasos (palmitico, esteárico y oleico) y los oxidrilos alcohólicos residuales de la glicerina. El ácido fosforico puede unirse al radical glicérico.⁽⁸⁶⁾



2. 6. 4. 3. 2. EMULSIONANTES NO IÓNICOS

Caracterizados por la propiedad de no sufrir disociación al disolverse, son esteres de los ácidos grasos superiores con glicoles, alcoholes o alcoholes éteres polioxidrilicos. Como esteres tienen una estructura mixta – polar – apolar. La parte apolar de la molécula esta representada por radicales de los ácidos esteárico, laurico, oleico y ricinoleico y la fracción polar por los radicales alcohólicos polioxidrilicos. ⁽⁸⁶⁾

2. 6. 4. 3. 3. EMULSIONANTES ANIÓNICOS

Tienen la propiedad de disociarse al disolverse, están representados por sales de amonio y de sodio de los ácidos grasos superiores o por sus derivados aminicos. Son jabones que se forman en el momento de la preparación de las cremas, por reacción entre determinados ácidos grasos y apropiadas sustancias saponificantes (Hidróxido de sodio, Hidróxido de potasio, Amoniaco y diversas aminas). ⁽⁸⁶⁾

2. 6. 4. 3. 4. TENSO – ACTIVOS

También son emulsionantes, dotados de propiedades detergentes tenso – activas y espumantes muy acentuadas y, aunque sus aplicaciones cosméticas en higiene cutánea sean algo reducidas, existen ya en el mercado diversos preparados que los contienen, siendo previsible que la continua evolución química en este campo, contribuya al descubrimiento de muchos productos tenso – activos cada vez mas exentos de defectos.

Para usos cosméticos se prefieren en general, los derivados de los alcoholes grasos superiores, puesto que son menos irritantes para la epidermis y las mucosas. Porque estos productos se pueden limitar a un punto isoeléctrico igual al de la epidermis y, además presentan fácil solubilidad y buena espumación incluso con aguas duras, contrariamente a los jabones.

Para poder clasificar a los tenso – activos se toma en cuenta la carga eléctrica del grupo lipofílico, de manera que existen dos clases: Tenso – activos aniónicos, cuyo grupo lipofílico lleva carga negativa – anión – que corresponden a los jabones y los Tenso – activos catiónicos, cuyo grupo lipofílico lleva carga positiva – catión – que son compuestos de amonio cuaternario. ⁽⁴⁸⁾

♣ TENSO – ACTIVOS ANIÓNICOS

Llamados así porque forman iones negativos debido a la descomposición química, que se produce por el paso de la corriente eléctrica a través de electrolitos disueltos en el agua o fundidos por la acción del calor. Se encuentran los alkilsulfatos, como ser: **Lauril sulfato Sodico**, que

corresponde a la formula: $(\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{11} - \text{O} - \text{SO}_2 - \text{ONa})$, los alkilsulfatos de trietanolamina, de monoetanolamina, de magnesio.⁽⁹²⁾

♣ **TENSO – ACTIVOS CATIONICOS**

Entre los tenso – activos catiónicos están las sales de amonio cuaternario, cuyo anión es el cloruro. Los principales son: Cloruro de Benzalconio (Zephiran, Tersotyl), Cloruro de Benzetonio (Parraféenlo), con una compleja cadena lateral alquilarilica, Cloruro de decualinio (Dequadin) compuesto bicuaternario derivado del quinaldinio.⁽⁹²⁾

2. 6. 4. 4. BASES GRASAS

Los otros ingredientes fundamentales, son las bases grasas que hacen la piel suave y aterciopelada. Al extenderse sobre la epidermis, penetran más o menos profundamente en los estratos cutáneos, mezclándose con la secreción sebácea normal o emulsionándose con ella dando turgencia a los tejidos.

Las bases grasas comprenden: Glicéridos animales y vegetales concretos, Ceras, Alcoholes grasos superiores, Productos de esterificación entre alcoholes y ácidos grasos superiores, Vaselinas y los productos afines que tengan consistencia blanda, pastosa o sólida a temperatura normal.

Las bases grasas comprenden un numero variadísimo de productos dotados de características heterogéneas y constituyen no solo los excipientes para las cremas, sino el cuerpo y los aditivos de muchos otros artículos, como las pomadas cosméticas o liparolitos, ungüentos (cuando con la base grasa se emplean ceras), pastas (pomadas semiduras), leches de tocador (emulsiones líquidas), etc.⁽⁶⁸⁾

Las acciones inmediatas de las bases grasas sobre la epidermis, no son muy diferentes de los aceites, así como tampoco las características físico – químicas. Las grasas están dotadas de ligeras propiedades disolventes sobre la epidermis, desarrollando acciones emolientes y protectoras más o menos sobresalientes, según su naturaleza química.

La aplicación tecnológica de las bases grasas, presenta el inconveniente de que se manifieste la acantosis, que es el espesamiento del estrato malpighiano o germinativo de la epidermis y puede producir la destrucción de los complicados procesos intercelulares (como respiración y absorción) y el desprendimiento de las células epidermicas.⁽⁴⁴⁾



Numerosas investigaciones químicas y biológicas efectuadas en Italia y otros países han puesto en evidencia el poder acantolítico de las bases grasas que se emplean en los preparados farmacéuticos y productos cosméticos.

Dicho poder pueden poseer, substancias que se utilizan normalmente en la composición de cremas para el tratamiento de la piel, considerándose; alcoholes, acetona, grasas minerales, aceite vegetales y animales, ácidos grasos saturados y no saturados, alcoholes grasos superiores, esterres de estos y sus mezclas, siliconas, glicoles y diversos ungüentos.⁽⁵⁵⁾

Investigaciones realizadas sobre el: alcohol etílico, propilenglicol, glicerina, alcohol esteárico, alcohol cetílico, lanolina, cera de abeja, espermaceti, siliconas, glicoles polietilénicos, carbomeros, aceite de sésamo y el aceite de ricino, han demostrado ser poco acantósicos.

En función como excipientes, las bases grasas deben comportarse como cuerpos biológicamente inertes respecto a la epidermis, en el sentido de que no deben provocar reacciones más o menos marcadas sobre la piel, siendo apropiadas para favorecer la penetración en profundidad de las sustancias vehiculadas.⁽⁴⁴⁾

Con relación a su origen, las bases grasas se dividen en:

2. 6. 4. 4. 1. BASES GRASAS NATURALES

Comprendiendo productos extractivos de:

- ♠ **Procedencia Animal:** lanolina, espermaceti, **cera de abejas**, cera blanca virgen, cera amarilla, cera lanete y manteca de cerdo benzoinada.
- ♠ **Procedencia Vegetal:** manteca de cacao y diversas ceras vegetales.
- ♠ **Procedencia Mineral:** Constituidas de hidrocarburos superiores. Comprenden la vaselina pastosa filante, parafina, osoquerita y cerasina.

2. 6. 4. 4. 2. BASES GRASAS SINTÉTICAS

Son mezclas de glicéridos sólidos con diversos hidrocarburos, aceites vegetales y animales. Los más importantes son: Aceites endurecidos, escualeno (hidrocarburo saturado límpido, insípido e incoloro, existe en el hígado de algunos animales marinos), lanolina hidrogenada, siliconas (siendo químicamente inertes, no sufren enranciamiento y han conquistado una importancia considerable como base para cremas y ungüentos).⁽³⁾



2. 6. 5. DETERMINACIÓN DE LA ORIENTACIÓN DE LAS BASES

2. 6. 5. 1. PRUEBA DE DILUCIÓN

Este método depende del hecho de que una base O/A puede diluirse con agua y una base A/O con aceite. Cuando se agrega aceite a una base O/A o agua a una base A/O el aditivo no se incorpora a la base y la separación es visible. La prueba mejora mucho si la adición de agua o aceite se observa microscópicamente.

El método de la dilución se realiza echando una gota de la base en agua, esta se distribuye rápidamente (agitando ligeramente el recipiente en caso necesario) si se trata de una base O/A. Bajo las mismas circunstancias, una gota de base A/O habría permanecido en la superficie del agua.⁽⁹²⁾

2. 6. 5. 2. PRUEBA DEL COLORANTE

El conocimiento de que un colorante hidrosoluble se disuelve en la fase acuosa de una base y de que un colorante soluble en aceite es captado por la fase oleosa sirve como método para determinar el tipo de base.

Algunas gotas de una solución acuosa de un colorante (Azul de metileno) se añaden a una muestra de la base. Si la base total se tiñe uniformemente, se trata de una base O/A pues la fase externa sería agua.

La contraprueba se hace con un colorante liposoluble (solución oleosa de Sudan III). La coloración homogénea solo tendrá lugar en el caso de bases A/O pues el colorante liposoluble solo se difunde en una fase oleosa continua.

Si el examen microscópico muestra que un colorante hidrosoluble ha sido captado por la fase continua, se repite la prueba usando una pequeña cantidad de un colorante soluble en aceite. La coloración de la fase continua confirma que la base es de tipo A/O.⁽⁹²⁾



2. 6. 6. FOTOPROTECTORES

Los fotoprotectores tópicos o productos antisolares son preparados farmacéuticos de aplicación tópica que tienen la propiedad de reflejar, absorber o refractar la radiación ultravioleta de origen solar, atenuando la acción perjudicial de los rayos solares.⁽⁹¹⁾

2. 6. 6. 1. PRINCIPIOS DE FOTOPROTECCIÓN

Las sustancias que se ponen sobre la piel con el fin de prevenir el daño solar, presentan los siguientes principios generales:

- ♣ **Absorción y Disminución de la Transmisión de UV;** Se realiza en el estrato córneo, mediante el uso de sustancias químicas absorbentes de UV – B y UV – A.⁽⁹¹⁾
- ♣ **Aumento de Dispersión UV;** Se produce en el estrato córneo y epidermis viva, mediante el uso tópico de partículas micronizadas de dióxido de titanio, óxido de zinc o melanina.⁽⁹¹⁾
- ♣ **Aumento de Reflexión de UV y Visible;** Se realiza en el estrato córneo, por el uso de partículas micronizadas de dióxido de titanio y óxido Zinc.⁽⁹¹⁾
- ♣ **Inactivación de las Especies Reactivas de Oxígeno;** Se producen en las células viables de la epidermis y la dermis. Son inhibidos por antioxidantes de efectividad variable.⁽⁹¹⁾

2. 6. 6. 2. CLASIFICACIÓN

No existe una clasificación que contemple los diferentes aspectos de las sustancias fotoprotectoras. Se puede clasificar en:

- ♣ **DE ACUERDO A SU MECANISMO DE ACCIÓN**
 - ♣ **Protectores Químicos,** Compuestos aromáticos conjugados con un grupo carbonilo. Absorben los rayos UV de alta energía (Longitud de onda corta) con excitación a un estado de energía superior. Al retornar al estado basal, la energía liberada es de menor magnitud (Longitud de onda más larga).⁽⁸⁰⁾
 - ♣ **Pantallas o Filtros Físicos,** Llamados también micronizados actúan mediante reflexión, dispersión y absorción, bloqueando la acción deletérea de la radiación UV.⁽⁸⁰⁾
- ♣ **DE ACUERDO A SUS CARACTERÍSTICAS**
 - ♣ **PROTECTORES QUÍMICOS**
 - ❖ **FILTROS UV – B**
 - **PABA Y Derivados,** El ácido para amino benzoico es hidrosoluble y potente absorbente UV – B, se lo utiliza en vehículos alcohólicos.

Los inconvenientes que presenta son; mancha la ropa y se lo asocia a abundantes reacciones adversas. Los éster derivados del PABA en especial el octildimetil PABA o Padimato O, son compatibles con diversas sustancias y vehículos, y registran menor incidencia de reacciones adversas.

- **Cinamatos**, Los segundos absorbentes UV – B, más potentes. El octilcinamato es el usado con mayor frecuencia.⁽⁸⁰⁾
- **Salicilatos**, Absorbentes UV – B, más débiles. Se utilizan para incrementar la potencia de otros absorbentes UV – B. Se usan con frecuencia el octisalicilato, seguido por el homosalicilato. Presentan gran perfil de seguridad y pueden solubilizar otros ingredientes.⁽⁸⁰⁾
- **Octocrileno**, Relacionado químicamente con los cinamatos. Se utiliza para reforzar el FPS y mejorar la resistencia al agua en una determinada formulación. Es muy fotoestable pudiendo mejorar esta propiedad en otros productos.⁽⁸⁰⁾
- **Ensilizol**, Absorbente UV – B hidrosoluble, utilizable en la fase acuosa de los sistemas de emulsión permitiendo una formulación menos grasa, y más estética. También se puede usar en geles transparentes.⁽⁸⁰⁾

❖ FILTROS UV – A

- **Benzofenonas**, La oxibenzona se usa con mayor frecuencia. Absorbe con mayor eficacia los UV – B pero su espectro se extiende a los UV – A – II. Se utiliza como absorbente UV – A.⁽⁸⁰⁾
- **Antranilatos**, Son absorbentes UV – B, débiles y principalmente absorbentes UV – A – II, pero menos eficaces que las benzofenonas.⁽⁸⁰⁾
- **Avobenzona**, Nombre comercial Parsol 1789. Aprobada por la FDA para su uso como protector solar OTC. Absorbe intensamente el espectro UV – A – I. Los cuadros alérgicos son infrecuentes.⁽⁸⁰⁾



- **Dialcanfor de Tetraftalidina Ácido Sulfónico**, Su nombre comercial es Mexoryl SX. Absorbente UV – A amplio, de eficacia similar a la avobenzona.⁽⁸⁰⁾

♣ **PROTECTORES FÍSICOS O PANTALLAS**

Incluyen compuestos químicos inorgánicos como el óxido de zinc y el dióxido de titanio, elegidos por su alto índice de Refracción. La tecnología ha permitido su elaboración con un tamaño submicroscópico o micronizado (20 – 150 nm) imperceptible al ser aplicado sobre la piel. Como son partículas su tamaño impide que atraviesen la epidermis. El tamaño y la uniformidad de las partículas son la clave de su eficacia fotoprotectora, siendo fotoestables y seguros. Actúan mediante atenuación de la radiación UV, resultado de la combinación de los mecanismos reflexión, dispersión y absorción.

- ❖ **Oxido de Zinc**, Es un óxido metálico con historia de uso tópico como protector de la piel. Aprobado por la FDA con categoría I, es seguro para la aplicación en piel inflamada y con afectación de la barrera cutánea, por lo que se le utiliza el manejo del eritema del pañal. De todos los ingredientes disponibles sólo el oxido de zinc, protege de UV – B, UV – A – II y parcialmente de UV – A – I.⁽⁹¹⁾
- ❖ **Dióxido de Titanio**, Es un óxido metálico, químicamente casi inerte. Se ha demostrado una ligera fotosensibilidad de los cristales de superficie lo que da lugar a la formación de radicales libres. Esto se puede eliminar mediante técnicas de recubrimiento de los cristales con sílice o dimeticona. Debido a su mayor índice refractivo tiende a ser blanco y de difícil incorporación en productos invisibles. Presenta una protección frente a UV – B y UV – A – II.⁽⁹¹⁾

♠ **DE ACUERDO SU ESPECTRO UV DE PROTECCIÓN**

- ♣ **UV – B**
- ♣ **UV – A**
- ♣ **AMPLIO** (UV – B y UV – A)

♠ **DE ACUERDO A SU UTILIZACIÓN**

- ♣ **PRIMARIOS** (uso en la playa)
- ♣ **SECUNDARIOS** (uso en cosméticos y a diario)

♠ **DE ACUERDO A SU ACCIÓN FUNDAMENTAL**

- ♣ **Bronceadores**, Producen pigmentación con un mínimo de quemadura. Filtran los rayos UV – B que tienen acción eritematogena y permiten el paso de los rayos UV – A que tienen acción bronceadora.⁽⁹¹⁾



- ♣ **Pantallas**, Bloquean completamente la radiación UV sin producir bronceado ni eritema.⁽⁹¹⁾

2. 6. 6. 3. TIPOS DE FOTOPROTECTORES

Las formulaciones comerciales están conformadas por más de un ingrediente, tratando así de obtener un producto de mayor espectro protector, más cosmético y químicamente más estable.

Un buen protector solar debe asociar filtros químicos para absorber UV – A y UV – B, pigmentos reflectantes como el dióxido de titanio y óxido de zinc, y otros aditivos que mejoran la acción de los primeros.

Existen cinco tipos de fotoprotectores, que protegen la piel contra la radiación UV – B, UV – A o ambos.⁽⁹¹⁾

- ♣ **Tipo 1**, Fotoprotectores para UV – B. Su FPS está entre 2 – 15. Contiene sólo absorbentes UV – B como amino benzoatos, cinamatos, salicilatos y benzofenonas. Absorben entre 290 – 320 nm.
- ♣ **Tipo 2**, Fotoprotectores para UV – B y UV – A. Su FPS esta entre 12 – 15. Parcialmente eficaz frente a UV – A, porque incluye benzofenonas. Absorben 290 – 360 nm.
- ♣ **Tipo 3**, Fotoprotectores para UV – B y UV – A. Su FPS está entre 15 – 20, porque están añadidos de benzofenonas de amplio espectro. Absorben 290 – 400 nm.
- ♣ **Tipo 4**, Fotoprotectores para UV – B y UV – A. Su FPS está entre 15 – 30 o más de 30. Añadidos de avobenzona, dióxido de titanio y óxido de zinc. Recomendable para fototipos I a III y en fotodermatitis.
- ♣ **Tipo 5**, Bloqueadores físicos (sustancias pantalla). Su FPS es de 15 – 30. Contiene óxido de zinc y dióxido de titanio micronizado. No son sensibilizantes.

2. 6. 6. 4. ESPECTRO DE ABSORCIÓN DE LOS FOTOPROTECTORES

Los fotoprotectores tienen un índice de protección solar (FPS) que se obtiene a través de complicados cálculos a partir de la dosis eritematogena mínima (tiempo de exposición mínima necesaria, según el fototipo cutáneo, para obtener un eritema cutáneo).⁽⁸⁰⁾



FOTOPROTECTOR	ESPECTRO DE ABSORCIÓN UV – A Y UV – B (nm)
PABA	260 – 313
Avobenzona(parsol 1789)	320 – 400
Cinamato	280 – 310
Dioxibenzona (benzofenona – 8)	260 – 355
Homosalicilato	290 – 320
Metilantranilato	280 – 340
Octocrilato	290 – 360
Octilmetoxicinamato	280 – 320
Octilsalicilato	280 – 320
Oxibenzona (benzofenona – 3)	320 – 360
Padimato O	264 – 320
Ácido sulfónico (fenilbenzimidazol)	290 – 320
Sulibenzona (benzofenona – 4)	260 – 360
Salicilato de trolamina	260 – 355
Óxido de cinc	300 – 400

2. 6. 6. 5. FACTORES QUE INFLUENCIAN LA EFICACIA DE LOS FOTOPROTECTORES

- ♣ **Espectro de Absorción**, Son más eficaces aquellos con valores de extinción molar altos, como los cinamatos. No sólo cuenta el pico de mayor absorción sino también las longitudes de onda adyacentes.⁽⁴⁸⁾
- ♣ **Cantidad y Método de Aplicación**, Según la FDA hay que aplicar 2 mg / cm². Si se pone menos cantidad habrá menor protección y mayor riesgo de quemadura. Se debe aplicar uniformemente en toda la superficie a exponer y 15 – 30 minutos antes de exponerse al sol.⁽⁴⁸⁾
- ♣ **Sustantividad**, Es la capacidad de permanecer en la piel, de adherirse y protegerla. Las sustancias lipofílicas insolubles en agua penetran hasta la capa córnea evitando las pérdidas por sudor o por el agua.⁽⁴⁸⁾
- ♣ **Fotoestabilidad**, Las sustancias fotoestables retienen el FPS y protegen la piel de exposiciones prolongadas al sol. Los fotolábiles pierden el FPS, pudiendo producir fotoalergia.⁽⁴⁸⁾
- ♣ **Solubilidad en los Vehículos**, La mayoría de los fotoprotectores llevan de 2 a 6 sustancias químicas de solubilidad variable para lograr una concentración de 20 mg / ml sin que precipite y proteja con un FPS mayor o igual a 15 – 30. La composición del excipiente es muy importante, así las de mayor uso son las emulsiones que no se van con el agua ni con el sudor.



2. 6. 7. ESTABILIDAD DEL PRODUCTO GALÉNICO

La estabilidad de un producto galénico se define como la capacidad de una formulación en particular, para mantenerse dentro de sus especificaciones físicas, químicas, microbiológicas, terapéuticas y toxicológicas. La seguridad de que el producto conserve su estabilidad, debe provenir de la acumulación de datos valederos sobre el principio activo.

La estabilidad del principio activo se puede definir como el tiempo transcurrido desde la elaboración, hasta que su actividad química y biológica no descienda por debajo de un nivel de potencia determinado de antemano y sus características físicas no se hayan modificado de manera apreciable ni nociva. Se reconoce como el nivel de potencia mínimo aceptable, de 90% de la potencia declarada.⁽⁴⁰⁾

Los requisitos para los estudios de la estabilidad están descritos en el GOOD MANUFACTURING PRACTICE (GMP) de la USP, que comprende un programa documentado de las pruebas encaminadas a establecer las características de estabilidad, para determinar las condiciones apropiadas de almacenamiento y las fechas de vencimiento, de manera que el producto este asegurado, satisfaciendo las normas de identidad, potencia, calidad y pureza en el momento de usarlo. Estas disposiciones se rigen para drogas humanas y veterinarias, se actualizan periódicamente de acuerdo con la tecnología y conocimientos mas recientes.⁽³⁸⁾

Los factores que pueden incidir sobre la estabilidad del producto son: inactividad de los componentes activos, interacción potencial entre los componentes activos e inactivos, proceso de elaboración, forma posológica, sistema de recipiente, condiciones de almacenamiento, manipulación, y el tiempo transcurrido desde la elaboración hasta su aplicación.

Se ha separado las evaluaciones de estabilidad en; físicas, químicas e incluso bioquímicas de la formula, pero en realidad no existe línea divisoria absoluta entre estos aspectos.

Los factores físicos (calor, humedad, luz) pueden desencadenar reacciones químicas o acelerarlas, en tanto que siempre que se hace una medición en un compuesto químico, se incluye el estudio físico.

El conocimiento de la estabilidad física es importante por tres razones:

- ♣ El producto galénico debe tener un aspecto fresco, elegante y profesional, todo el tiempo, toda alteración del aspecto físico como perdida de color o turbiedad, puede hacer que el paciente pierda la confianza en él.



- ♣ Al expendirse el producto en recipientes de dosis múltiples, hay que asegurar la uniformidad del contenido, (principio activo) en función del tiempo, una emulsión cortada tiene una posología dispareja.
- ♣ El paciente debe recibir el componente activo durante toda la vida de almacenamiento prevista para el preparado. Toda alteración puede hacer que el preparado pierda su disponibilidad para el paciente.

Las causas químicas de deterioro de los principios activos han sido clasificadas como: Incompatibilidad, oxidación, reducción, hidrólisis, racemización, y otras (descarboxilación, formación de peróxidos, formación de hipocloritos y la formación de precipitados). Otras causas a observar son las modificaciones de pH, olor, estabilidad a la luz, redispersabilidad, suspensibilidad, fluidez, viscosidad, isotonicidad, estabilidad microbiana, densidad, tensión superficial. ⁽⁶⁸⁾

2. 6. 7. 1. INCOMPATIBILIDAD

Entre los diversos componentes de la fórmula, puede ocasionar incompatibilidad de tipo físico, químico o terapéutico.

- ♣ La interacción Física, origina alteración reconocible a simple vista (precipitado, turbiedad o alteración de color).
- ♣ La interacción Química no produce ningún cambio visible, su determinación es compleja y delicada, y debe ser reconocida por el personal experimentado.
- ♣ La interacción Terapéutica es de tipo farmacológico y comprende; la potencialización del efecto terapéutico, ineficacia de uno o más componentes de la fórmula, y manifestación tóxica en el paciente.

2. 6. 7. 2. CAUSAS DE INESTABILIDAD DEL PRODUCTO

2. 6. 7. 2. 1. RACEMIZACIÓN

Es el proceso o acción de pasar un compuesto óptimamente activo a uno inactivo (mezcla racémica) respecto a sus dos formas dextrógiras (d) o levógiras (l), en farmacia muchas veces la forma (l) posee mayor actividad farmacológica que la (d). Este tipo de inestabilidad depende de: la temperatura del disolvente, del catalizador y la presencia o no de luz. ⁽⁶⁶⁾

2. 6. 7. 2. 2. FOTOLISIS

Tiene importancia en la estabilidad de productos galénicos por que los principios activos pueden ser afectados químicamente por la radiación de una determinada longitud de onda, si absorbe esta radiación, o si la misma excede el nivel energético (UV), ocasiona degradación.



Si la molécula que absorbe radiación, reacciona, se dice que es una reacción de fotólisis, si transfiere su energía y otra molécula reacciona, se dice que la molécula es fotosensibilizante.⁽⁶⁶⁾

2. 6. 7. 2. 3. OXIDO – REDUCCIÓN

La oxidación o pérdida de electrones de un átomo, dando lugar a la formación de radicales libres que originan una reacción en cadena, en la práctica se puede retirar gran parte del oxígeno que hay en el recipiente desplazando el espacio aéreo, pero es difícil extraerlo por completo.

En muchas de las reacciones de oxidación, la velocidad de reacción es influida por la temperatura (aumento que acelera la reacción), la radiación o un catalizador (trazas de metales, como iones cuprico, ferroso o ferrico).⁽⁸²⁾

2. 6. 7. 2. 4. HIDRÓLISIS

Depende de la temperatura y el pH de la solución, existe una regla empírica que dice: “por cada diez grados que sube la temperatura de almacenamiento, la reacción de hidrólisis se duplica o triplica”, disminuyendo la concentración del principio activo.

Muchas reacciones hidrolíticas son catalizadas por los iones hidronio e hidroxilo, los factores importantes en la velocidad de reacción son el pH y la cantidad de agua.⁽⁹²⁾

2. 6. 7. 3. DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DEL PREPARADO GALÉNICO

Se considera estable un preparado galénico cuando es sometido a variaciones de temperatura y no sufre modificaciones químicas, ni físicas.

Son tres los principales puntos de vista a determinarse en un preparado galénico: Estabilidad química, física y biológica. Para determinarlos, se realizan procedimientos principales; Variación de la temperatura, Centrifugación y Acción de la Luz.

2. 6. 7. 3. 1. POR VARIACIÓN DE TEMPERATURA

Mide la estabilidad química (propiedades de la parte activa) y la estabilidad biológica (posible contaminación). Además, es un indicador indirecto de la estabilidad física, si se encuentra en el envase final, Se subdivide en tres:

- ♣ **TEMPERATURA AMBIENTE ILUMINADO**, En condiciones normales de temperatura, la termostatación entre 28 a 32 °C posibilita la observación de la contaminación y su desarrollo, que serán como las condiciones de almacenamiento.



- ♣ **TEMPERATURA ELEVADA**, Método acelerado que utiliza la temperatura más alta anual registrada en la región, incrementada en 10 °C. La elevación de la temperatura acelera las reacciones químicas, con lo cual podría desestabilizarse el sistema.
- ♣ **TEMPERATURA BAJA O DE REFRIGERACIÓN**, Comprendida entre 4 y 0 °C (para el trópico entre 1 y 15 °C) lo que podría producir turbiedad por cristalización.

El periodo de observación, en el método acelerado será de quince días, y el de temperatura ambiental hasta un mes, para considerarse validos.

2. 6. 7. 3. 2. CENTRIFUGACIÓN

Determina solo la estabilidad física del preparado, en especial si este es polifásico. 30 minutos de centrifugación, a 3.000 r. p. m., a temperatura entre 20 °C y 40 °C, es suficiente para comprobar la estabilidad del preparado, donde la presencia de precipitado deberá ser nula.

2. 6. 7. 4. DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE VIDA MINIMO DEL PREPARADO GALENICO TERMINADO

Dentro de las directrices sobre calidad, seguridad y eficacia de los preparados galénicos de uso humano, que propone la comisión de las comunidades europeas, en 1.989, dentro del acápite de estabilidad, menciona la necesidad de esta, y de la influencia de una serie de factores medio ambientales.⁽¹⁷⁾

El tiempo en el cual se presenta la caducidad de un preparado galénico, determina el efecto del calor y la humedad sobre el preparado o sobre el principio activo mismo; también es indicador de la forma de almacenamiento.

La experimentación de envejecimiento acelerado consiste en someter el preparado a temperaturas altas y humedad, simulando condiciones extremas, para acelerar la posible descomposición del principio activo o de alguno de los componentes de la formula. Luego los datos son analizados y comparados por equivalencias, por ejemplo, una solución, sometida a 40 °C y 65% de humedad relativa por espacio de un mes, equivale a un año en condiciones de 20 °C y 45% de humedad relativa.⁽³⁸⁾



3. JUSTIFICACIÓN

La búsqueda de nuevos fármacos de origen vegetal, ha ocupado el interés de farmacognostas y fitoquímicos por muchas décadas. Exploraciones para recolectar especies vegetales y estudios fitoquímicos realizados, se han enfocado en la búsqueda de probadas actividades farmacológicas sobre trastornos cardiacos, digestivos, artritis, psicosis, infecciones, cáncer, etc.

El uso de estas especies vegetales para el tratamiento de algún tipo de trastorno, sigue aun vigente y mediante estudios estadísticos realizados recientemente, muestran que alrededor de las dos terceras partes de la población latinoamericana se medica con drogas crudas, denominadas comúnmente “Yerbas Curativas”.

Sin embargo, cuando se habla de plantas medicinales, muchos sonríen maliciosamente visionando al brujo provinciano supersticioso, sin detenerse a pensar que la medicación naturista ha dado origen al estudio científico de las plantas medicinales. Siendo la naturaleza la que proporciona el punto de partida para los futuros medicamentos.

La práctica del expendio de medicamentos en base a la prescripción médica ha cambiado sensiblemente, hasta hace pocos años los recipientes con jarabes, lociones, geles, cremas, etc., expedidos por parte del farmacéutico requerían de continuas manipulaciones para su elaboración. Esta práctica ha ido decreciendo y los medicamentos se han ido expendiendo en envases originales, elaborados en laboratorios farmacéuticos industriales, denominándose productos farmacéuticos, comúnmente patentados.

Antes, el farmacéutico enfocaba su estudio e interés por la anatomía, organografía e histología vegetal, hoy lo hace hacia la fitoquímica, tratando de aislar, purificar, determinar la estructura molecular y analizar la actividad farmacológica de las sustancias contenidas en los órganos vegetales. De tal manera que el farmacéutico moderno, al conocer los principios terapéuticamente activos y también las sustancias inertes que las acompañan en los tejidos vegetales, logra un mayor rendimiento en el proceso de extracción y purificación, así como también en la elaboración del producto galénico, el cual contendrá la actividad farmacodinámica esperada del principio activo aislado del vegetal.⁽²⁾

Un incremento importante en los casos de cáncer de piel se viene observando, principalmente por la sobre exposición al Sol, y en concreto a la radiación ultravioleta, y los efectos adversos que provoca. Entre los principales efectos inducidos por la radiación ultravioleta, se destaca el incremento en la formación de especies reactivas del oxígeno y una disminución de la capacidad antioxidante de la piel, que conduce al aumento en la incidencia de lesiones pre – malignas y malignas.⁽⁹¹⁾



En nuestro país, se da muy poca importancia al cuidado de la piel, pese a que factores como:

- ♣ Altitud (La Paz, se encuentra aproximadamente a 3.600 m. s. n. m.).
- ♣ Hora del día (La mayoría de las personas por cuestiones laborales están expuestos durante bastante tiempo a los rayos solares o las personas que salen del trabajo a mediodía, hora en que el sol esta en el zenith).

Llegan a ser de cuidado, ya que estamos más expuestos a que los rayos solares nos afecten, prueba de ello es que la mayoría de la población que habita en las regiones altiplánicas presenta en el rostro manchas que comúnmente llamamos “pecas” o decoloraciones de la piel.

En América Latina, y particularmente en Bolivia en la región altiplánica ubicada de 3.000 a 4.000 m. s. n. m., se encuentran especies vegetales que han logrado adaptarse a estas condiciones elevadas de radiación UV, a través de mecanismos de autodefensa utilizando medios físicos y químicos (principios con actividad antioxidante / fotoprotectora), que les ayudan a protegerse contra las agresiones medioambientales.⁽⁸⁹⁾

El campo de los fotoprotectores naturales ha sido muy poco estudiado, por tanto la investigación y elaboración de un producto galénico, en cuya formula contenga sustancias naturales con una actividad fotoprotectora nos daría la posibilidad de prevenir en futuras generaciones estas alteraciones que sufre la piel, en nuestro caso no es cuestión de estética, ni de estatus, sino simplemente de prevenir ciertas anomalías que causa la radiación UV – B.

A la vez promover el estudio de nuestros recursos naturales, mediante una industrialización de una forma diferente, de manera que la comunidad o los productores se beneficien económica y laboralmente al usar materia prima natural y renovable, cuyo procesamiento no requiera de técnicas sofisticadas, ni costos elevados, que sea accesible a la mayoría.

La investigación elaborada sobre los trabajos realizados por parte del Instituto de Investigaciones Químicas, a cargo de la Licenciada Mollinedo⁽⁶¹⁾ y el Licenciado Vila⁽⁸⁹⁾, tiene importancia por tres aspectos:

- ♣ Abrir y continuar una línea de investigación químico farmacéutica, dentro del estudio de productos naturales y su beneficio a la salud.
- ♣ Verificar la actividad antioxidante / fotoprotectora de especies vegetales bolivianas, contra la radiación UV – B, y los efectos inducidos por esta, como son las especies reactivas del oxígeno.
- ♣ Presentar un producto galénico de uso sencillo, y eficaz que podría ser producido a mayor escala para el beneficio de la población boliviana.



4. OBJETIVOS

4. 1. OBJETIVOS GENERALES

- ♣ Elaborar, evaluar y medir la capacidad antioxidante / fotoprotectora de una forma galénica de uso tópico, elaborado a partir de metabolitos secundarios de las especies vegetales *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel y *Stereocaulon ramulosum* Rausch, que se empleen como filtros de la radiación ultravioleta.

4. 2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ♣ Recolectar las especies vegetales *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel y *Stereocaulon ramulosum* Rausch, de la región altiplánica de Bolivia ubicada entre 3000 y 4000 m. s. n. m., para extraer, aislar y purificar metabolitos secundarios con propiedades antioxidantes / fotoprotectoras, *in vitro* probadas.
- ♣ Estandarizar un método de obtención de principios activos de las especies vegetales *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel y *Stereocaulon ramulosum* Rausch, con propiedades antioxidantes / fotoprotectoras, *in vitro* probadas.
- ♣ Determinar la actividad antioxidante, por el método de decoloración del radical catiónico ABTS⁺, de las moléculas que se encuentran en las especies vegetales *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel y *Stereocaulon ramulosum* Rausch.
- ♣ Preformular una base, aplicable a los principios activos de las especies vegetales *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel y *Stereocaulon ramulosum* Rausch, sobre los antecedentes de sus propiedades antioxidante / fotoprotectora *in vitro*.
- ♣ Elaborar formas galénicas de uso tópico, de las moléculas con mayor actividad antioxidante de las especies vegetales *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel y *Stereocaulon ramulosum* Rausch.
- ♣ Determinar el tiempo de vida mínimo para las formas galénicas elaboradas a partir de especies vegetales *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel y *Stereocaulon ramulosum* Rausch.
- ♣ Determinar y medir la capacidad fotoprotectora por el método de estudio de actividad fotoprotectora en piel de conejo, de las formas galénicas elaboradas a partir de especies vegetales *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel y *Stereocaulon ramulosu sum* Rausch.



5. HIPOTESIS

- ♣ **H₀**: El tiempo de vida mínimo de un preparado galénico de origen vegetal no es dependiente de la concentración.
- ♣ **H₁**: El tiempo de vida mínimo de un preparado galénico de origen vegetal es dependiente de la concentración.
- ♣ **H₀**: La elaboración de un preparado galénico de origen vegetal no posee un efecto fotoprotector para la piel, contra la radiación UV.
- ♣ **H₂**: La elaboración de un preparado galénico de origen vegetal posee un efecto fotoprotector para la piel, contra la radiación UV.

5. 1. VARIABLES

5. 1. 1. VARIABLE INDEPENDIENTE

Concentración de los principios activos de los extractos de *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel y *Stereocaulon ramulosum* Rausch.

Definición Conceptual: Concentración a la cual los preparados galénicos presentan un tiempo de vida mínimo manteniendo su estabilidad.

Definición Operacional: 2%, 5% y 10% de los preparados galénicos.

5. 1. 2. VARIABLE DEPENDIENTE

Capacidad de penetración a través de la piel de un preparado galénico a una determinada concentración.

Definición Conceptual: Determinación del tiempo de vida mínimo de un preparado galénico a una determinada concentración, lo cual implica la capacidad de poder penetrar a través de la piel y protegerla de la radiación UV, inducida.

Definición Operacional: Efecto fotoprotector del preparado galénico a una determinada concentración, determinada por la medición de un indicador que se ve incrementado por la radiación UV, inducida en la piel del animal de experimentación.



6. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

Experimental.

6. 1. TIPO DE ESTUDIO

Correlacional.

6. 2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN / EXCLUSIÓN

6. 2. 1. INCLUSIÓN

- ♣ Elección de los componentes necesarios para la elaboración de una base neutra tipo cold – cream.
- ♣ Elección de bases ideales, en función a las pruebas de estabilidad, para la elaboración de los preparados galénicos.
- ♣ Elaboración de los preparados galénicos en base a la actividad antioxidante de los principios activos inducidos por el ensayo de decoloración del radical catiónico ABTS⁺ (*test químico*).
- ♣ Todos los preparados galénicos elaborados que cumplan con el tiempo de vida mínimo.

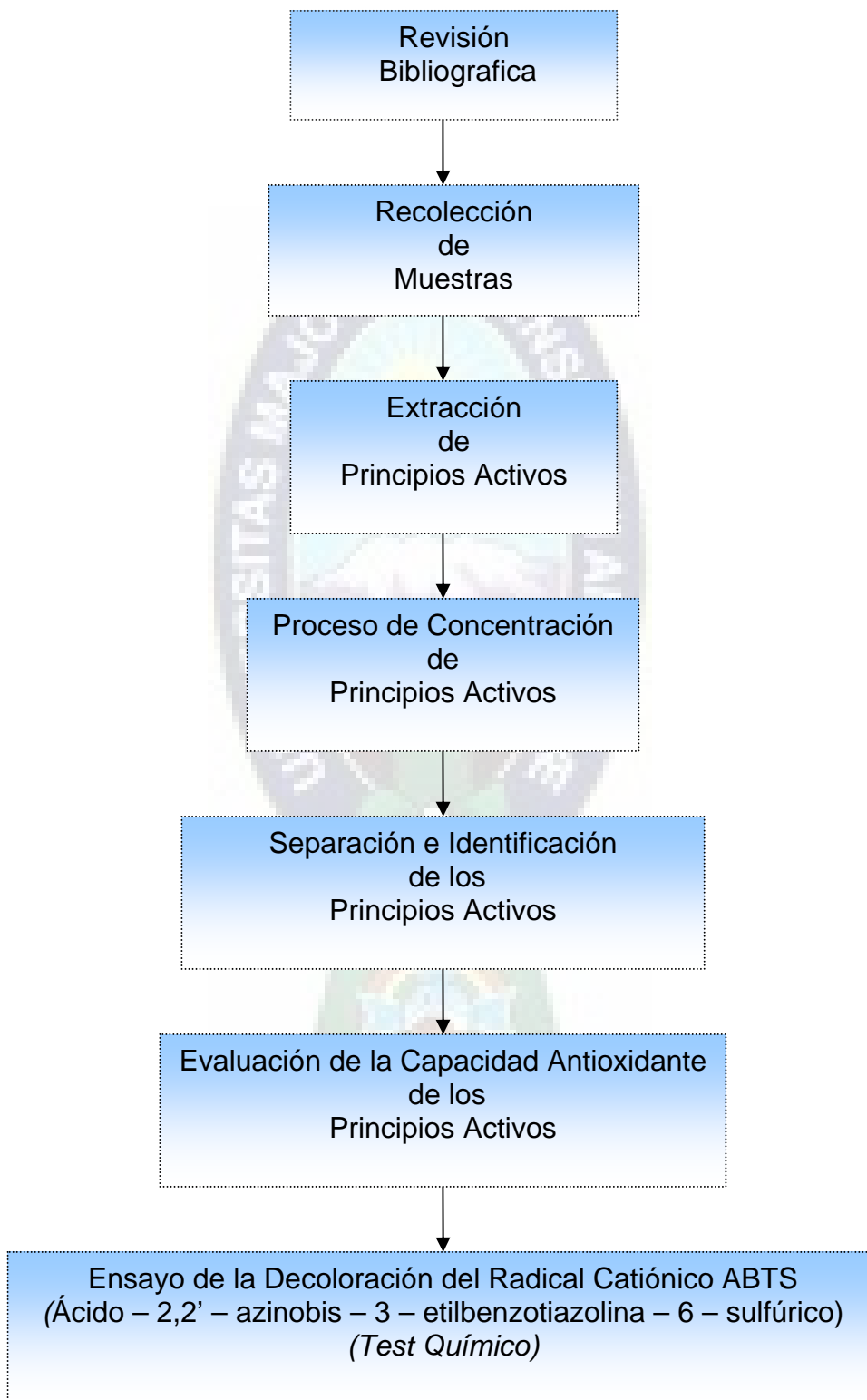
6. 2. 2. EXCLUSIÓN

- ♣ Todo principio activo aislado de las especies vegetales *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel y *Stereocaulon ramulosum* Rausch, que no cumpla con la actividad antioxidante.
- ♣ Todo preparado galénico que no cumpla con la pruebas de estabilidad.
- ♣ Todo animal de experimentación (Conejo) que no haya sido criado en las mismas condiciones.



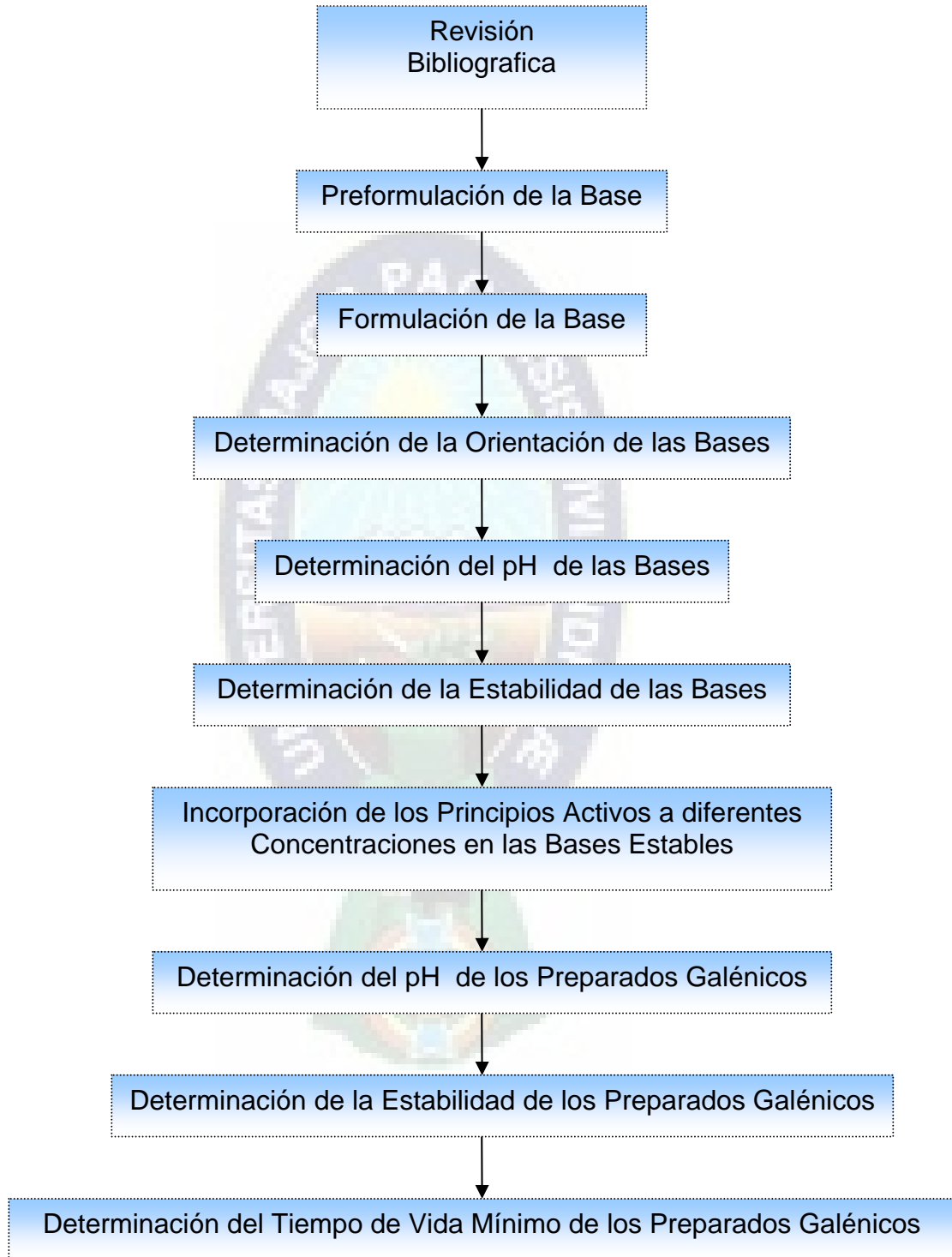
7. DISEÑO METODOLOGICO

ACTIVIDAD FITOQUÍMICA



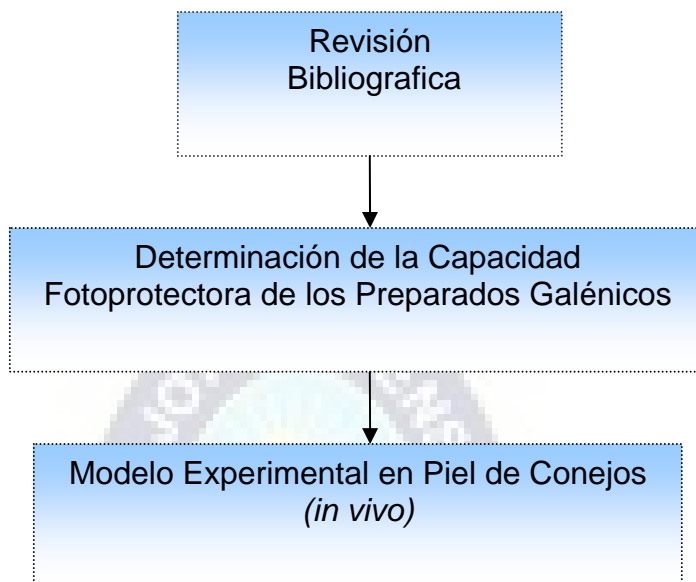


ACTIVIDAD GALÉNICA





ACTIVIDAD BIOLÓGICA





8. MATERIAL

8. 1. MATERIAL FITOQUÍMICO

8. 1. 1. MATERIAL FUNGIBLE

- ♣ Bolsas de Nylon
- ♣ Cromatoplasmas de Silicagel 60 F – 254. (RIEDEL HAËN)
- ♣ Filtros Membrana 0,2 μm
- ♣ Frascos de Vidrio (1.000 mL, 2.000 mL)
- ♣ Gasa
- ♣ Guantes de Goma
- ♣ Goteros
- ♣ Gradilla para Tubos de Ensayo
- ♣ Papel Aluminio
- ♣ Papel Filtro 0,2 nominal
- ♣ Parafilm
- ♣ Tubos Capilares
- ♣ Viales (5 mL)

8. 1. 2. MATERIAL NO FUNGIBLE

- ♣ Aros y Pinzas
- ♣ Balones de Fondo Redondo (50 mL, 100 mL, 250 mL, 500 mL, 1.000 mL)
- ♣ Columnas Abiertas, Cerradas, Sephadex (10 x 60 cm.)
- ♣ Embudos Corriente de Vástago Corto
- ♣ Embudos Corriente con Fritas
- ♣ Espátulas
- ♣ Kitasatos (50 mL, 100 mL, 250 mL, 500 mL)
- ♣ Matraces Erlenmeyer (50 mL, 100 mL, 250 mL, 500 mL)
- ♣ Morteros
- ♣ Pizetas
- ♣ Pinzas
- ♣ Pipetas (0,1 mL, 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL)
- ♣ Pipetas Pasteur
- ♣ Probetas (50 mL, 100 mL, 500 mL)
- ♣ Propipetas
- ♣ Termómetros (0 °C – 200 °C)
- ♣ Tubos de Ensayo (10 x 100 mm)
- ♣ Vasos de Precipitado (25 mL, 50 mL, 100 mL, 250 mL, 500 mL, 1.000 mL)
- ♣ Varillas de Vidrio (25 cm.)

8. 1. 3. REACTIVOS

- ♣ Acetato de etilo p. a. (E. Merck) y Comercial
- ♣ Acetona p. a. (E. Merck)
- ♣ Ácido Acético (q. p.)



- ♣ Ácido Perlatolico Patrón (I. I. Q.)
- ♣ Ácido Sulfúrico Concentrado p. a. (FLUKA AG)
- ♣ Agua Destilada
- ♣ PAE – 03 Patrón (I. I. Q.)
- ♣ PAE – 17 Patrón (I. I. Q.)
- ♣ Amoniacó (q. p.)
- ♣ Atranorina Patrón (I. I. Q.)
- ♣ Butanol (E. Merck)
- ♣ Diclorometano (q. p.)
- ♣ Etanol al 95% Comercial
- ♣ Éter de Petróleo (q. p.)
- ♣ Gel de Sílice (RIEDEL DE HAËN)
- ♣ Metanol (q. p.)
- ♣ Tetracloruro de Carbono (q. p.)

8. 1. 4. SOLUCIONES DE TRABAJO

- ♣ Mezcla 1: Éter de Petróleo (20 – 40 / 40 – 60)
- ♣ Mezcla 2: Etanol y Agua (70 / 30)
- ♣ Mezcla 3: Acetato de etilo Destilado
- ♣ 1^o Sistema Solventes: Acetato de etilo / Metanol (3:2)
- ♣ 2^o Sistema Solventes: Acetato de etilo
- ♣ 3^o Sistema Solventes: Agua / Butanol / Ácido Acético (1:3:1)
- ♣ 4^o Sistema Solventes: Acetato de etilo / Éter de Petróleo (1:1)
- ♣ 5^o Sistema Solventes: Acetato de etilo / Diclorometano (7:3)
- ♣ REVELADOR A: Ácido Sulfúrico al 5 % v / v
- ♣ REVELADOR B: Vainillina / Ácido Clorhídrico al 2,5 %
- ♣ REVELADOR C: DPPH al 0,2 %

8. 1. 5. EQUIPOS

- ♣ Balanza Analítica, Modelo Metler H
- ♣ Bomba de Vacío, Modelo Vacuum bland de membrana teflón (Rv 0,5 st)
- ♣ Cámaras para el Desarrollo Cromatográfico
- ♣ Estufa de Secado, PRECISION SCIENTIFIC Co. Modelo 16
- ♣ Hornillas con rejillas de amiento
- ♣ Lámpara de Luz Ultravioleta, Modelo Spectroline®, Longlife TM, Filter the 254 – 365 nm
- ♣ Liofilizador
- ♣ Refrigerador, Modelo Forma Scientific, Enviro – Scan™
- ♣ Rotaevaporador, Modelo Buche RE 111
- ♣ Trituradora / Moledora, Modelo Nacional
- ♣ Ultrasonido, Modelo Gole – Parmer Instrument Co, Ultrasonic Homogenizer, Serie 4.710



8. 2. MATERIAL GALÉNICO

8. 2. 1. MATERIAL FUNGIBLE

- ♣ Guantes de Goma
- ♣ Gotero
- ♣ Gradilla para Tubos
- ♣ Papel Aluminio
- ♣ Parafilm
- ♣ Recipientes de plástico

8. 2. 2. MATERIAL NO FUNGIBLE

- ♣ Espátula
- ♣ Termómetro (0 °C – 200 °C)
- ♣ Tubos de Ensayo (10 x 100 mm)
- ♣ Varilla de Vidrio (25 cm.)
- ♣ Vasos de Precipitado (25 mL, 50 mL, 100 mL, 250 mL)
- ♣ Vidrios de Reloj ($\phi = 5$ cm.)

8. 2. 3. REACTIVOS

- ♣ Agua Destilada
- ♣ Alcohol Cetílico (F. D.)
- ♣ Cera Blanca (F. D.)
- ♣ Nipagin (F. D.)
- ♣ Nipasol (F. D.)
- ♣ Propilenglicol (F. D.)
- ♣ Texapón (F. D.)

* (F. D.)= Excipientes y Auxiliares de formulación proporcionados por el Dr. Freddy Salazar.

8. 2. 4. SOLUCIONES DE TRABAJO

- ♣ Solución de Azul de metileno al 2 %
- ♣ Solución Saturada de Cloruro de Sodio
- ♣ Sudan III, en propilenglicol al 2%

8. 2. 5. EQUIPOS

- ♣ Balanza Analítica, Modelo Metler H
- ♣ Baño Maria
- ♣ Estufa, Modelo Nicht drehen
- ♣ Hornillas con rejillas de amiento
- ♣ Microcentrifugadora, Modelo ecys, Modelo UVIO, Serie 4.823.
- ♣ Microscopio
- ♣ Peachimetro, Modelo Beckman, pH Meter ϕ 31
- ♣ Refrigerador, Modelo Forma Scientific, Enviro – Scan TM



8. 3. MATERIAL BIOLÓGICO

8. 3. 1. MATERIAL FUNGIBLE

- ♣ Algodón
- ♣ Ependorfs
- ♣ Filtro 0,2 μm
- ♣ Gradilla para Ependorfs
- ♣ Guantes de Goma
- ♣ Jeringas (1 mL, 5 mL)
- ♣ Papel Aluminio
- ♣ Parafilm

8. 3. 2. MATERIAL NO FUNGIBLE

- ♣ Embudo Buchner
- ♣ Equipo de Disección
- ♣ Kitasato de 1.000 mL
- ♣ Micropipetas (20 mL, 50 mL, 200 mL, 1.000 mL)
- ♣ Pipeta (5 mL)
- ♣ Pizeta
- ♣ Placas de Lectura para Espectrofotometría
- ♣ Probeta de (500 mL, 1.000 mL)
- ♣ Propipeta
- ♣ Vasos de Precipitado (50 mL, 100 mL, 1.000 mL)

8. 3. 3. REACTIVO BIOLÓGICO

- ♣ 4 Conejos machos, de la raza Neozelandes, Exocriados, Convencionales. Con un peso promedio de 3 kilos.

8. 3. 4. REACTIVOS

- ♣ ABTS (SIGMA® ALDRICH)
- ♣ Acetato de Sodio Trihidratado (J. T. BAKER ANALYZED® A. C. S. Reagent)
- ♣ Acetonitrilo (HPLC)
- ♣ Ácido Acético Glacial (Mallinckrodt AR® Analytical Reagent)
- ♣ Ácido Cítrico Monohidratado (J. T. BAKER ANALYZED® A. C. S. Reagent)
- ♣ Ácido 2, 3 – Dihidroxi Benzoico (SIGMA® ALDRICH)
- ♣ Agua Destilada y Desionizada
- ♣ DMSO (J. T. BAKER ANALYZED® A.C.S. Reagent)
- ♣ EDTA Disódico Dihidratado (J. T. BAKER ANALYZED® A. C. S. Reagent)
- ♣ Lidocaina Clorhidrato 4% (Spray – XYLO – EFA)
- ♣ Octil Sulfato de Sodio (SIGMA® ALDRICH)
- ♣ p – cloro – m – xilenol (Espadol)
- ♣ Persulfato de Amonio (Pro análisis Merck)
- ♣ Salicilato de Sodio (Pro análisis Merck)



8. 3. 5. SOLUCIONES DE TRABAJO

- ♣ Solución de Ácido Perclórico (1 M)
- ♣ Solución Buffer de Fosfato, (PBS: 5mM, pH = 7,4)

8. 3. 6. EQUIPOS

- ♣ Agitador Magnético, Modelo 15, Arthur. H. Thomas Co, Philadelphia, P A., USA
- ♣ Balanza Analítica, Modelo BP – 210S Sartorius
- ♣ Bomba de Vacío, Modelo WP – 45, Handy Aspirator, Yamato k 724
- ♣ Bortex, Modelo Heidolph Top – Mix 94.323 Bioblock Scientific Germany
- ♣ Centrifugadora, Modelo Sigma 2K15, D – 37520 Osterode am Harz, Germany
- ♣ Equipo de HPLC, con detector Electroquímico, Modelo BAS liquid Chromatography CC – 4; Amperometric Detector LC – 4C; Solvent Delivery System PM – 80; Columna C-18 column (Biophase; 22 cm. x 4,6 mm; 5 μ m)
- ♣ Equipo Generador de Agua Destilada, Modelo Prima 90, USF – Elga, Max 6,2 / 90
- ♣ Espectrofotómetro de Celdas, Modelo DYNEX, Technologies. Inc. 14.340. Sullyfield. Circle Chantilly VA: 20.151
- ♣ Lámpara de Luz Ultravioleta, Modelo Spectroline®, Longlife TM, Filter the 254 – 365 nm
- ♣ Peachimetro, Modelo Beckman, pH Meter ϕ 31
- ♣ Sonicador, Modelo Gole – Parmer Instrument Co, Ultrasonic Homogenizer, Serie 4.710



9. METODOS

9. 1. INVESTIGACIÓN FITOQUIMICA

9. 1. 1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

9. 1. 1. 1. RECOLECCIÓN DE LA PLANTA *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel

El material vegetal fue colectado en la región de la Cuenca del Lago Poopo en el departamento de Oruro. La época del año en que se realizó la recolección fue en invierno. ⁽⁶¹⁾

9. 1. 1. 2. RECOLECCIÓN DEL LIQUEN *Stereocaulon ramulosum* Rausch

La recolección del material vegetal se realizó en la localidad Pongo, cerca al lugar llamado (La Cumbre), a 35 Km, sobre la carretera de la ciudad de La Paz hacia los Yungas. El sitio de recolección se halla a una altitud aproximada de 4.200 m. s. n. m. La recolección de la muestra fue durante la época de invierno. ⁽⁸⁹⁾

9. 1. 2. EXTRACCIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS

9. 1. 2. 1. MACERACIÓN DE LA PLANTA *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel

El material vegetal fue secado a temperatura ambiente y molido, posteriormente se separó los tallos de las hojas, pesándose una cantidad seca de 500 g de tallos [AE – (T)] y 500 g de hojas [AE – (H)], para someterlas a una extracción con 1.5 L de la mezcla 1, por un lapso de tres días cambiando el solvente cada 24 Hrs.

Posteriormente los residuos de los materiales vegetales, se sometieron a una segunda extracción con 1.5 L de la mezcla 2, por un lapso de tres días cambiando el solvente cada 24 Hrs. ⁽⁶¹⁾

9. 1. 2. 2. MACERACIÓN DEL LIQUEN *Stereocaulon ramulosum* Rausch

Se pesó una cantidad de 500 g de la muestra vegetal seca y molido, para someterla a una extracción con 1.5 L de la mezcla 3, por un lapso de tres días cambiando el solvente cada 24 Hrs. ⁽⁸⁹⁾



9. 1. 3. PROCESO DE CONCENTRACIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS

9. 1. 3. 1. PROCESO DE CONCENTRACIÓN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS DE *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel

Los extractos de AE – (T) y AE – (H) obtenidos con la mezcla 2, se filtraron y concentraron en un rotavapor a presión reducida hasta semisequedad, realizándose al vacío y temperatura controlada. ⁽⁶¹⁾

9. 1. 3. 2. PROCESO DE CONCENTRACIÓN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS DE *Stereocaulon ramulosum* Rausch

El sobrenadante de la maceración del extracto de la muestra obtenido con la mezcla 3, se procedió a filtrarlo y posteriormente concentrarlo en un rotavapor a presión reducida hasta semisequedad, realizándose al vacío y temperatura controlada. ⁽⁸⁹⁾

9. 1. 4. SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS

9. 1. 4. 1. SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS DE *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel

Los extractos de AE – (T) y AE – (H) de la mezcla 1, y los extractos de AE – (T) y AE – (H) de la mezcla 2 fueron analizadas usando una TLC con el 1^{er} sistema de solventes y comparadas con los patrones **PAE – 03**, **PAE – 17**. Para su revelado se utilizo una lámpara de luz UV (254 nm), de igual manera fueron visualizadas con los reveladores A, B, C.

Mediante la Información que nos muestran las placas cromatograficas realizadas, los extractos de AE – (T) y AE – (H) de la mezcla 2 y los patrones **PAE – 03**, **PAE – 17**, presentan el mismo razón de frente, indicándonos que contienen principios antioxidantes / fotoprotectores, similares.

La prueba de DPPH, mostró que los extractos de AE – (T) y AE – (H) de la mezcla 2, contienen los mismos principios antioxidantes / fotoprotectores que los patrones **PAE – 03** y **PAE – 17**.

Los concentrados de AE – (T) y AE – (H) de la mezcla 2, se dejaron reposar a temperatura de refrigeración durante un día, obteniéndose dos fases que se separaron por filtración:

- ♠ Soluciones de AE – (T)¹ y AE – (H)¹.
- ♠ Precipitados de **AE – (T)²** y **AE – (H)²**, que se resuspendieron en una solución de Acetato de Etilo.



Se preparo el 1^{er} sistema de solventes en la cámara cromatografica para las siguientes muestras:

PATRON PAE – 03	AE – (T)	AE – (T) ¹	AE – (T)²
PATRON PAE – 17	AE – (H)	AE – (H) ¹	AE – (H)²

Las muestras fueron comparadas con los patrones: **PAE – 03**, **PAE – 17**. Para su revelado, se utilizo una lámpara de luz UV (254 nm), de igual manera fueron visualizadas con los reveladores A, B, C.

Mediante la placa cromatografica realizada, las muestras **AE – (T)²** y **AE – (H)²**, presentaron el mismo Razón de frente, con respecto a los patrones **PAE – 03** y **PAE – 17**.

La prueba de DPPH, mostró que los extractos **AE – (T)²** y **AE – (H)²**, contienen los mismos principios antioxidantes que los patrones **PAE – 03** y **PAE – 17**.

Los extractos **AE – (T)²** y **AE – (H)²**, se unen por la información presentada por los Rf de las muestras con respecto a los patrones y por la prueba de DPPH realizada.

La mezcla de las fracciones **AE – (T)²** y **AE – (H)²** fue separada usando una columna VLC, utilizando como fase móvil mezclas de éter de petróleo / acetato de etilo / metanol, en orden creciente de polaridad. Obteniéndose 28 fracciones.

Las fracciones de este proceso de cromatografía fueron analizadas usando una TLC, con el 2^{do} sistema de solventes para las fracciones de F – 1 a F – 13 y el 3^{er} sistema de solventes para las fracciones F – 14 a F – 28, todas las fracciones fueron comparadas con los patrones **PAE – 03**, **PAE – 17**. Como reveladores se utilizaron B, C.

La razón de frente que nos muestran las placas cromatograficas y la prueba de DPPH, realizadas se unieron las siguientes fracciones:

1 = 1, 2, 3.	7 = 13.
2 = 4, 5.	8 = 14,15.
3 = 6, 7.	9 = 16,17.
4 = 8.	10 = 18,19.
5 = 9.	11 = 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27.
6 = 10, 11, 12.	12 = 28.

En las fracciones F – 1 a F – 12, después de 24 hrs., se formaron precipitados, que fueron separados por filtración. Obteniéndose las siguientes muestras.



- ♣ Soluciones de 1^a, 2^a, 3^a, 4^a, 5^a, 6^a, 7^a, 8^a, 9^a, 10^a, 11^a, 12^a.
- ♣ Precipitados de 1^b, 2^b, 3^b, 4^b, 5^b, 6^b, 7^b, 8^b, 9^b, 10^b, 11^b, 12^b, que se resuspendieron en una solución de Acetato de Etilo.

Todas las muestras fueron cromatografiadas utilizando el 4^{to} sistema de solventes y comparadas con los patrones **PAE – 03**, **PAE – 17**. Utilizándose como reveladores A, B, C.

El análisis de la placa cromatografica considera que las fracciones **8^b** y **9^b** presentan el mismo Razón de frente que los patrones **PAE – 03**, **PAE – 17**.

La prueba de DPPH, mostró que las fracciones **8^b** y **9^b** contienen los mismos principios antioxidantes / fotoprotectores, que los patrones **PAE – 03** y **PAE – 17**.

Las fracciones **8^b** y **9^b**, se unen por la información que presento por los R_f de ambas con respecto a los patrones y por la prueba de DPPH realizada.

La mezcla **AE – 5 (fracción 8^b y fracción 9^b)** fue fraccionada usando una columna de exclusión molecular con Sephadex LH – 20, utilizando metanol como eluente. Obteniéndose 5 fracciones.

Las fracciones de este proceso de cromatografía fueron analizadas usando una TLC con el 4^{to} sistema de solventes, todas las fracciones fueron comparadas con los patrones **PAE – 03**, **PAE – 17**. Para su revelado se utilizaron B, C.

Mediante la información que nos muestran las placas cromatograficas realizadas, las fracciones **3** y **4** presentan el mismo Razón de frente que los patrones **PAE – 03**, **PAE – 17**.

La prueba de DPPH, mostró que las fracciones **3** y **4**, contienen los mismos principios antioxidantes que los patrones **PAE – 03** y **PAE – 17**.

Las fracciones **3** y **4**, se unieron por la información presentada por los R_f de ambas con respecto a los patrones y por la prueba de DPPH realizada.

La mezcla **AEF – 8 (fracción 3 y fracción 4)**, fue fraccionada mediante una columna abierta usando mezclas de acetato de etilo / metanol, en orden creciente de polaridad obteniéndose 5 fracciones.



Se preparo el 2^{do} sistema de solventes en la cámara cromatografica para las fracciones obtenidas por la columna abierta. Todas las muestras fueron comparadas con los patrones **PAE – 03**, **PAE – 17**. Para su revelado, se utilizo una lámpara de luz UV (254 nm), como también los reveladores B, C.

Mediante la información que nos muestran las placas cromatograficas realizadas, las fracciones **2** y **3** presentaron el mismo Razón de frente que los patrones **PAE – 03**, **PAE – 17**.

La prueba de DPPH, mostró que las fracciones **2** y **3**, contenían los mismos principios antioxidantes que los patrones **PAE – 03** y **PAE – 17**.

Las fracciones **2** y **3**, son las que nos interesan por la información presentada por los R_f de ambas con respecto a los patrones y por la prueba de DPPH realizada.

Las fracciones se dejaron reposar durante un día, obteniéndose dos fases en la fracción **2**, que se llegaron a separar por centrifugación, obteniéndose;

- ♣ Solución de **2^a** (**AE – 3**), que se procedió a concentrarlo, a semisequedad.
- ♣ Precipitado de **2^b** (**AE – 2**).

La fracción **3** (**AE – 1**), se procedió a concentrarlo, a semisequedad.
(61)

9. 1. 4. 2. SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS DE *Stereocaulon ramulosum* Rausch

La solución concentrada, se dejo reposar a temperatura de refrigeración por el lapso de un día. Observándose dos fases que se separaron por filtración obteniéndose:

- ♣ Residuo (**SR – 1**).
- ♣ Solución.

La solución se calentó ligeramente a Baño Maria, y se dejo enfriar a medio ambiente, observándose la presencia de cristales que se separaron por filtración, obteniéndose:

- ♣ Residuo (**SR – 2**).
- ♣ Solución.



La solución, se procedió a concentrarla en un rotavapor a presión reducida hasta semisequedad, esto se realizo al vacío y temperatura controlada.

Posteriormente se resuspendió en Metanol y se llevo a concentrarlo mediante un rotavapor a presión reducida hasta semisequedad, esto se realizo al vacío y temperatura controlada.

La muestra, se procedió a fraccionarla por medio de una columna Cerrada utilizándose los siguientes solventes como fase móvil:

- ♣ Fase inicial: Diclorometano, el cual separo 2 fracciones de la muestra.
- ♣ Segunda fase: Diclorometano / Acetato de Etilo (7:3), que llego a separar 2 fracciones de la muestra.
- ♣ Tercera fase: Acetato de Etilo, el cual separo 1 fracción de la muestra.

Las fracciones fueron cromatografiadas usando el 5^{to} sistema de solventes y comparadas con los patrones de **Atranorina** y **Ácido Perlatolico**. Todas las muestras fueron visualizadas con el revelador con A.

Mediante la información de la placa cromatografica realizada, las fracciones **3** y **4** revelaron la presencia del mismo producto (**SR – 3**), con respecto al patrón de **Ácido Perlatolico**.

La prueba de DPPH, mostró que las fracciones **3** y **4** contenían los mismos principios antioxidantes / fotoprotectores, que el patrón de **Ácido Perlatolico**.

Las fracciones **3** y **4**, se unieron por la información presentada por los Rf de ambas con respecto al patrón y por la prueba de DPPH realizada.

La mezcla **SR – 3 (fracciones 3 y fracción 4)**, se llevo a baño de Agua, resuspendiéndolo posteriormente en Acetona / Etanol (1:1), y enfriarlo a medio ambiente para luego filtrarlo por gravedad, obteniéndose:

- ♣ Residuo (**Ácido Perlatolico**)⁽⁸⁹⁾



9. 1. 5. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS

9. 1. 5. 1. ENSAYO DE LA DECOLORACIÓN DEL RADICAL CATIONICO ABTS (Ácido – 2,2' – azinobis – 3 – etilbenzotiazolina – 6 – sulfúrico) (TEST QUIMICO)

Método que permitió evaluar la capacidad antioxidante de las moléculas que se encontraban en las distintas fracciones separadas de las especies vegetales *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel y *Stereocaulon ramulosum* Rausch.

El radical monocatiónico ABTS⁺ generado por la reacción de oxidación del ABTS con persulfato de amonio.

El radical monocatiónico ABTS⁺ es reducido a ABTS – H⁺, por la presencia de metabolitos en las fracciones separadas de las especies vegetales, que presentan la capacidad scavengers.⁽⁷⁸⁾

A 5ml de una solución de ABTS (7 mM) se le agrego 88 µL de una solución de persulfato de amonio (140 mM), la preparación se dejo en un lugar oscuro a temperatura ambiente durante 12 – 16 hrs., tiempo necesario para la formación estable del radical. Pasado este tiempo la mezcla se filtra.

La solución de trabajo se preparo diluyendo 1 mL de la mezcla anterior en 40 mL de buffer PBS (Solución Buffer Fosfato). A 1ml de una solución de ABTS⁺ se le agrego 10 µL de la muestra a analizar diluido en DMSO (Dimetil sulfóxido), a una determinada concentración por triplicado, teniendo como control DMSO.

Se espera un lapso de 4 minutos, para que la reacción termine. Se procedió a colocar en cada una de las celdas 200 µL de las soluciones anteriores, teniendo como blanco PBS. Para luego leer en el Espectrofotómetro de Celdas a una longitud de 750 nm.

Este procedimiento se realizo con cada una de las fracciones de las muestras y a diferentes concentraciones. Los resultados son expresados como Porcentaje de Inhibición.⁽⁷⁶⁾



9. 2. INVESTIGACIÓN GALÉNICA

9. 2. 1. PREFORMULACIÓN DE LA BASE

La preformulación de la base fue planteada a raíz de la investigación sistemática de las propiedades físicas y químicas de los principios activos solos y en combinación con los auxiliares de formulación.

En la etapa primaria el desarrollo de la base comprendió los siguientes aspectos:

- ♣ Estudio de los auxiliares de formulación de cremas existentes en el mercado: Sundown FSP – 30, Crema de Marcela, Emulsión de Nívea. Como referencia para estandarizar los componentes esenciales para una base.
- ♣ Estudio de la compatibilidad del principio, con los auxiliares de la formulación elegidos.
- ♣ Tipo de descomposición (hidrólisis, oxidación, reducción, racemización, etc.)
- ♣ Efecto de pH, e interacciones moleculares.
- ♣ Efecto del medio ambiente (humedad, temperatura, luz).
- ♣ Estudios forzados de degradación en diferentes formas.

La base que se empleo es una crema fría, (cold – cream), una de las cremas mas antiguas. El cold – cream, es una emulsión de agua en aceite A/O, cuya estabilidad esta garantizada por el porcentaje relativamente alto de la fase oleosa, con relación a la fase acuosa.

Los componentes necesarios para la elaboración de una base tipo cold – cream, se dividen en tres fases.

FASE I	Componentes Lipofílicos
FASE II	Componentes Hidrofilicos
FASE III	Conservadores

9. 2. 2. FORMULACIÓN DE LA BASE

Se procedió a elaborar un stock de 13 bases neutras tipo cold – cream, variando las proporciones de cada uno de los componentes, de una base neutra, para proceder a las diferentes pruebas.



Las preparaciones se efectuaron del siguiente modo:

- ♣ Se peso por separado y en vasos tarados las fases I y II.
- ♣ En baño maría se fundió a una temperatura de 70 – 80 °C, la fase II.
- ♣ La fase I se calentó a una temperatura de 75 – 85 °C y se añadió la fase III para que se disuelvan los conservadores.
- ♣ Una vez preparadas ambas fases se procedió a añadir la fase II a la fase I y se agito hasta su enfriamiento.

Las bases elaboradas se conservaron en recipientes, que cierran herméticamente, para sus posteriores pruebas.

9. 2. 3. DETERMINACION DE LA ORIENTACIÓN DE LAS BASES

9. 2. 3. 1. PRUEBA DE DILUCIÓN

Se coloco en un vaso de precipitado aproximadamente 50 mL de agua destilada y se añadió una gota de la base, procediéndose a agitar, de ser solubles se indica que son O/A, caso contrario serán A/O.

Esta prueba se realizo con cada una de las bases elaboradas.

9. 2. 3. 2. PRUEBA DE SOLUBILIDAD DE UN COLORANTE

Se coloco en un tubo de ensayo una pequeña cantidad de la base y se añadió unas gotas de una solución de Azul de metileno al 2%. Si el colorante es captado por la fase continua, se indica que es O/A, de no ser así será A/O.

Para la contraprueba en un tubo de ensayo se coloco una pequeña cantidad de la base y se añade unas gotas de una solución oleosa de Sudan III al 2%. Si el colorante es captado por la fase continua, se indica que es A/O, de no ser así será O/A.

Ambas pruebas se realizaron con cada una de las bases elaboradas.

9. 2. 4. DETERMINACIÓN DEL pH DE LAS BASES

El control de pH, es esencial para asegurar la estabilidad después de la preparación de la base neutra tipo cold – cream, como también de productos medicinales naturales terminados.

Se coloco en un vaso de precipitado aproximadamente 10 g de la base y se procedió a medir su pH, que debía estar dentro de un rango promedio de 5,50 que es el pH fisiológico cercano de la piel.

Esta prueba se realizo por triplicado con cada una de las bases elaboradas.



9. 2. 5. DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LAS BASES

Se procedió a verificar la estabilidad de la misma por los siguientes métodos:

9. 2. 5. 1. VARIACIÓN DE TEMPERATURA

La base preparada se procedió a dividirlo, en tres partes iguales, y se vaciaron en recipientes de vidrio.

9. 2. 5. 1. 1. TEMPERATURA AMBIENTE ILUMINADO

El primer recipiente que contiene la base se colocó, en un lugar húmedo y con exposición al sol, por espacio de 10 días. Para luego observar a trasluz algún precipitado o variación de color u olor.

Posteriormente se centrifugó por espacio de 30 minutos a 3.000 r. p. m., buscando la presencia de precipitación (De existirlo, se tomó una pequeña fracción y se observó en el microscopio para determinar si era de naturaleza química o microbiana).

Esta prueba se realizó con cada una de las bases elaboradas.

9. 2. 5. 1. 2. TEMPERATURA ELEVADA

En una estufa programada a 42 °C; se colocó el segundo recipiente que contenía la base, y cada 24 horas se observó la formación de algún precipitado o variación de color, olor. En caso de existir sedimento se tomó una fracción y se observó al microscopio. Realizando este seguimiento un lapso de 10 días.

Posteriormente se centrifugó por espacio de 30 minutos a 3.000 r. p. m., buscando la presencia de algún tipo de precipitado.

Esta prueba se realizó con cada una de las bases elaboradas.

9. 2. 5. 1. 3. TEMPERATURA DE REFRIGERACIÓN DE 0 A 4 °C

Se procedió de igual forma que los dos anteriores; con el tercer recipiente, realizando el seguimiento por espacio de 10 días, con cada una de las bases elaboradas.

9. 2. 5. 2. METODO DE CENTRIFUGACIÓN

La base elaborada se centrifugó por espacio de 30 minutos a 3.000 r. p. m., a una temperatura entre 20 °C y 40 °C, al finalizar se observó a trasluz la formación de algún precipitado o variación de color u olor. En caso de existir sedimento se tomó una fracción para ser observado en el microscopio.

Este método se realizó para cada una de las bases estables.



9. 2. 6. INCORPORACION DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES EN LAS BASES ESTABLES

Se colocó en recipientes de vidrio 10 g de la base estable, y se adicionó a cada uno de ellos el principio activo de AE – 2 en las concentraciones de 2%, 5%, y 10%, de igual manera se procedió con el principio activo de Ácido Perlatólico. Se dejaron en reposo por un espacio de 10 días. Luego de los cuales se observó a trasluz algún precipitado o variación de color u olor.

Posteriormente se centrifugaron por espacio de 30 minutos a 3.000 r. p. m., buscando algún tipo de precipitación (De existirlo, se tomó una pequeña fracción y se observó en el microscopio para determinar si era de naturaleza química o microbiana).

Este método se realizó para cada una de las bases estables.

9. 2. 7. DETERMINACIÓN DEL pH DE LOS PREPARADOS GALÉNICOS

Se colocó en un vaso de precipitado aproximadamente 10 g del preparado galénico y se procede a medir su pH, que deberá estar dentro de un rango de 5,50 aproximadamente que es el pH fisiológico de la piel.

Esta prueba se realizó por triplicado con cada uno de los preparados galénicos elaborados.

9. 2. 8. DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LOS PREPARADOS GALÉNICOS

Se procedió a verificar la estabilidad de la misma por los siguientes métodos:

9. 2. 8. 1. VARIACIÓN DE TEMPERATURA

El preparado galénico se procedió a dividirlo, en tres partes iguales, y se vaciaron en recipientes de vidrio.

9. 2. 8. 1. 1. TEMPERATURA AMBIENTE ILUMINADO

Se colocó el primer recipiente que contiene el preparado, en un lugar húmedo y con exposición al sol, por espacio de 10 días. Luego de los cuales se observó a trasluz algún precipitado o variación de color u olor.

Posteriormente se centrifugó por espacio de 30 minutos a 3.000 r. p. m., buscando la presencia de precipitación (De existirlo, se tomó una pequeña fracción y se observó en el microscopio para determinar si era de naturaleza química o microbiana).

Esta prueba se realizó con cada uno de los preparados de elaborados.



9. 2. 8. 1. 2. TEMPERATURA ELEVADA

En una estufa programada a 42 °C; se colocó el segundo recipiente que contiene el preparado, y cada 24 horas se observó a trasluz la formación de algún precipitado o variación de color u olor.

En caso de existir sedimento se tomó una fracción y se observó al microscopio. Realizándose este seguimiento por el lapso de 10 días.

Posteriormente se centrifugó por espacio de 30 minutos a 3.000 r. p. m., buscando la presencia de algún tipo de precipitado.

Esta prueba se realizó con cada una de los preparados elaborados.

9. 2. 8. 1. 3. TEMPERATURA DE REFRIGERACIÓN DE 0 A 4 °C

Se procedió de igual forma que los dos anteriores; con el tercer recipiente, realizando el seguimiento por espacio de 10 días, con cada uno de los preparados elaborados.

9. 2. 8. 2. METODO DE CENTRIFUGACIÓN

El preparado elaborado se centrifugó por espacio de 30 minutos a 3.000 r. p. m., a una temperatura entre 20 °C y 40 °C, al finalizar se observó a trasluz la formación de algún precipitado o variación de color u olor. En caso de existir sedimento se tomó una fracción para ser observado en el microscopio.

Este método se realizó para cada uno de los preparados elaborados.

9. 2. 9. DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE VIDA MÍNIMO DE LOS PREPARADOS GALÉNICOS TERMINADOS

Es una prueba que propone el tiempo en el cual se presenta la caducidad del preparado galénico, así se determinó el efecto del calor y la humedad sobre el preparado o sobre el principio activo mismo. También es un indicador de la forma de almacenamiento.

Se colocó la muestra en tres viales (5 g) en una estufa de 40 °C; junto con un frasco de 1.000 mL de solución acuosa saturada de cloruro de sodio que proporcione un porcentaje de humedad relativa del aire por encima de la solución de 76% de cloruro de sodio, simulando condiciones de una zona geográfica muy caliente y húmeda (trópico) por espacio de un mes.

Se realizaron observaciones diarias en este tiempo, en especial las características organolépticas, o físicas.



9. 3. INVESTIGACIÓN BIOLÓGICA

9. 3. 1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se utilizaron 4 conejos machos Neozelandes de un promedio de 3 kilos de peso corporal, obtenidos del bioterio del Instituto de Higiene de la Facultad de Medicina de La Republica Oriental de Uruguay, mantenidos de acuerdo a las normas internacionales dadas por el National Institute of Health (publicación 85 – 23, revisión 1985) con agua y alimento (Champion Nutricion Animal, Santiago, Chile) proporcionados *ad libitum*.

9. 3. 2. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD FOTOPROTECTORA DE LOS PREPARADOS GALÉNICOS

9. 3. 2. 1. MODELO EXPERIMENTAL EN PIEL DE CONEJOS (*IN VIVO*)

Se ha descrito que la radiación UV induce la formación de radicales OH en la piel expuesta. La vida media de estos radicales es muy corta lo que dificulta su medida. Para resolver este problema se utilizó el método de hidroxilación del salicilato determinándose la cantidad de ácido 2,3 dihidroxi Benzoico por HPLC.

Se procedió a elaborar 4 cuadrantes simétricos de 5 x 5 cm., a nivel del dorso del conejo utilizando una maquina de afeitar. El tratamiento para cada uno de ellos fue respectivamente; Control (sin UV), UV, UV/base, UV/crema, una vez elaborados los cuadrantes en el conejo, se espero un lapso de 24 horas, para que la piel se recupere de la agresión mecánica.

Pasado el tiempo se procedió a aplicar de manera homogénea 1g de la crema al 5%, 1g de la base (B¹³) en los cuadrantes correspondientes.

Realizado la aplicación se procedió a colocar Lidocaina Clorhidrato al 4% en spray, para posteriormente inyectar 0,7 mL de una solución de Salicilato de Sodio (1mg / mL), vía subcutánea. Inmediatamente se procedió a irradiar los 3 cuadrantes con luz ultravioleta a una longitud de onda de 254 – 365 nm, por el lapso de una hora.

Terminado la exposición de radiación se procede a tomar 3 muestras de piel de cada cuadrante con ayuda de un equipo de disección, previa realización de la anestesia en cada uno de los cuadrantes con Lidocaina Clorhidrato al 4% en spray, las muestras tomadas fueron almacenadas a una temperatura de – 70 °C por el lapso de un día.

Las muestras se descongelaron y resuspendieron en 500 µL de una solución de Ácido Perclórico 1M, y 20 µL de una solución de DMSO,



para luego ser sonicadas y centrifugadas por 15 minutos a (4 °C: 15.000 r. p. m.). Una vez centrifugadas las muestras, se procedió a inyectar el sobrenadante al equipo de HPLC, en una cantidad de 50 μ L.

La fase móvil que se utilizó en el equipo de HPLC para este experimento fue: Agua destilada 480 mL, Acetato de Sodio Trihidratado 50 mM, Ácido Cítrico Monohidratado 10 mM, EDTA Disódico Dihidratado 0,15 mM, Octil Sulfato de Sodio 0,44 mM, ajustando el pH a 3,4, con Ácido Acético Glacial, para luego ser filtrada y llevada a volumen de 500 mL con Acetonitrilo. ⁽⁶³⁾

Este experimento se elaboró por duplicado con cada uno de los preparados galénicos formulados.





9. 4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de la capacidad antioxidante de los principios activos de las especies vegetales, se expresaron como media \pm error patrón de los promedios y la significancia relativamente al control de quercetina fue evaluado por el método de análisis de varianza ANOVA seguido por el test de comparaciones múltiples de Tukey – Kramer, considerando $p < 0,05$ como diferencia estadísticamente significativa.

Las diferencias entre los grupos dentro de los preparados galénicos respecto al promedio de las disminuciones de producción de 2,3 DHBA, se determinaron estadísticamente mediante un análisis de varianza seguido por el test de comparaciones múltiples de Tukey – Kramer, con un nivel de significación establecido en $p < 0.05$.

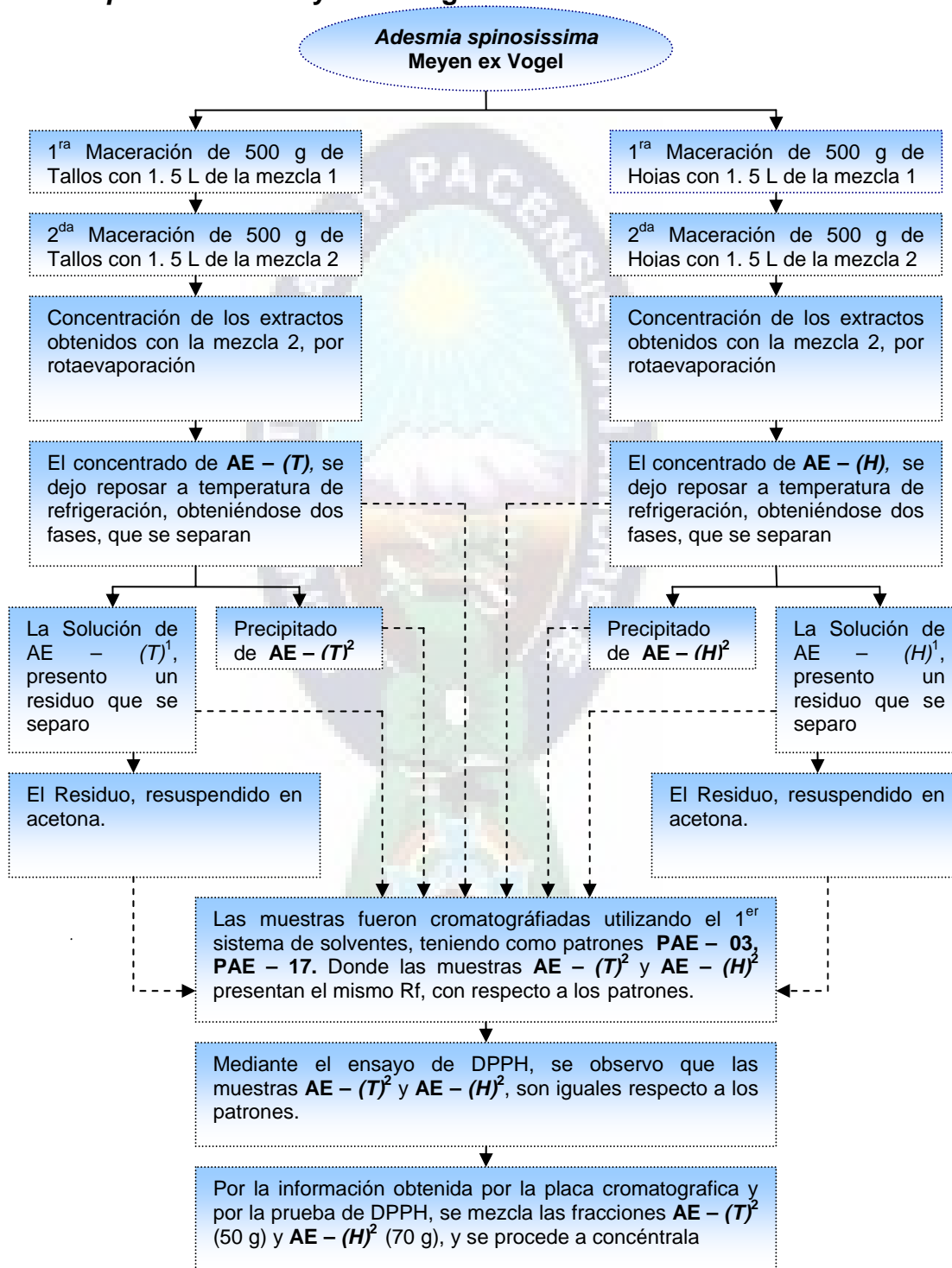


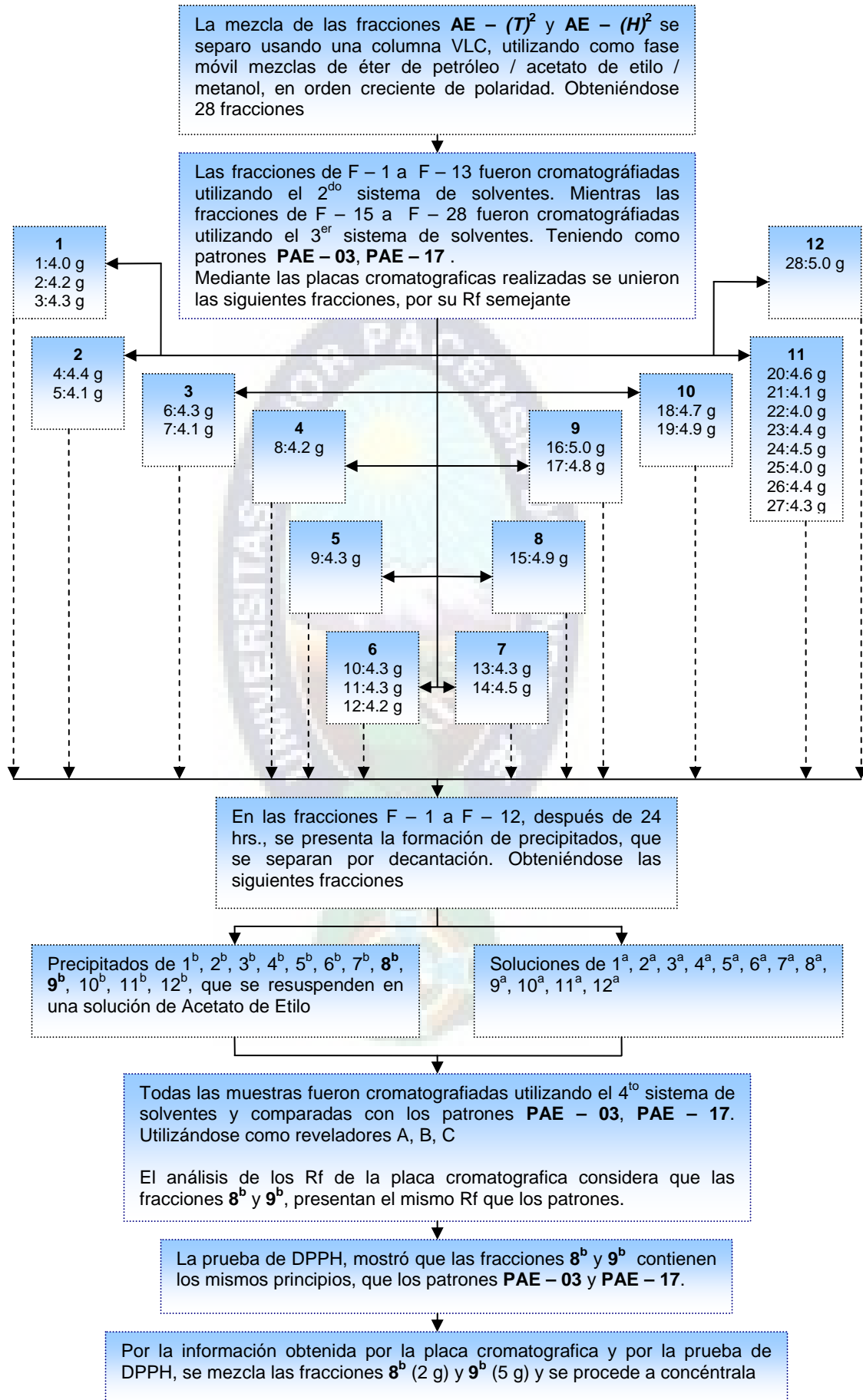


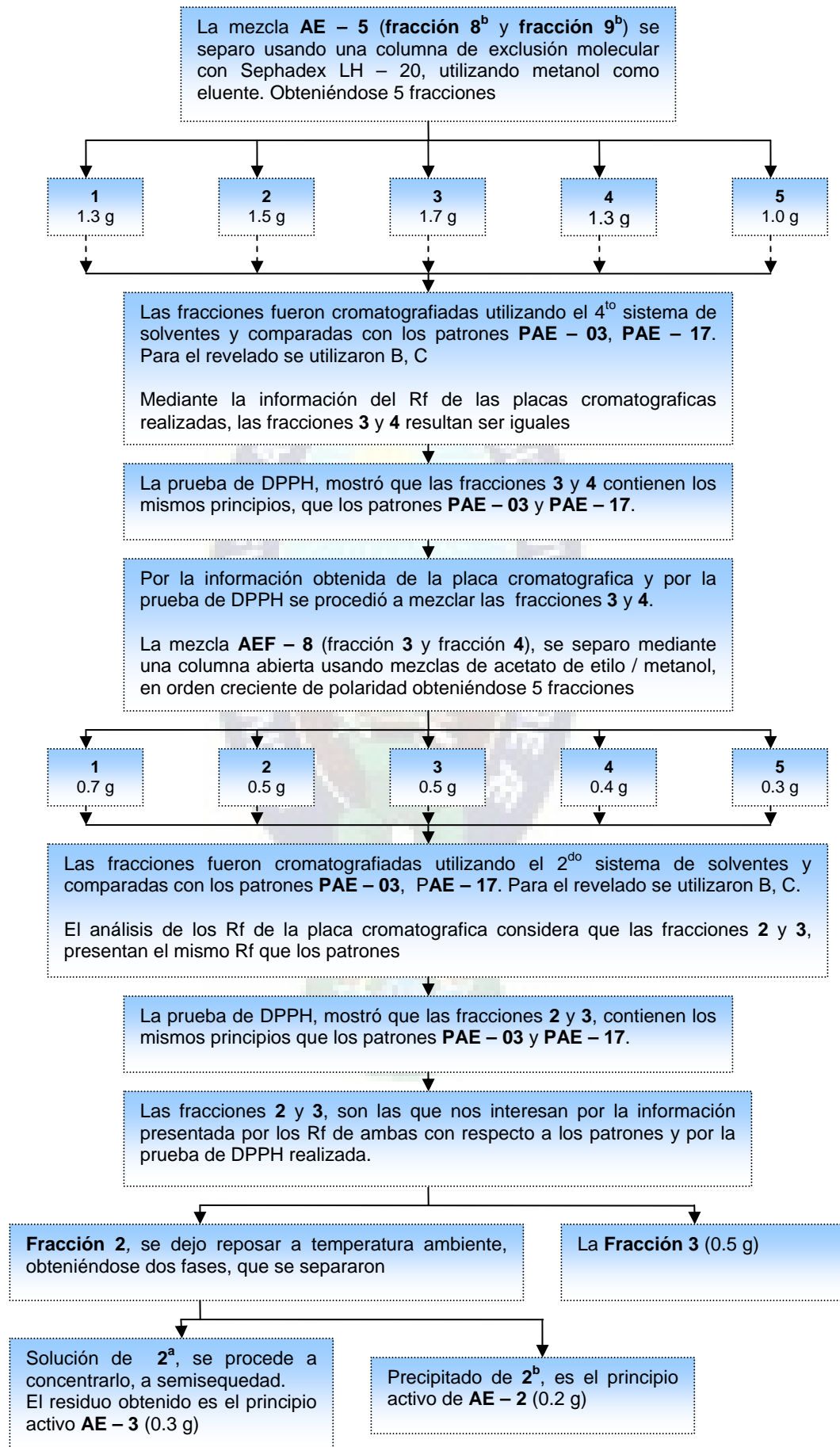
10. RESULTADOS

10.1. INVESTIGACIÓN FITOQUIMICA

10. 1. 1. SEPARACIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS DE *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel







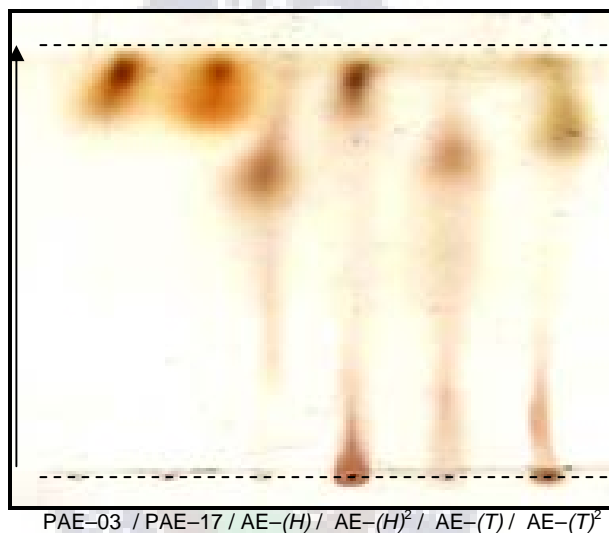


10. 1. 1. 1. PLACAS CROMATOGRAFICAS DE LA SEPARACIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS DE *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel

A continuación se muestran las placas cromatograficas realizadas, de la especie vegetal *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel, durante todo el proceso de separación de principios activos.

PLACAS CROMATOGRAFICAS DE LOS EXTRACTOS DE *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel

Foto 1. Muestras cromatografiadas utilizando el 1^{er} sistema de solventes, teniendo como patrones PAE – 03, PAE – 17. Utilizándose como revelador A.



PLACAS CROMATOGRAFICAS DE LAS FRACCIONES DE *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel

Foto 2. Fracciones F – 1 / F – 13, fraccionadas por una columna VLC y cromatografiadas utilizando el 2^{do} sistema de solventes, teniendo como patrón PAE – 03. Utilizándose como revelador A.

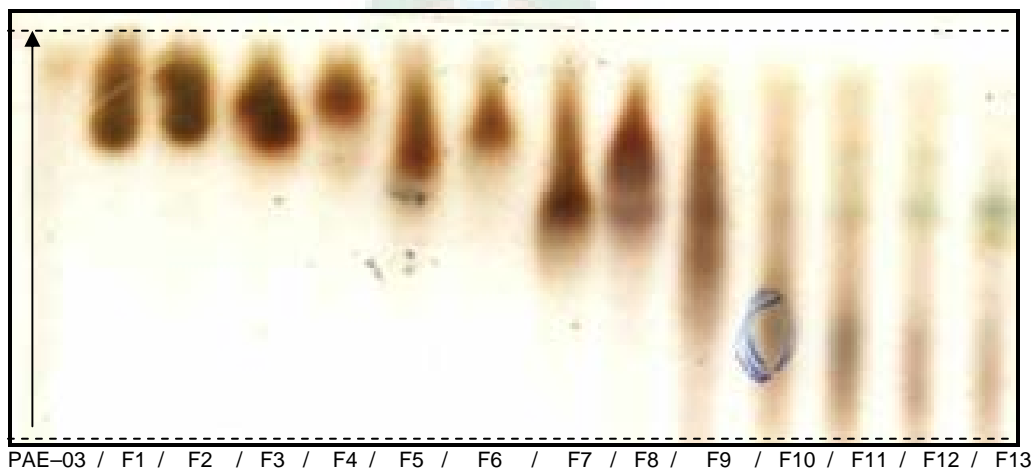
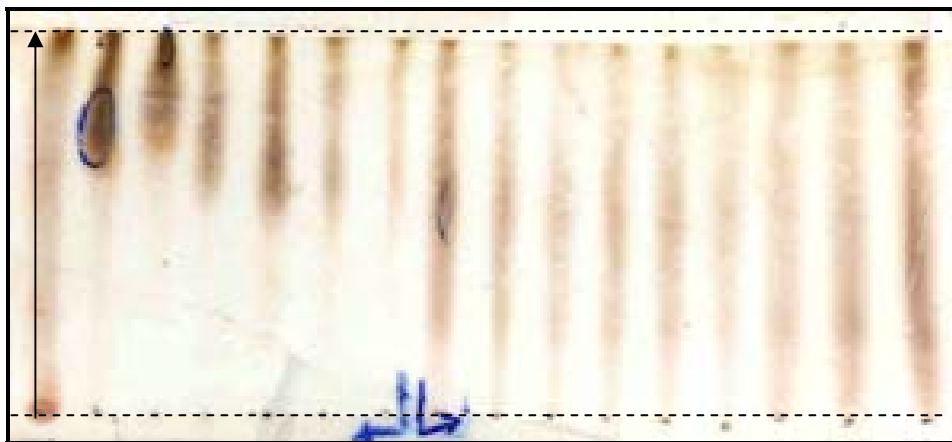


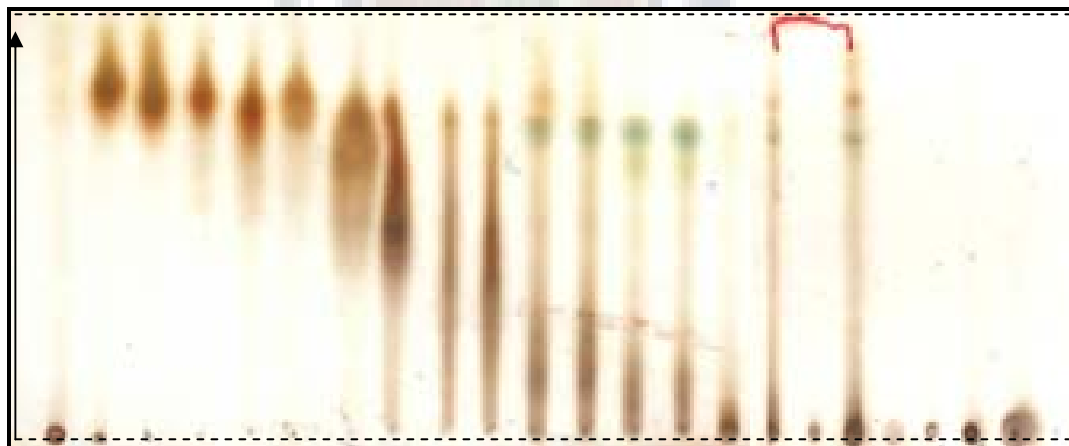


Foto 3. Fracciones F – 14 / F – 28, fraccionadas por una columna VLC y cromatografiadas utilizando el 3^{er} sistema de solventes, teniendo como patrón **PAE – 03**. Utilizándose como revelador A.



PAE-3 / F14 / F15 / F16 / F17 / F18 / F19 / F20 / F21 / F22 / F23 / F24 / F25 / F26 / F27 / F28

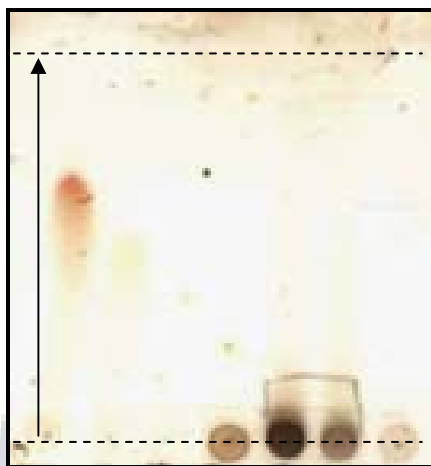
Foto 4. Fracciones F – 1^a - b / F – 12^a - b, cromatografiadas utilizando el 4^{to} sistema de solventes, teniendo como patrón **PAE – 3**. Utilizándose como revelador A.



PAE-03 / F1^a/ F1^b/ F2^a/ F2^b/ F3^a / F3^b/ F4^a / F5^a / F5^b/ F6^a/ F6^b/ F7^a / F7^b/ F8^a / **F8^b**/ F9^a/**F9^b**/F10^a/F10^b/F11^a/F11^b



Foto 5. Fracciones F – 1 / F – 5, fraccionadas por columna de exclusión molecular con Sephadex LH – 20 y cromatografiadas utilizando el 4^{to} sistema de solventes, teniendo como patrón **PAE – 03, PAE – 17** . Utilizándose como revelador A.



PAE-03 / PAE-17/ F1 / F2 / F3 / F4 / F5

PLACAS CROMATOGRAFICAS DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS DE *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel

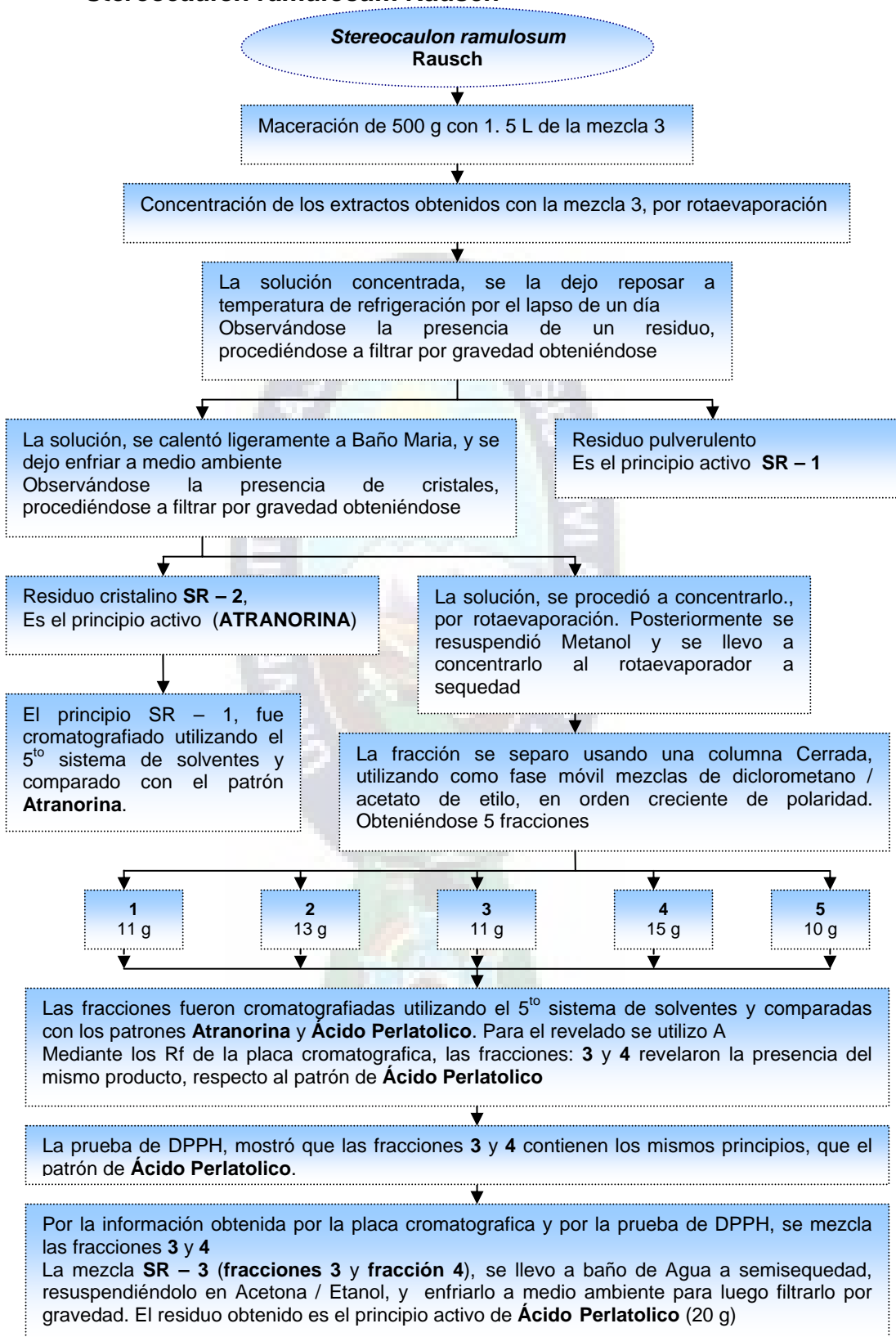
Foto 6. Fracciones F – 1 / F – 5, fraccionadas por columna abierta y cromatografiadas utilizando el 4^{to} sistema de solventes, teniendo como patrón **PAE – 03, PAE – 17** . Utilizándose como revelador A.



PAE-03 / PAE-17/ F1 / F2 / F3 / F4 / F5



10. 1. 2. SEPARACIÓN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS DE *Stereocaulon ramulosum* Rausch





10. 1. 2. 1. PLACAS CROMATOGRAFICAS DE LA SEPARACIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS DE *Stereocaulon ramulosum* Rausch

A continuación se muestran las placas cromatograficas realizadas, de la especie vegetal *Stereocaulon ramulosum* Rausch, durante todo el proceso de separación de principios activos.

Foto 7. Muestras, cromatografiadas utilizando el 5^{to} sistema de solventes, teniendo como patrón **ATRANORINA Y ACIDO PERLATOLICO**. Utilizándose como revelador A.

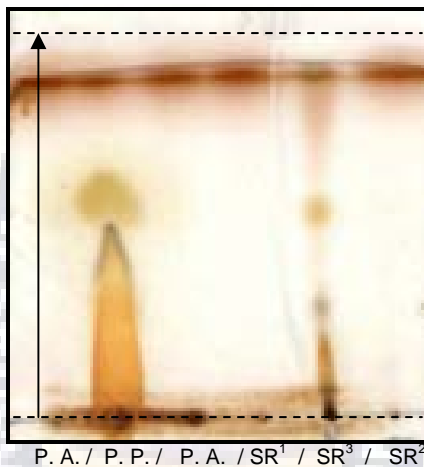
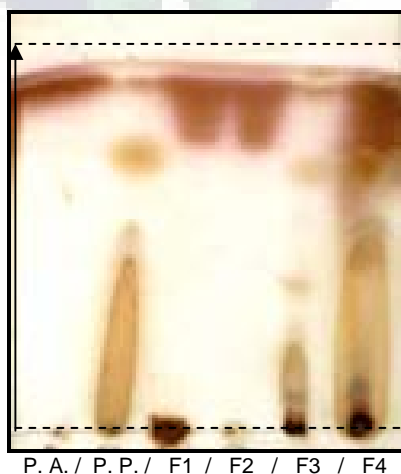


Foto 8. Fracciones F - 1 / F - 4, fraccionadas por métodos cromatograficos, y cromatografiadas utilizando el 5^{to} sistema de solventes, teniendo como patrón **ATRANORINA Y ACIDO PERLATOLICO**. Utilizándose como revelador A.





10. 1. 3. ENSAYO DE LA DECOLORACIÓN DEL RADICAL CATIONICO ABTS⁺ (TEST QUIMICO)

10. 1. 3. 1. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel

Los metabolitos secundarios aislados de la especie vegetal *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel fueron evaluados a través del método espectrofotocolorimetrico ABTS. El método fue empleado para determinar la potencia de cada compuesto mediante el porcentaje de Inhibición.

Todas las determinaciones fueron hechas por triplicado a diferentes concentraciones y al menos por tres veces. Obteniéndose las curvas de porcentaje de Inhibición respecto a la concentración.

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS DE *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel

Los resultados de las curvas de porcentaje de inhibición respecto a la concentración, de los extractos de tallos y hojas de *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel, se representan a continuación en las figuras 1 y 2.

Figura 1. Actividad Antioxidante del Extracto Liofilizado AE – (T), expresado como porcentaje de inhibición mediante el ensayo de la decoloración del radical cationico ABTS⁺

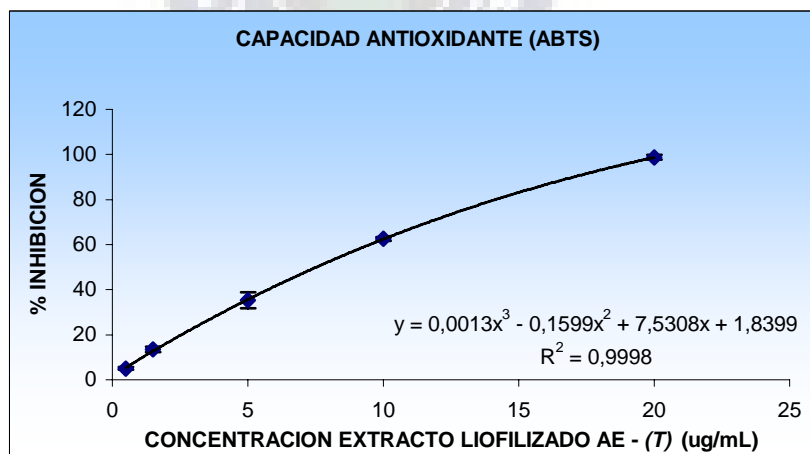
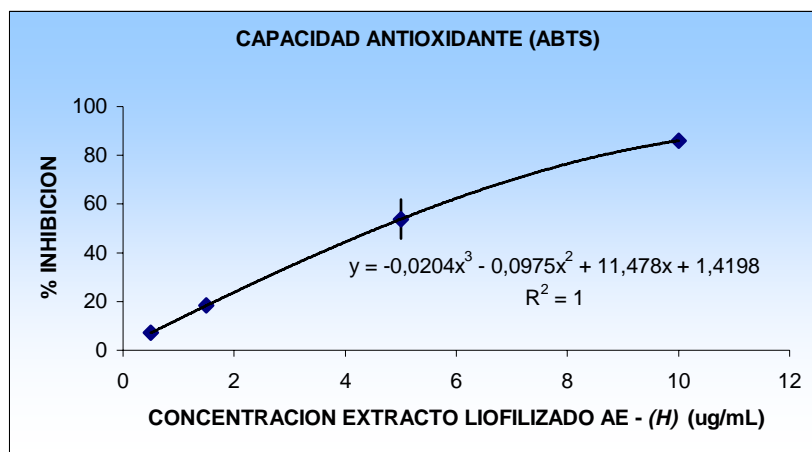




Figura 2. Actividad Antioxidante del Extracto Liofilizado AE - (H), expresado como porcentaje de inhibición mediante el ensayo de la decoloración del radical catiónico ABTS⁺



ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS FRACCIONES DE *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel

Los resultados de las curvas de porcentaje de inhibición respecto a la concentración, de las fracciones de *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel, se representan a continuación en las figuras 3 y 4.

Figura 3. Actividad Antioxidante de la mezcla AE - 5 (fracción 8^b y fracción 9^b), expresado como porcentaje de inhibición mediante el ensayo de la decoloración del radical catiónico ABTS⁺.

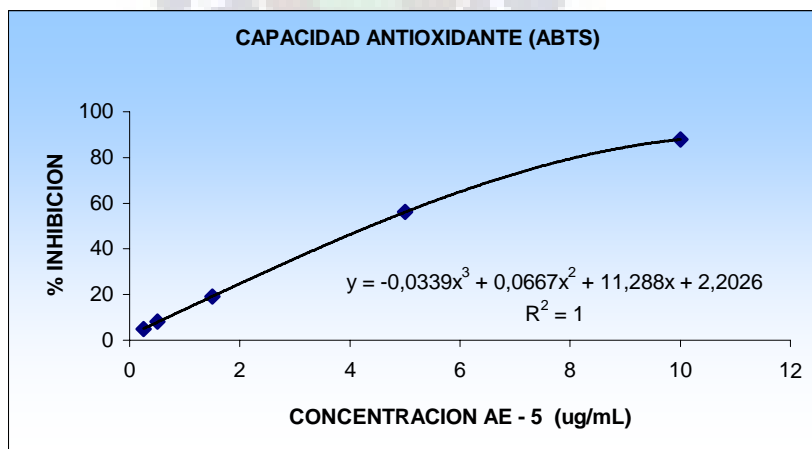
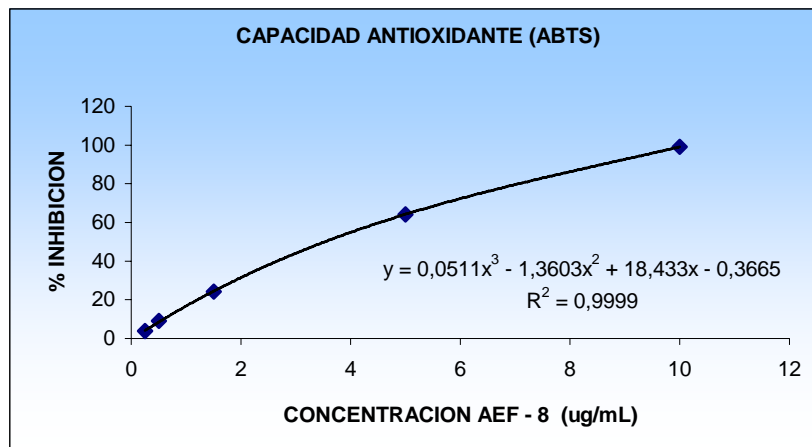




Figura 4. Actividad Antioxidante de la mezcla AEF- 8 (fracción 3 y fracción 4), expresado como porcentaje de inhibición mediante el ensayo de la decoloración del radical catiónico ABTS⁺.



ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS DE *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel

Los resultados de las curvas de porcentaje de inhibición respecto a la concentración, de los principios activos de *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel, se representan a continuación en las figuras 5, 6 y 7.

Figura 5. Actividad Antioxidante del principio activo AE - 1, expresado como porcentaje de inhibición mediante el ensayo de la decoloración del radical catiónico ABTS⁺.

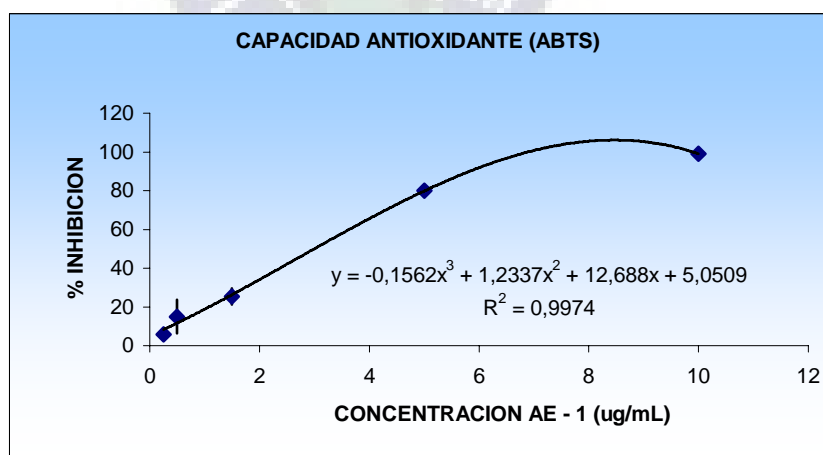


Figura 6. Actividad Antioxidante del principio activo AE – 2, expresado como porcentaje de inhibición mediante el ensayo de la decoloración del radical catiónico ABTS⁺.

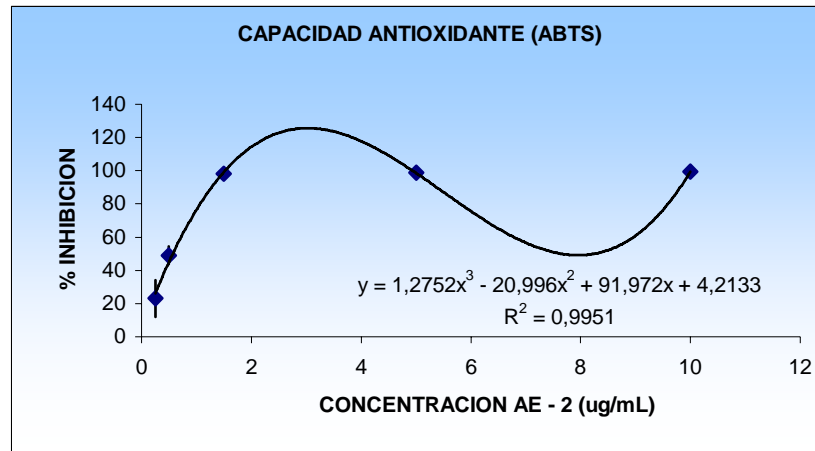
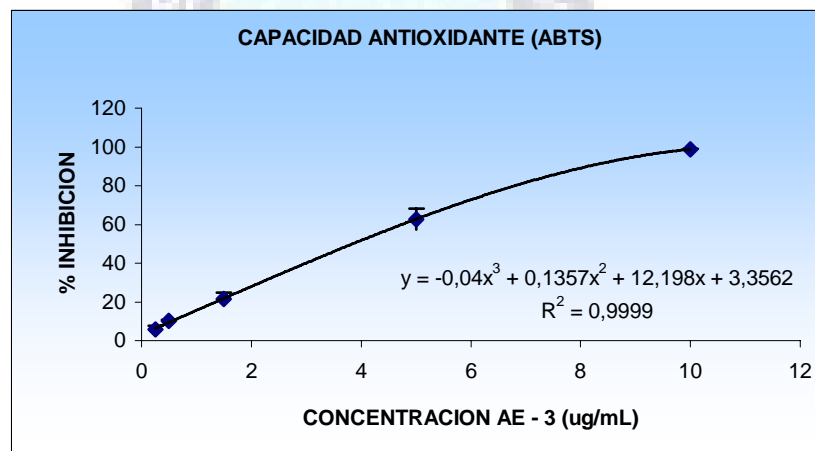


Figura 7. Actividad Antioxidante del principio activo AE – 3, expresado como porcentaje de inhibición mediante el ensayo de la decoloración del radical catiónico ABTS⁺.

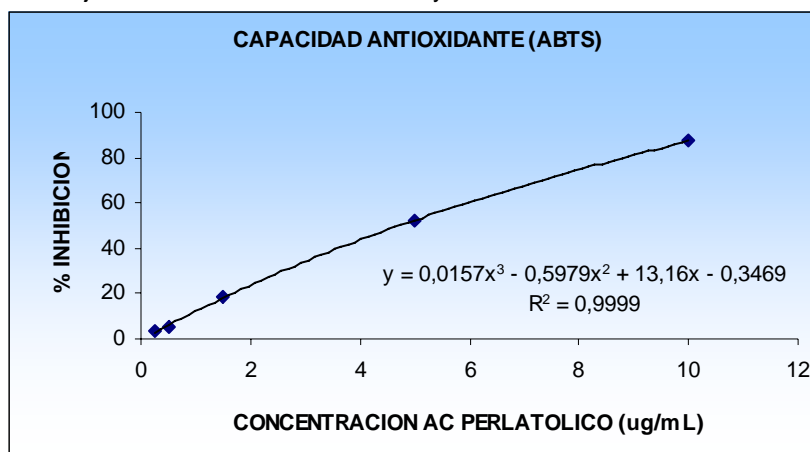


10. 1. 3. 2. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE *Stereocaulon ramulosum* Rausch

Los resultados de las curvas de porcentaje de inhibición respecto a la concentración, de los principios activos de *Stereocaulon ramulosum* Rausch, se representan a continuación en la figura 8.



Figura 8. Actividad Antioxidante del principio activo ACIDO PERLATOLICO, expresado como porcentaje de inhibición mediante el ensayo de la decoloración del radical catiónico ABTS⁺:



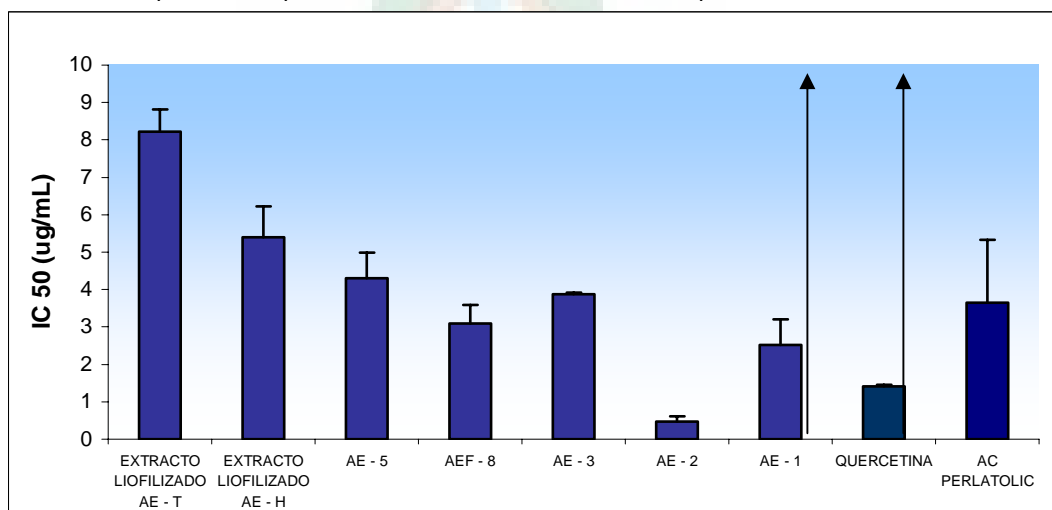
10. 1. 3. 3. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS MUESTRAS DE *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel Y *Stereocaulon ramulosum* Rausch.

Los resultados de la capacidad antioxidante de las especies vegetales de *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel y *Stereocaulon ramulosum* Rausch, fueron elaboradas en base a la actividad antioxidante del patrón de Quercetina que se representan a continuación en la figura 9.

En este caso se observa una diferencia significativa entre:

- ♣ *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel (AE - 2) con un $p = 0,0159$ respecto al patrón de Quercetina.
- ♣ *Stereocaulon ramulosum* Rausch, (Ácido perlatólico) con un $p = 0,0541$ respecto al patrón de Quercetina.

Figura 9. Actividad antioxidante de cada una de las fracciones de las especies vegetales comparadas respecto a la actividad antioxidante de la quercetina.



10. 2. INVESTIGACIÓN GALÉNICA

10. 2. 1. PREFORMULACIÓN DE LA BASE

Se procedió a preformular una base, según productos ya existentes en el mercado, seleccionándose los componentes que se encontraban en estos productos y que son necesarios para elaborar una base tipo Cold – cream.

Tabla 1. Elección de los componentes para la elaboración de la base, en función a los componentes de productos ya existentes en el mercado.

SUNDOWN	CREMA MARCELA	EMULSION NIVEA	BASE PREFORMULADA
Agua	Agua	Agua	Agua
PPG Ester de sorbitol	G – Dimeticona Estearato de Glicerilo Estearato PEG–100	G – lanolato Aceite de castor – PEG – 40	PPG
Alcohol estearílico	Alcohol cetílico Alcohol dicloro benzílico	Alcohol cetoestearílico	Alcohol cetílico
Ester graso de isopropilo Ester Alquilico de Ac Benzoico	Sesquiolato de sorbitano	Miristato de Isopropilo Palmitato de Isopropilo	
Fosfato de cetilo Trietanolamina EDTA Disodico	Imidazolidinilurea Trietanolamina EDTA Tetrasodico	Hidróxido de sodio	Texapón
Acetato de Vit E Quatium 15 Polimero de Acrilato	Aceite de Maní Aceite de germen de Trigo Palmitato de Retinilo Carbomero	Cera microcristalizada Aceite Mineral Carbomero Simeticona	Cera de Abeja
	Nipasol	Nipasol Nipagin Fenoxietanol	Nipasol Nipagin

Se procedió a determinar la función que desempeñan cada uno de los componentes seleccionados de los productos comerciales

Tabla 2. Determinación de la función de cada uno de los componentes de la base preformulada.

FASE I	Cera de Abeja	Base grasa de procedencia animal
	Alcohol Cetílico	Emulsificante tipo detergente neutro
FASE II	Texapón	Emulsificante tipo detergente aniónico
FASE III	Propilenglicol	Humectante
	Agua	Vehículo
FASE IV	Nipagin	Conservador de la fase acuosa
	Nipasol	Conservador de la fase oleosa

10. 2. 2. DETERMINACIÓN DE LA ORIENTACIÓN DE LAS BASES

Tabla 3. Determinación de la Orientación de las bases 13 elaboradas, en función a las pruebas de dilución y solubilidad del colorante con su respectiva contraprueba.

BASES	AGUA DESTILADA	AZUL DE METILENO 2%	SUDAN III 2%
B¹	O/A	O/A	O/A
B ²	A/O	A/O	A/O
B ³	A/O	A/O	A/O
B⁴	O/A	O/A	O/A
B ⁵	A/O	A/O	A/O
B⁶	O/A	O/A	O/A
B ⁷	A/O	A/O	A/O
B⁸	O/A	O/A	O/A
B ⁹	A/O	A/O	A/O
B ¹⁰	A/O	A/O	A/O
B ¹¹	A/O	A/O	A/O
B¹²	O/A	O/A	O/A
B ¹³	A/O	A/O	A/O

INTERPRETACIÓN:

A/O: BASE TIPO AGUA EN ACEITE

O/A: BASE TIPO ACEITE EN AGUA

Las bases preparadas: B¹, B⁴, B⁶, B⁸, B¹², corresponden al tipo Aceite / Agua. (**O/A**), son bases tipo vanishin – cream.

Las bases preparadas: B², B³, B⁵, B⁷, B⁹, B¹⁰, B¹¹, B¹³, corresponden al tipo Agua / Aceite, (A/O) que son las de interés para la investigación, ya que son tipo cold – cream.



10. 2. 3. DETERMINACIÓN DEL pH (5.50) DE LAS BASES

Tabla 4. Determinación de pH, de las 8 bases tipo cold – cream.

BASES	pH		
	1	2	3
B ²	5,498	5,487	5,497
B ³	5,501	5,499	5,501
B⁵	5,889	5,899	5,900
B ⁷	5,476	5,457	5,456
B ⁹	5,451	5,450	5,448
B ¹⁰	5,455	5,478	5,488
B ¹¹	5,467	5,466	5,478
B ¹³	5,507	5,511	5,500

La base preparada: B⁵, queda descartada al presentar un pH, superior al deseado.

Las bases preparadas: B², B³, B⁷, B⁹, B¹⁰, B¹¹, B¹³, presentan un pH, ideal que se asemeja al de la piel.

10. 2. 4. DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LAS BASES

Tabla 5. Determinación de la estabilidad de las 7 bases tipo cold – cream, que presentan un pH, fisiológico ideal.

BASES	PRUEBAS DE ESTABILIDAD			
	Temperatura			Centrifugación
	Ambiente 28°C – 32°C	Elevada 42°C	Baja 0°C – 4°C	3000 r. p. m. por 30 min.
B²	(-)	(+)	(-)	(+)
B ³	(-)	(-)	(-)	(-)
B ⁷	(-)	(-)	(-)	(-)
B⁹	(-)	(+)	(-)	(-)
B¹⁰	(-)	(-)	(+)	(-)
B ¹¹	(-)	(-)	(-)	(-)
B ¹³	(-)	(-)	(-)	(-)

INTERPRETACIÓN:

(-): ESTABLE / INALTERABLE

(+): INESTABILIDAD

Los resultados reflejan que, las bases preparadas: B², B⁹, B¹⁰, llegan a ser inestables (+), al presentar:

- ♣ Una separación de las fases y precipitación, al ser sometida a temperaturas altas y centrifugación (B²).
- ♣ Una separación de las fases, al ser sometida a temperaturas altas (B⁹).
- ♣ Una cristalización de algunos componentes al ser sometida a temperaturas bajas (B¹⁰).

Las bases: B³, B⁷, B⁹, B¹¹, B¹³, son estables (-), y mantienen su consistencia en el tiempo establecido de un mes para condiciones ambientales y de 15 días para estabilidad forzada.

10. 2. 5. INCORPORACIÓN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS EN LAS CONCENTRACIONES DE 2%, 5%, 10% A LAS BASES ESTABLES

Tabla 6. Incorporación de los principios activos a las concentraciones de 2%, 5% y 10%, que pueden ser soportadas por las 4 bases tipo cold – cream, que presentan un pH fisiológico ideal y que se mantienen estables.

BASES	CONCENTRACIÓN					
	2%		5%		10%	
	AE – 2	Ac. Perlatol	AE – 2	Ac. Perlatol	AE – 2	Ac. Perlatol
B ³	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
B ⁷	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
B ¹¹	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
B ¹³	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

INTERPRETACIÓN:

(-): ESTABLE / INALTERABLE

(+): INESTABILIDAD

Las bases B³, B¹¹, no llegan a soportar una carga de principio activo (AE – 2 / Ac. Perlatolico) del 5% y 10%.

Las bases B³, B¹¹, llegan a soportar una carga de principio activo (AE – 2 / Ac. Perlatolico) del 2%.

Las bases B⁷, B¹³, llegan a soportar cargas de principio activo (AE – 2 / Ac. Perlatolico) del 2%, 5% y 10%.



10. 2. 6. DETERMINACIÓN DEL pH (5.50) DE LOS PREPARADOS GALÉNICOS

Tabla 7. Determinación de pH, de los preparados galénicos elaborados a las concentraciones de 2%, 5% y 10%, a partir de las 2 bases tipo cold – cream, que presentan un pH fisiológico ideal y que se mantienen estables.

	pH		
	1	2	3
B ⁷ (AE – 2 al 2 %)	5,526	5,523	5,525
B ⁷ (AE – 2 al 5 %)	5,545	5,548	5,549
B ⁷ (AE – 2 al 10 %)	5,580	5,597	5,585
B ⁷ (Ac. Perlatolico al 2 %)	5,525	5,529	5,527
B ⁷ (Ac. Perlatolico al 5 %)	5,545	5,549	5,544
B ⁷ (Ac. Perlatolico al10 %)	5,595	5,590	5,582
B ¹³ (AE – 2 al 2 %)	5,510	5,512	5,511
B ¹³ (AE – 2 al 5 %)	5,515	5,513	5,516
B ¹³ (AE – 2 al 10 %)	5,525	5,523	5,522
B ¹³ (Ac. Perlatolico al 2 %)	5,515	5,513	5,514
B ¹³ (Ac. Perlatolico al 5 %)	5,517	5,517	5,516
B ¹³ (Ac. Perlatolico al10 %)	5,522	5,520	5,518

Los preparados galénicos preparados a partir de las bases B⁷, B¹³, elaborados a las concentraciones de 2%, 5% y 10%, no presentan una variación significativa del pH, por lo que todas se sometieron a las pruebas de estabilidad.

10. 2. 7. DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LOS PREPARADOS GALÉNICOS

Tabla 8. Determinación de la estabilidad de los preparados galénicos elaborados a las concentraciones de 2%, 5% y 10%, a partir de la base B⁷.

B ⁷	PRUEBAS DE ESTABILIDAD			
	Temperatura			Centrifugación
	Ambiente 28°C – 32°C	Alta 42°C	Baja 0°C – 4°C	3000 r. p. m.
AE – 2 2 %	(-)	(-)	(-)	(-)
AE – 2 5 %	(-)	(-)	(-)	(-)
AE – 2 10 %	(-)	(+)	(+)	(+)
Ac. Perlat 2 %	(-)	(-)	(-)	(-)
Ac. Perlat 5 %	(-)	(-)	(-)	(-)
Ac. Perlat 10 %	(-)	(+)	(+)	(+)

INTERPRETACIÓN:

(-): ESTABLE / INALTERABLE

(+): INESTABILIDAD

Los preparados galénicos elaborados con la base B⁷, son estables a las concentraciones de 2% y 5%. Pero a la concentración de 10% presentan una separación de fases en las pruebas de estabilidad forzada.

Tabla 9. Determinación de la estabilidad de los preparados galénicos elaborados a las concentraciones de 2%, 5% y 10%, a partir de la base B¹³.

B ¹³	PRUEBAS DE ESTABILIDAD			
	Temperatura			Centrifugación
	Ambiente 28°C – 32°C	Elevada 42°C	Baja 0°C – 4°C	3000 r. p. m.
AE – 2 2 %	(-)	(-)	(-)	(-)
AE – 2 5 %	(-)	(-)	(-)	(-)
AE – 2 10 %	(-)	(-)	(-)	(-)
Ac. Perlat 2 %	(-)	(-)	(-)	(-)
Ac. Perlat 5 %	(-)	(-)	(-)	(-)



Ac. Perlat 10 %	(-)	(-)	(-)	(-)
--------------------	-----	-----	-----	-----

INTERPRETACIÓN:

(-): ESTABLE / INALTERABLE

(+: INESTABILIDAD)

Los preparados galénicos elaborados con la base B¹³, son estables y mantienen su consistencia en el tiempo establecido de un mes para condiciones ambientales y de 15 días para estabilidad forzada.

10. 2. 8. DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE VIDA MINIMO DEL PREPARADO GALÉNICO TERMINADO

Tabla 10. Determinación del tiempo de vida mínimo de los preparados galénicos elaborados a las concentraciones de 2%, 5% y 10%, a partir de la base B¹³.

B ¹³	TIEMPO DE VIDA MINIMO		
	Temperatura de 40 °C (UN MES)		
	1º	2º	3º
AE - 2 2 %	(-)	(+)	(+)
AE - 2 5 %	(-)	(-)	(-)
AE - 2 10 %	(+)	(+)	(+)
Ac. Perlat 2 %	(+)	(+)	(-)
Ac. Perlat 5 %	(-)	(-)	(-)
Ac. Perlat 10 %	(+)	(+)	(+)

INTERPRETACIÓN:

(-): ESTABLE / INALTERABLE

(+: INESTABILIDAD)

Los preparados galénicos de AE - 2 y Ácido Perlatolico, a la concentración de 2% presentan una separación de fases.

Los preparados galénicos de AE - 2 y Ácido Perlatolico, a la concentración de 10% presentan un cambio de color (amarillo intenso en el caso de AE - 2, y café claro respecto al Ácido Perlatolico).

Las preparaciones galénicas de AE - 2 y Ácido Perlatolico a la concentración de 5%, no presentan ningún tipo de cambio organoléptico ni físico por las que se procedieron a realizar las pruebas biológicas.

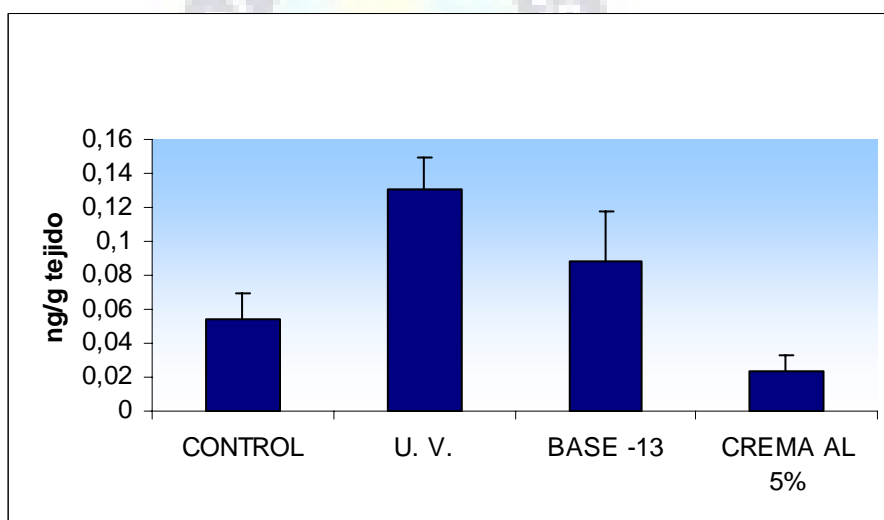


10. 3. INVESTIGACIÓN BIOLÓGICA

La elevada capacidad antioxidante comprobada por el test químico de ABTS, para los metabolitos aislados de la especie vegetal *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel, fueron probados en el test de fotoprotección en el modelo de piel de conejo para el compuesto AE – 2, el resultado se muestra en la figura 10.

10. 3. 1. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD FOTOPROTECTORA DEL PREPARADO GALÉNICO DE *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel

Figura 10. Producción 2, 3 – DHBA (ng / g), Control (tejido no expuesto a la luz Ultravioleta), U. V. (Tejido después de 1 hora de exposición a la luz ultravioleta), Base – 13 (Tejido después de 1 hora de exposición a la luz ultravioleta con aplicación de Base), Crema al 5% (Tejido después de 1 hora de exposición a la luz ultravioleta con aplicación de crema de AE – 2 al 5%)



Los resultados reflejan una diferencia estadísticamente significativa respecto a la disminución de la producción 2, 3 – DHBA, al obtener:

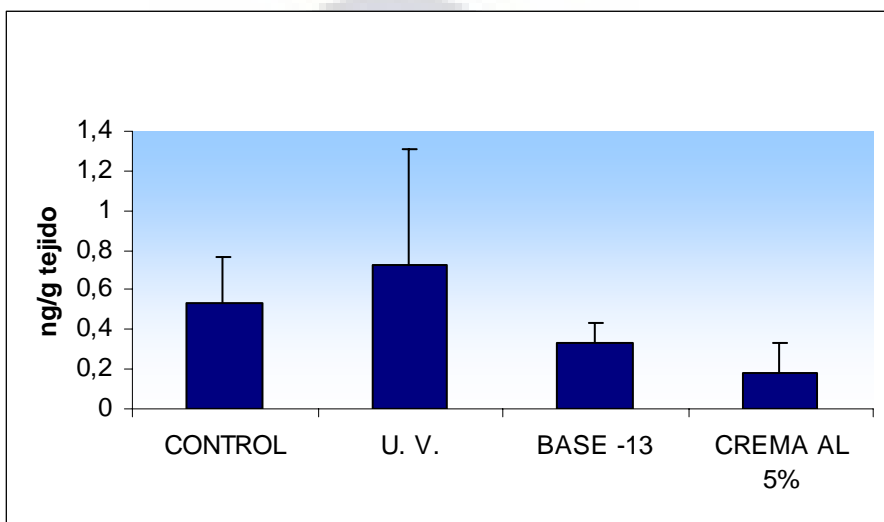
- ❖ Un $p = 0,0559$, entre el tejido control respecto al Tejido Irradiado con luz ultravioleta.
- ❖ Un $p = 0,0266$ entre el tratamiento con la crema de AE – 2 al 5% respecto al Tejido Irradiado con luz ultravioleta.



10. 3. 2. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD FOTOPROTECTORA DEL PREPARADO GALÉNICO DE *Stereocaulon ramulosum* Rausch

El mismo modelo in vivo fue realizado para el metabolito aislado de la especie vegetal *Stereocaulon ramulosum* Rausch usando como principio activo el Ácido perlatolico, que se representa en la figura 11.

Figura 11. Producción 2, 3 – DHBA (ng / g), Control (tejido no expuesto a la luz Ultravioleta), U. V. (Tejido después de 1 hora de exposición a la luz ultravioleta), Base – 13 (Tejido después de 1 hora de exposición a la luz ultravioleta con aplicación de Base), Crema al 5% (Tejido después de 1 hora de exposición a la luz ultravioleta con aplicación de crema de Ácido Perlatolico al 5%)



Los resultados reflejan una diferencia estadísticamente significativa respecto a la disminución de la producción 2, 3 – DHBA, al obtener:

- ❖ Un $p = 0,0404$ entre el tejido control respecto al Tejido Irradiado con luz ultravioleta.
- ❖ Un $p = 0,0314$ entre el tratamiento con la crema de Ácido Perlatolico al 5% respecto al Tejido Irradiado con luz ultravioleta.

11. DISCUSIONES

Los resultados esperados de los experimentos, eran que los preparados galénicos que contienen en su composición compuestos fenólicos con actividad antioxidante / fotoprotectora, protegieran la piel de animales de experimentación de los efectos deletéreos de la exposición a la radiación UV – B, generadas mediante, una lámpara de luz ultravioleta según el modelo experimental empleado (Morquio y cols., 2.005)⁶³.

Nuestras hipótesis se basaban en las cuantiosas referencias bibliográficas que mencionan la capacidad antioxidante de los flavonoides y dépsidos [(Bjerke y cols., 2.002)¹⁰; (Desmarchelier y cols., 1.998)²⁸; (Mollinedo y cols., 2.001)⁶¹; (Muñoz y cols., 2.005)⁶⁴; (Vila y cols., 1.999)⁸⁹; (Rancan y cols., 2.002)⁷⁵ y otros].

La presente tesis se baso en un modelo experimental y no clínico. De esta manera se tuvo un control limitado de todas las variables que intervinieron.

Durante la recolección de muestras vegetales, se evidencio que las especies vegetales pasan desapercibidas por los pobladores de la región.

La razón de no dar la explotación que merecen estos recursos naturales, es por el desconocimiento de sus propiedades, siendo que estas han sido conocidas desde antes, como remedios tradicionales y que esta información se fue perdiendo con el tiempo.

Las especies vegetales superiores como *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel y especies líquénicas como *Stereocaulon ramulosum* Rausch, producen metabolitos activos con actividad antioxidante / fotoprotectora, que están limitadas por las condiciones climáticas que se presenta en la región del altiplano boliviano.

Los estudios realizados sugirieron recolectar las especies vegetales en la época de invierno, por tener mayor contenido de principios activos.

Con respecto a la especie vegetal *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel se utilizo las partes aéreas (hojas y tallos), por tener estas un mayor contenido de principios activos según un screening fitoquímico con respecto a los otros órganos vegetales de la planta.

De la especie vegetal *Stereocaulon ramulosum* Rausch se utilizo el cuerpo vegetativo no diferenciado en raíz, tallo y hoja, donde se encuentra el principio activo buscado.

Se procedió a la extracción de los principios activos de ambas especies vegetales en sus correspondientes solventes.

El extracto de *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel recolectado en la época de verano, presentaba los principios activos buscados, determinado por la realización de una placa cromatografica preliminar de estos, con respecto a los patrones de PAE – 03 y PAE – 17, donde ambos presentaban el mismo Rf.

Pero el extracto de *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel recolectado en la época de verano, presentaba una menor capacidad de reducción del radical DPPH (2,2 – Difenil – 1 – Picrilhidrazilo), que los patrones PAE – 03 y PAE – 17, respecto a la intensidad del color que presentaban.

El extracto de *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel recolectado en la época de invierno, también presentaba los principios activos buscados, determinado por la realización de una placa cromatografica preliminar de estos, comparándolos con los patrones de PAE – 03 y PAE – 17, donde ambos presentaban el mismo Rf.

La capacidad de reducción del extracto de *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel recolectado en la época de invierno, sobre el radical DPPH, fue mucho mayor que el extracto de *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel recolectado en la época de verano.

Respecto al extracto de *Stereocaulon ramulosum* Rausch, recolectado en la época de verano, mediante la realización de una placa cromatografica preliminar de este y de los patrones Atranorina, Ácido Perlatolico, (principio activo buscado), se concluyo que no existía el principio activo deseado por los Rf diferentes, obtenidos de la placa cromatografica realizada.

Además el principio activo del extracto de *Stereocaulon ramulosum* Rausch, recolectado en la época de verano, no presentaba la capacidad de reducir el radical DPPH, prueba que indico que el extracto de *Stereocaulon ramulosum* Rausch, recolectado en la época de verano no era de interés para nuestra investigación.

Por lo contrario el extracto de *Stereocaulon ramulosum* Rausch, recolectado en la época de invierno, presentaba el principio activo buscado, esto por la realización de una placa cromatografica preliminar, donde el Rf del extracto era igual al Patrón de Ácido Perlatolico.

Con respecto a la actividad de reducir el radical DPPH, el extracto de *Stereocaulon ramulosum* Rausch, recolectado en la época de invierno, presentaba una mayor capacidad antioxidante sobre el radical DPPH.

Los métodos de extracción y aislamiento de principios activos que se emplearon y se proponen, pueden ser mejorados y modificados, de acuerdo al requerimiento, recursos y forma de trabajo del analista.

Este trabajo se baso en el diseño metodológico empleado por (Mollinedo y cols., 2.001)⁶¹, para la extracción y aislamiento de principios activos de la planta *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel y en la modificación del diseño metodológico empleado por (Vila y cols., 1.999)⁸⁹, en la parte de aislamiento de principios activos del líquen *Stereocaulon ramulosum* Rausch, lo que constituye una contribución a la investigación fitoquímica.

La utilización de dos metodologías diferentes para separar los principios activos de las especies vegetales de interés, como son la cromatografía y cristalización / recristalización, fueron elegidas para determinar que metodología podría ser útil para la investigación y que metodología podría ser útil para la industrialización.

Para la separación de los principios activos de la planta *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel, se eligió el método cromatografico, ya que los principios activos (Flavonoides) de esta especie son termolábiles.

Se procedió primero por una extracción de los principios activos de la planta *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel, con un solvente apolar (éter de petróleo), esto para eliminar la clorofila y otro tipo de principios activos apolares, que entorpecerían en la extracción de los principios activos deseados.

La extracción de los principios activos polares de la planta *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel, de nuestro interés, se realizaron con la mezcla de Agua / Etanol, por ser esta una mezcla eficiente en este tipo de principios polares (flavonoides).

La realización de una placa cromatografica de los extractos polares de *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel, de tallos y hojas, muestran que nuestro principio activo se encontraba en mayor proporción en las hojas.

La primera separación de los principios activos de *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel de tallos y hojas, se realizo por filtración, y el residuo obtenido del extracto de tallo y hoja se resuspendió en Acetato de etilo, para evitar la oxidación temprana de los principios activos.

Al realizar una placa cromotografica con las muestras de *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel, de tallo y hoja en Agua / Etanol y las muestras *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel de tallo y hoja en Acetato de etilo, se observaron que las muestras contenidas en el solvente de Acetato de etilo presentan el mismo Rf que los patrones de PAE – 03 y PAE – 17. Y las muestras que estaban en el solvente Agua / Etanol, presentaban un Rf diferente de los patrones, indicándonos que los principios hallados en el extracto de Agua / Etanol, serian otros o tal vez los principios que buscábamos, pero que habrían sufrido algún tipo de modificación ya sea oxido – reducción, hidrólisis fotolisis.



Por lo que se procedió a trabajar con los extractos de *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel de tallos y hojas contenidos en el solvente de Acetato de etilo, procediéndose primeramente a juntarlos, por presentar el mismo Rf, y tener la misma capacidad de scavengers del radical DPPH.

La utilización de métodos cromatograficos para la separación de los principios activos deseados, de la mezcla de los extractos de tallos y hojas de *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel fue guiado en todo momento por los patrones de PAE – 03 y PAE – 17, además del ensayo de reducción del radical DPPH.

Los principios activos de AE – 3, AE – 2, y AE – 1, de *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel, aislados por métodos cromatograficos, resultaron ser en poca cantidad, esto por el bajo porcentaje de rendimiento obtenido al recolectarse la especie en la época de invierno.

La extracción y separación del principio activo (Ácido Perlatolico), de la especie vegetal *Stereocaulon ramulosum* Rausch, se realizaron con Acetato de etilo destilado. Esto por que presenta trazas de Ácido Acético, lo cual favoreció en un mejor rendimiento en la extracción y separación. A diferencia del Acetato de etilo p. a., que no dio buen rendimiento en la extracción y separación del principio activo.

Esto nos indico que el principio activo de Ácido Perlatolico, es un metabolito estable a pH ácido, sin sufrir algún cambio de conformación estructural que afecte su actividad antioxidante / fotoprotectora.

Para la separación del principio activo de Ácido Perlatolico del extracto de *Stereocaulon ramulosum* Rausch, se utilizo el método de cristalización / recristalización, ya que el principio activo deseado (Dépsido) no es termolábil por lo que pudo soportar elevadas temperaturas, sin sufrir cambios en su estructura.

Este método, resulto ser excelente, para una posible industrialización ya que se puede extraer mayores cantidades del principio activo sin realizar muchas manipulaciones sobre la muestra.

Los métodos empleados para la evaluación de la actividad antioxidante de los metabolitos activos de las especies vegetales fueron escogidos de acuerdo a los mecanismos de acción en los cuales están basados.

Los métodos espectrofotométricos como DPPH y ABTS, son métodos que nos permitieron evaluar la actividad antioxidante de los metabolitos secundarios como scavenger de radicales libres.



Ambos métodos se basaron en la decoloración de una solución del reactivo DPPH o ABTS, respectivamente en su estado oxidado, la decoloración de dicha solución nos permite cuantificar la actividad antioxidante a través de la concentración de dicho radical, midiendo su absorbancia a una longitud de onda máxima, donde la absorbancia para el DPPH es 517 nm y para el ABTS es 750 nm.

El método de decoloración de DPPH, es un método que nos permitió hacer determinaciones cualitativas así como determinaciones cuantitativas, además de ser empleado como revelador durante el proceso de aislamiento de los principios activos de las especies vegetales.

El método de ABTS, es un método que presenta un coeficiente de correlación elevado con respecto al método de DPPH lo cual es razonable, ya que siguen el mismo mecanismo de acción.

Ambos métodos miden la capacidad antioxidante de moléculas como scavenger, pero la ventaja del método ABTS, fue su estabilidad en función de los solventes empleados para distintas moléculas con polaridades diferentes haciéndolo un método accesible para el estudio de metabolitos secundarios aislados de especies vegetales, cuyas moléculas son de polaridades distintas.

Para que un principio activo presente una actividad fotoprotectora, debe poseer una actividad antioxidante, aunque no siempre es así, ya que pueden existir principios activos:

- ♣ Antioxidantes / Fotoprotectores
- ♣ Antioxidantes / No Fotoprotectores
- ♣ No Antioxidantes / Fotoprotectores
- ♣ No Antioxidantes / No Fotoprotectores

Para nuestro ensayo experimental en piel de conejos (*in vivo*), era necesario que nuestros principios activos presenten una actividad antioxidante.

Durante el experimento de la reacción de decoloración del radical monocatiónico $ABTS^{\cdot+}$, se evidenció que a medida que se van purificando las muestras de *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel, la capacidad antioxidante de las mismas se incrementa, mostrando que cuanto más se purifica el extracto de *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel, tienden a presentar mayor potencial antioxidante. Según la figura 9.

Pese a que la evidencia actual indica que el dèpsido, que está contenido en el extracto y que esperábamos sería responsable de los posibles efectos antioxidantes / fotoprotectores. Se observa una tendencia antioxidante disminuida, reflejada en la prueba de decoloración del radical catiónico $ABTS^{\cdot+}$, respecto al patrón de quercetina. Según la figura 9.



Donde los datos obtenidos muestran diferencias estadísticamente significativas entre el extracto de *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel y el extracto de *Stereocaulon ramulosum* Rausch.

No se encontraron ningún tipo de referencia bibliografía, respecto a la elaboración de preparados galénicos que presenten compuestos fenólicos con actividad antioxidante / fotoprotectora, lo que constituyo una contribución a la investigación galénica y una aplicación para la investigación fitoquímica.

Debido a que en la mayoría de los fotoprotectores el factor determinante de su actividad esta dada por el vehículo en que esta incorporado, se recurrió a varios tipos de vehículos entre los cuales, se opto por la emulsión tipo A/O, por dar al principio una mayor protección y son recomendables para personas con pieles secas y sensibles.

En cuanto a los demás tipos de base, se las descarto por que:

- ♣ Desaparecen rápidamente de la superficie cutánea, dando una protección poco prolongada y escasa. Además de provocar una excesiva deshidratación. (Lociones hidroalcoholicas).
- ♣ Se evaporan con rapidez, siendo necesario aplicar frecuentemente el preparado, debido a que la fina capa lipidica es insuficiente para la protección. (Emulsiones O/A).
- ♣ Se adhieren con facilidad partículas extrañas como polvo. (Aceites).

La presencia en los preparados galénicos elaborados de ingredientes tenso – activos, sustancias hidratantes, lípidos, hidrófilos, favorecieron la permeabilización de la capa cornea y la penetración intra cutánea de los ingredientes activos.

Los ingredientes elegidos para la elaboración de la base tipo Cold – cream, se escogieron en base:

- ♣ Productos ya existentes en el mercado, con actividad fotoprotectora. (Sundow)
- ♣ Producto ya existentes en el mercado, como base neutra sin principio activo (Emulsión de Nívea)
- ♣ Productos recién elaborados con actividad fotoprotectora a partir de especies vegetales. (Crema Marcela, producto Uruguayo)

Lo que se trato de hacer es elaborar una base económica que cumpla con las propiedades exigidas para una Cold – cream. Según la tabla 1.

Según la tabla 2, los ingredientes utilizados para la elaboración de cremas tipo Cold – cream fueron escogidas por poseer propiedades de:

- ♣ Cera de Abeja, que constituye parte de la fase grasa, es insoluble en agua, parcialmente soluble en alcohol de 90 ° GL, en éter etílico y muy soluble en aceites fijos y esenciales. Presenta un intervalo de fusión entre 61 – 65 °C,



con un índice de Acidez entre 17 – 24. Se utilizó este componente para aumentar la consistencia del preparado galénico.

- ♣ Alcohol cetílico, que constituye parte de la fase grasa, siendo un agente emulsificante, fue utilizado para aumentar la viscosidad, por lo que retarda la formación de las cremas.
- ♣ Texapón, resulta ser un tenso activo aniónico, al ionizarse en el agua y presentar un anión lipófilo voluminoso. Se lo utilizó por ser un detergente y agente humectante, efectivo en soluciones ácidas, alcalinas y en aguas duras.
- ♣ Propilenglicol, que constituye parte de la fase acuosa, es un líquido viscoso, incoloro, casi inodoro y ligeramente más denso que el agua. Es higroscópico, miscible en agua, alcohol y cloroformo, y soluble en éter. Disuelve numerosas esencias pero no los aceites.
Se lo empleó como disolvente de principios activos inestables en solución acuosa.
- ♣ Agua purificada, es un líquido límpido, incoloro, inodoro e insípido. Se emplea para numerosas formas galénicas con algunas excepciones.
- ♣ Nipagin, polvo cristalino blanquecino que se utilizó como conservador de la fase acuosa.
- ♣ Nipasol, polvo cristalino blanquecino que se utilizó como conservador de la fase oleosa.
- ♣ Principios activos, pueden tener diferentes lugares de absorción, a nivel de:
 - ♣ Superficie: repelentes, filtros y pantallas solares
 - ♣ Estrato córneo: humectantes, queratolíticos
 - ♣ Epidermis: esteroides, anestésicos locales
 - ♣ Células basales: citostáticos, estabilizantes de mastocitos
 - ♣ Tejido subcutáneo local: AINES
 - ♣ Circulación sistémica: estrógenos, nitroglicerina, fentanilo, dinitrato de isosorbide, nicotina

Siendo que los principios activos que se aislaron de las especies vegetales *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel y *Stereocaulon ramulosum* Rausch, penetran a nivel de la superficie y estrato córneo.

Los ingredientes seleccionados tuvieron que prepararse en diferentes proporciones, para poder obtener una serie de bases que puedan ser tipo cold – cream, que fueron sometidas a diferentes pruebas.

La prueba de orientación de las bases estables, nos mostraron que cualquier componente de la base elaborada puede influir en la orientación siendo O/A y A/O, según la cantidad en que este presente. Según la tabla 3, tanto la prueba de Agua destilada como la prueba de Azul de metileno y su contraprueba, indicaron la dirección de las bases elaboradas.

Ambas pruebas de orientación resultaron ser nuestro primer factor determinante para poder excluir a aquellas bases que habían adoptado un comportamiento O/A. Más las bases que presentaron una orientación A/O pasaron a las siguientes pruebas.



La determinación del pH de las bases, como segundo factor determinante para poder excluir a aquellas bases que no presentaban un rango de pH, cercano a la piel, se presenta en la tabla 4.

Es muy importante ya que si presentaban un pH básico podrían provocar la presencia de microorganismos, o si presentaban un pH muy ácido llegarían a irritar la piel. Además que al incorporar el principio activo a esta base, este podría sufrir alguna reacción que modificara su estructura y por tanto sus propiedades antioxidantes / fotoprotectoras.

La realización de las pruebas de estabilidad observadas en la tabla 5, son un factor determinante para poder excluir a aquellas bases que no son estables pasado un determinado tiempo, que se puede reflejar mediante ensayos acelerados de estabilidad utilizando como parámetros la temperatura y la centrifugación.

Mediante la prueba de determinación de estabilidad de las bases por temperatura se observó una estabilidad química y biológica (como una posible contaminación).

A temperatura ambiente, casi todas las bases eran estables. Pero al determinar la estabilidad de las bases variando la temperatura, estas fueron evidenciando la presencia de precipitados al ser sometidas a bajas temperaturas y algunas bases al ser sometidas a temperaturas relativamente altas presentaron la separación de sus fases.

Esta prueba de variación de temperatura nos ayudó a poder discriminar las bases que aparentemente eran estables a temperatura ambiente, pero cuando se realiza las variaciones de temperatura, estas empiezan a sufrir cambios en su estructura por lo que se las descartaron.

La determinación de estabilidad de las bases elaboradas por centrifugación se centró más a observar una estabilidad física, verificando la presencia de precipitados.

La incorporación de los principios AE – 2 y Ácido Perlatólico aislados respectivamente de las especies vegetales *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel y *Stereocaulon ramulosum* Rausch, en cantidades de 2%, 5% y 10% a nuestras bases estables observadas en la tabla 6, mostraron que algunas bases no llegaron a soportar una carga de principio activo del 10%, presentando una sobresaturación, y cambios de carácter organoléptico, por lo que estas bases fueron descartadas.

Las bases que pudieron soportar cargas de principios activos del 2%, 5% y 10%, se sometieron a la prueba de determinación de pH, para observar el efecto del principio activo sobre la base, la tabla 7 muestra que las bases que soportaron una carga de 10% presentaban un pH elevado, quedando

descartadas por que ahora su pH total resultaba ser incompatible con el pH de la piel, pudiendo provocar irritaciones sobre esta.

La determinación de pruebas estabilidad de temperatura y centrifugación, realizados a las bases, se aplicaron a los preparados galénicos elaborados.

En las tablas 8 y 9 se determinaron las estabilidades químicas, biológicas y físicas de los preparados galénicos elaborados con las dos bases diferentes, que pasaron por todas las pruebas realizadas.

Según la tabla 8, las pruebas realizadas sobre los preparados galénicos de AE – 2 y Ácido Perlatolico en concentraciones de 2%, 5% y 10%, elaborados con la base (B⁷), mostraron que a temperatura ambiente todos eran estables.

Pero al determinar su estabilidad variando la temperatura los preparados galénicos elaborados a concentraciones de 2% y 5% presentaron una estabilidad mejor que los preparados galénicos elaborados a una concentración del 10%, que presentaron una separación de sus fases al ser sometidas a temperaturas elevadas.

La determinación de la estabilidad de los preparados galénicos por centrifugación, mostró que a la concentración del 10% se observa la presencia de precipitados, que indicaron la incompatibilidad entre la base y el principio activo.

Al observar que estos preparados galénicos presentaban una inestabilidad a la concentración del 10%, queda la duda de que a concentraciones de 2% y 5%, pasado un determinado tiempo puedan presentar inestabilidad, por lo que estas preparaciones elaboradas con la base (B⁷), quedaron descartadas.

Según la tabla 9, las pruebas realizadas sobre los preparados galénicos de AE – 2 y Ácido Perlatolico en concentraciones de 2%, 5% y 10%, elaborados con la base (B¹³), mostraron que estos, no presentan ningún tipo de inestabilidad, por lo que se procedió a realizarles las pruebas de tiempo de vida mínimo.

La realización de la prueba del tiempo de vida minino de los preparados galénicos de AE – 2 y Ácido Perlatolico a las concentraciones del 2%, 5% y 10% elaborados con la base (B¹³), fue el parámetro final para predecir que preparados galénicos eran estables pasado un determinado periodo de tiempo.

Según la tabla 10, la realización de la prueba de tiempo de vida mínimo de los preparados galénicos AE – 2 y Ácido Perlatolico en concentraciones del 5%, indican que estos eran estables por un periodo mínimo de tres meses y un máximo calculado aproximado de 1 año.



Más los preparados galénicos AE – 2 y Ácido Perlatolico en concentraciones del 2% y 10%, se descartaron por que presentaban cambios organolépticos y físicos.

Cabe hacer nota que estos preparados galénicos AE – 2 y Ácido Perlatolico en concentraciones del 5%, que se elaboraron a partir de la base (B¹³), resultaron ser estables a cambios de presión atmosférica y aumento del porcentaje de humedad, ya que parte de la investigación se realizó en Montevideo – Uruguay, donde los preparados galénicos se mantuvieron estables.

La elaboración de las formulas para los preparados galénicos de AE – 2 y Ácido Perlatolico finales fueron:

Principio activo	1,50 partes
Cera de abeja	3,00 partes
Alcohol cetílico	3,00 partes
Propilenglicol	3,00 partes
Texapón	0,30 partes
Nipazol	0,12 partes
Nipagin	0,06 partes
Agua csp	30

En ambas formulaciones no se agregó vitamina E, por ser un antioxidante para la fase oleosa, podría haber originado un sinergismo con nuestros principios activos aislados.

Si nuestros principios presentaban una actividad antioxidante / fotoprotectora, inferior o ninguna actividad, el ensayo del modelo biológico en piel de conejos mediría la capacidad antioxidante / fotoprotectora de la vitamina E.

En todo caso realizado el experimento, se observó que nuestros preparados galénicos poseían una actividad antioxidante / fotoprotectora considerable, que podría aumentar con la incorporación de vitamina E, por medio un mecanismo de sinergismo.

Ahora bien para la aplicación particular de los preparados galénicos con actividad antioxidante / fotoprotectora a una determinada dosis, esta puede variar según:

- ♣ Naturaleza de la piel a tratar
- ♣ Intensidad de acción tenida
- ♣ Modo de aplicación

Los preparados galénicos se aplicaron mediante masaje lento, ligero y continuo por tres a cinco minutos, ya que esto permitió una buena penetración en la capa cutánea. Extendiéndose el preparado galénico sobre la zona a tratar ligeramente con la mano, cuidando de no producir excesivo forzamiento para no irritar mecánicamente la piel.

Generalmente una dosis suficiente, después de la aplicación, deja la piel ligeramente untuosa, mórbida y lisa, de manera que la mano o el dedo se deslizaban sobre la zona cutánea apenas tratada con relatividad.

Para la determinación de la actividad fotoprotectora de los preparados galénicos sobre la piel, se utilizó como animal de experimentación al conejo, por ser este según la FDA, el animal de experimentación utilizado para ensayos de medicamentos sobre la piel, ya que presenta una similitud con la piel humana.

El modelo experimental *in vivo* empleado fue de (Morquio y cols, 2.005)⁶³, que se fundamenta en el incremento del marcador (2,3 – DHBA), por medio de una radiación UV – B, producida por una lámpara de luz ultravioleta, que se ve reflejado por el incremento de la curva del marcador (2,3 – DHBA), respecto control de la piel del animal de experimentación que produce el marcador (2,3 – DHBA), normal.

La función de los principios activos contenidos dentro de los preparados galénicos era el disminuir la cantidad del marcador (2,3 – DHBA) formado, al someter la piel del animal de experimentación a una radiación UV – B, por medio de una lámpara de luz ultravioleta.

Con respecto a los dos grupos experimentales, ambos grupos mostraron un efecto fotoprotector, tomando como referencia la acción deletérea provocada por la radiación UV – B.

Según la figura 10, el grupo tratado con el preparado galénico de AE – 2, mostró un efecto fotoprotector estadísticamente significativo con un $p = 0,0266$ contra la radiación UV – B, inducida en la piel del conejo, por medio de la lámpara de luz ultravioleta.

Por otro lado el grupo tratado con el preparado galénico de Ácido Perlatólico, mostró una diferencia significativa con un $p = 0,0314$ contra la radiación UV – B, inducida.

La obtención de una baja cantidad del principio activo de AE – 2, aislado de la planta *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel, dificultó la elaboración de preparados galénicos a otras concentraciones, pudiendo ser que a las concentraciones empleadas en los grupos experimentales no fueron suficientes para que el efecto antioxidante / fotoprotector, se expresara en su totalidad.

Esto no implica que la concentración elegida fuera inadecuada, ya que este ensayo fue la primera prueba que se realizó con el principio activo de AE – 2, y las concentraciones de los grupos de tratamiento fueron seleccionadas tomando en cuenta rangos de concentraciones en los cuales, según la literatura los flavonoides exhiben actividad antioxidante en una variedad de modelos *in vitro* [(Peña y cols., 2.001)⁷⁰; (Re y cols., 1.998)⁷⁶; (Romay y cols., 1.996)⁷⁸ y otros] e *in vivo* (Morquio y cols, 2.005)⁶³.



12. CONCLUSIONES

Efectuados los estudios en cada una de las muestras se ha podido llegar a las siguientes conclusiones:

Las dos especies vegetales de la región Altiplanica de Bolivia ubicada entre 3.000 y 4.000 m. s. n. m., presentan una actividad antioxidante / fotoprotectora, contra la radiación UV – B, con diferencias en cuanto su potencia según sea su época de recolección.

Las partes aéreas de la especie vegetal *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel, poseen mayor cantidad de principio activos según pruebas cromatograficas y reacción de DPPH.

Dentro de la especie vegetal *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel, existe mayor cantidad de principio activo en las hojas que en los tallos según el ensayo de ABTS.

El principio activo de Ácido Perlatolico se encuentra en todo el cuerpo vegetativo de la especie vegetal de *Stereocaulon ramulosum* Rausch.

El diseño metodológico empleado por (Vila y cols., 1.999)⁸⁹, para aislar y separar el principio activo (Ácido Perlatolico), fue modificado variando la temperatura y los solventes del proceso de cristalización / recristalización, obteniéndose mayor cantidad del principio activo.

El ensayo de DPPH, es un método sencillo que permite realizar determinaciones cualitativas así como determinaciones cuantitativas, además de poder ser empleado como revelador cromatografico.

El ensayo de ABTS, presenta la ventaja de ser estable en función de los solventes empleados para diferentes moléculas con polaridades diferentes.

Según el ensayo de ABTS, a medida que se van purificando las muestras de *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel, la capacidad antioxidante de las mismas se incrementa.

Por el ensayo de ABTS, se evidencia que el principio activo aislado de la especie vegetal *Stereocaulon ramulosum* Rausch, presenta una capacidad antioxidante menor respecto al patrón de quercetina.

Los principios activos de AE – 2 y Ácido Perlatolico, presentan una penetración a nivel de la superficie de la piel y el estrato córneo.

La base elegida es de tipo Cold – cream, por ser un vehículo para medicamentos tópicos y penetrantes.

Los ingredientes usados en esta base, son liposolubles (Cera de abeja, Alcohol cetílico), hidrosolubles (Agua, Propilenglicol), tenso – activos (Texapón), y conservadores (Nipagin, Nipasol).

Los preparados galénicos, son estables sin la presencia de la vitamina E, ya que este es un antioxidante que estabiliza la fase oleosa de la base.

La base elaborada (B¹³), fue sometida a todas las pruebas de estabilidad, mostrando ser la base ideal para este tipo de principios activos.

Los preparados galénicos de AE – 2 y Ácido Perlatolico preparados a una concentración del 5% y elaborados a partir de la base (B¹³), superaron todas las pruebas de estabilidad, mostrando ser estables.

Además los preparados galénicos de AE – 2 y Ácido Perlatolico preparados a una concentración del 5%, resultaron ser estables a cambios de presión atmosférica.

El tiempo de vida mínimo determinado para los preparados galénicos AE – 2 y Ácido Perlatolico en concentraciones del 5%, es de un periodo mínimo de tres meses y un máximo calculado aproximado de 1 año.

Los preparados galénicos de AE – 2 y Ácido Perlatolico a concentraciones del 5% disminuyen la cantidad del marcador (2,3 – DHBA) formado, al someter la piel del animal de experimentación a una radiación UV – B, por medio de una lámpara de luz ultravioleta.

El preparado galénico de AE – 2 elaborado a una concentración del 5%, mostró un efecto fotoprotector estadísticamente significativo con un $p = 0,0266$, contra la radiación UV – B, inducida en la piel del conejo.

Por otro lado el preparado galénico de Ácido Perlatolico elaborado a una concentración del 5%, mostró una diferencia significativa con un $p = 0,0314$ de efecto fotoprotector.

De acuerdo a todo lo expresado se acepta:

- ♠ Hipótesis alternativa H₁, los preparados galénicos de AE – 2 y Ácido Perlatolico, a la concentración del 5%, presentan un tiempo de vida mínimo aproximado de un año, manteniéndose estables.
- ♠ Hipótesis alternativa H₂, los preparados galénicos de AE – 2 y Ácido Perlatolico elaborados a una concentración del 5%, poseen un efecto fotoprotector, contra la radiación ultravioleta.



13. PROYECCIONES

Muchos estudios se han realizado sobre extractos de diferentes vegetales que poseen compuestos fenólicos, entre ellos flavonoides y dépsidos, esto debido a la constante búsqueda de fitofármacos para la prevención y tratamiento de diferentes tipos de cáncer de piel producidos por la radiación UV – B, no siendo el estudio de la *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel y *Stereocaulon ramulosum* Rausch una excepción.

La razón de no dar la explotación que merecen estas especies vegetales, es por el desconocimiento de sus propiedades, que han sido conocidas desde antes como remedios tradicionales, siendo un referente para su aplicación en la medicina.

El conocimiento de la composición total de los componentes de los extractos crudos de *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel y *Stereocaulon ramulosum* Rausch, ayudarían a orientar a priori en los resultados:

- ♣ Según la cantidad en que estén presentes, afinar la determinación de las concentraciones adecuadas para alcanzar los efectos esperados.
- ♣ Elaborar otras posibles formas galénicas para estos extractos crudos o los principios activos aislados.

Es por ello que deben realizarse más investigaciones que respalden los efectos y que ayuden a precisar los mecanismos de acción y las concentraciones a las cuales los flavonoides y los dépsidos, son terapéuticamente útiles.

Realizar estudios en modelos biológicos respecto a la seguridad del uso de estas cremas, destinadas al cuidado de la piel.

Todo ello para la producción de fitofármacos provenientes de estos extractos que sean más económicos y con menores efectos colaterales en comparación de los medicamentos alopáticos.

Incentivando la realización de trabajos de investigación que estén enmarcados al estudio de productos naturales, siendo que la utilización de estos es una práctica social vigente en nuestros días.

14. BIBLIOGRAFIA

1. **AGOSTINI, L. MORÓN, M. RAMÓN, A. AYALA, A.**, “Determinación de la capacidad antioxidante de flavonoides en frutas y verduras frescas y tratadas térmicamente”, ALAN, 2004, **54**: passim.
2. **ALBORNOZ, A.**, “Productos Naturales”, Caracas – Venezuela, PUBLICACIONES DE LA UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA, 1ª ed, s/f, pp. 241 – 265, 357 – 445, 457 – 474.
3. **AMOROSA, M.**, “Principi di Tecnica Farmaceutica”, Bologna – Italia, LIBRERÍAS UNIVERSITARIA L. TINRELLI, 4ª ed, 1992, pp. 324 – 325.
4. **AQUINO, R. MORELLI, S. TOMAINO, A. PELLEGRINO, M. SAIJA, A. GRUMETTO, L. PUGLIA, C. VENTURA, D. BONINA, F.**, “Antioxidant and photoprotective activity of a crude extract of *Culcitiun reflexum* H. B. K. leaves and their major flavonoids”, Journal of Ethnopharmacology, 2002, **79**: 183 – 191.
5. **ARREDONDO, F. BLASINA, F. ECHEVERRI, C. MORQUIO, A. FERREIRA, M. ABIN, J. LAFON, L. DAJAS, F.**, “Cytoprotection by *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C. and some of its main flavonoids against oxidative stress”, Journal of Ethnopharmacology, 2004, **91**: 13 – 20.
6. **AUDDY, B. FERREIRA, M. BLASINA, F. LAFON, L. ARREDONDO, F. DAJAS, F. TRIPATHI, P. SEAL, T. MUKHERJEE, B.**, “Screening of antioxidant activity of three Indian medicinal plants, traditionally used for the management of neurodegenerative diseases”, Journal of Ethnopharmacology, 2003, **84**: 131 – 138.
7. **AZCON, J. TALON, M.**, “Fisiología y Bioquímica Vegetal”, Madrid – España, INTERAMERICANA Mc - GRAW – HILL, 1ª ed, 1993. pp. 250 – 262.
8. **BASELT, R. CRAVEY, R.**, “Disposition of toxic drugs and chemicals in man”, U. S. A., FOSTER CITY – CALIFORNIA, 4ª ed, 1995, pp. 254 – 665.
9. “Biotecnología para el uso Sostenible de la Biodiversidad”, Caracas – Venezuela, 1ª ed, 2005, passim.
10. **BJERKE, J. LERFALL, K. ELVEBAKK, A.**, “Effects of ultraviolet radiation and PAR on the content of usnic and divaricatic acids in two arctic – alpine lichens”, Photochem. Photobiol. Sci, 2002, **1**: 678 – 685.
11. **BÖHM, K.**, “Los Flavonoides”, Alemania, EDITIO CANTOR KG – AULENDORF I. WÜRTT, 1ª ed, 1967, passim.



12. **BONINA, F. LANZA, M. MONTENEGRO, L. PUGLISI, C. TOMAINO, A. TROMBETTA, D. CASTELLI, F. SAIJA, A.**, “Flavonoids as potencial protective agents against photo – oxidative skin damage”, *International Journal of Pharmaceutics*, 1996, **145**: 87 – 94.
13. **BRACA, A. DE TOMMASI, N. DI BARI, L. PIZZA, C. POLITI, M. MORELLI, I.**, “Antioxidant principles from *Bauhinia tarapotensis*”, *Journal of Natural Products*, 2001, **64**: 892 – 894.
14. **CHRISTENSEN, T. BRUHN, T. BALCHEN, T. DIEMER, N.** “Evidence for hydroxyl radical formation during reperfusion alter global cerebral ischemia in rats using salicylate trapping and microdialysis”, *Neurobiology of Disease*, 1998, **1**: 131 – 138.
15. **CIOFFI, G. D’ AURIA, M. BRACA, A. MENDEZ, J. CASTILLO, A. MORELLI, I. DE SIMONE, F. DE TOMMASI, N.**, “Antioxidant and free – radical scavenging activity of constituents of the leaves of *Tachigalia paniculata*”, *Journal of Natural Products*, 2002, **65**: 1526 – 1529.
16. **CODINA, C.**, “Metabolismo Secundario de las Plantas”, Barcelona – España, PUBLICACIONES DE LA UNIVERSIDAD DE BARCELONA, 1^a ed, 1993, pp. 1 – 22, 44 – 56.
17. **COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS**, “Directrices sobre Calidad, Seguridad y Eficacia de los Medicamentos de Uso Humano”, 1989, pp. 21.
18. **COUDRAY, C. FAVIER, A.**, “Determination of salicylate hidroxylation products as an *in vivo* Oxidative Stress Marker”, *Free Radical Biology & Medicine*, 2000, **29**: 1064 – 1070.
19. **CUÉLLAR, A.**, “Química de los Fármacos Naturales”, Habana – Cuba, DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, 1^a ed, 1983, pp. 1 – 38.
20. **DAJAS, F. RIVERA, F. BLASINA, F. ARREDONDO, F. ABÍN, A. COSTA, G. ECHEVERRY, C. LAFÓN, L. HEINZEN, H. FERREIRA, M. MORQUIO, A.**, “Neuroprotection by flavonoids”, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2003, **36**: 1613 – 1620.
21. **DAY, T. NEALE, P.**, “Effects of UV – B radiation on terrestrial and aquatic primary producers”, *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 2002, **33**: 371 – 396.
22. **DAY, T. RUHLAND, C. XIONG, F.**, “Influence of solar ultraviolet – B radiation on Antarctic terrestrial plants: results from a 4 – year field study”, *Journal of Photochemistry and Photobiology B. Biology*, 2001, **62**: 78 – 87.

23. **DE LA TORRE Y CALLEJAS, S.**, “Manual Básico de Microtecnia Biológica”, Habana – Cuba, EDITORIAL REVOLUCIONARIA, 1ª ed, s/f, pp. 9 – 166.
24. **DE OLIVEIRA, T. NAGEM, T. DA SILVA, M. GUEDES DE MIRANDA, LUIZ. TEIXEIRA, M.** “Ação antioxidante de flavonóides modificados”, *Pesq. Agropec. bras.*, Brasília, 1999, **34**: 879 – 883.
25. **DESMARCHELIER, C. BARROS, S. REPETTO, M. RIBEIRO, L. KATO, M. COUSSIO, J. CICCIA, G.** “4 – Nerolidylcatechol from *Pothomorphe* Spp. scavenges peroxy radicals and inhibits Fe (II) – dependent DNA damage”, *Planta Med.*, 1997, **63**: 561 – 563.
26. **DESMARCHELIER, C. BUSTAMANTE, J. GIL, R. COUSSIO, J. CICCIA, G. SILVA, G.**, “Profisetinidin type tannins responsible for antioxidant activity in *Copaifera reticulata*”, *Pharmazie*, 2001, **56**: 573 – 577.
27. **DESMARCHELIER, C. CICCIA, G. COUSSIO, J.**, “Recent advances in the search for antioxidant activity in south American plants”, *Studies in Natural Products Chemistry*, 2000, **22**: 343 – 367.
28. **DESMARCHELIER, C. COUSSIO, J. CICCIA, G.**, “Antioxidant and free radical scavenging effects in extracts of the medicinal herb *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (“marcela”)”, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 1998, **31**: 1163 – 1170.
29. **DESMARCHELIER, C. COUSSIO, J. CICCIA, G.**, “Extracts of Bolivian plants, *Copaifera reticulata* and *Heisteria pallida* inhibit *in vitro* free radical – mediated DNA damage”, *Phytotherapy Research*, 1997, **11**: 460 – 462.
30. **DESMARCHELIER, C. LISBOA, R. COUSSIO, J. CICCIA, G.**, “Antioxidant and free radical scavenging activities in extracts from medicinal trees used in the “Caatinga” region in northeastern Brazil”, *Journal of Ethnopharmacology*, 1999, **67**: 69 – 77.
31. **DESMARCHELIER, C. MONGELLI, E. COUSSIO, J. CICCIA, G.**, “Evaluation of the *in vitro* antioxidant activity in extracts of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC.”, *Phytotherapy Research*, 1997, **11**: 254 – 256.
32. **DESMARCHELIER, C. MONGELLI, E. COUSSIO, J. CICCIA, G.**, “Inhibition of lipid peroxidation and iron (II) – dependent DNA damage by extracts of *Pothomorphe peltata* (L.) Miq. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 1997, **30**: 85 – 91.
33. **DESMARCHELIER, C. NOVOA, M. COUSSIO, J. CICCIA, G. BOVERIS, A.**, “Antioxidant and prooxidant activities in aqueous extracts of Argentine plants”, *International Journal of Pharmacognosy*, 1997, **35**: 116 – 120.



34. **DESMARCHELIER, C. WITTING, F. COUSSIO, J. CICCIA, G.**, "Effects of Sangre de Drago from *Croton lechleire* Muell.- Arg. on the production of active oxygen radicals", *Journal of Ethnopharmacology*, 1997, **58**: 103 – 108.
35. **DEWICK, P.**, "Chimica, Biosintesi e Bioattività delle Sostanze Naturali", Padova, PICCIN NUOVA LIBRARIA S. p. A., 1^a ed, 2001, pp. 109 – 142.
36. **DOMÍNGUEZ, X.**, "Métodos de Investigación Fitoquímica", México, EDITORIAL LIMUSA S. A., 1^a ed, 1973, pp. 15 – 81.
37. **EDWARDS, H. NEWTON, E. WYNN, D.**, "Molecular structural studies of lichen substances II: atranorin, gyrophoric acid, fumarprotoceatraric acid, rhizocarpic acid, calycin, pulvinic dilactone and usnic acid", *Journal of Molecular Structure*, 2003, **xx**: 1 – 11.
38. "Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos", México, MEXICO D. F., 5^a ed, 1988, pp. 866.
39. **FERNANDEZ, E. REYES, A. HIDALGO, M. QUILHOT, W.**, "Photoprotector capacity of lichen metabolites assessed through the inhibition of the 8 – methoxypsoralen photobinding to protein", *Journal of Photochemistry and Photobiology B. Biology*, 1998, **42**: 195 – 201.
40. **FONT, P.**, "Medicamentos Guía Teórico – Practica", Barcelona – España, EDIT LABOR S. A., 7^a ed, 1969, pp 157 – 160.
41. **FONT, P.**, "Plantas Medicinales el Dioscórides Renovado", Barcelona – España, EDIT LABOR S. A., 5^a ed, 1993, passim.
42. **GARCIA, M. PASCUAL, S. SANTOS, C. RIVAS, J.** "Evaluation of the antioxidant properties of fruits", *Food Chemistry*, 2003, **xx**: 1 – 6.
43. **GATTUSO, M. GATTUSO, S.**, "Manual de Procedimientos para el Análisis de Drogas en Polvo", Argentina, U. N. R. EDITORIA, 1^a ed, 1999, pp. 5 – 48.
44. **GIANNI, P.**, "Química Cosmética", Milano, EDITORIAL SINERGA, 1^a ed, 1991, passim.
45. **GRÖNIGER, A. SINHA, R. KLISCH, M. HÄDER, D.**, "Photoprotective compounds in cyanobacteria, phytoplankton and macroalgae – a database", *Journal of Photochemistry and Photobiology B. Biology*, 2000, **58**: 115 – 122.
46. **GROOTVELD, M. HALLIWELL, B.**, "2, 3 – Dihydroxybenzoic acid is a product of human aspirin metabolism", *Biochemical Pharmacology*, 1987, **37**: 271 – 280.



- 47. GROS, E. SELDES, A. BURTON, G.**, "Introducción al Estudio de los Productos Naturales", Washington, D. C., ORGANIZACIÓN DE LOS ESTADOS AMERICANOS, Monografía no.30, 1985, pp. 3 – 36, 47 – 77.
- 48. IACHINI, A. BONADEO, I.**, "Tecnología Cosmética – Corso di Prodotti Cosmetici", Milán – Italia, LIBRERÍA CORTINA, 2ª ed, 1973, pp. 29 – 32.
- 49. INGELMAN, M. KAUR, H. TERELIUS, Y. PERSSON, J. HALLIWELL, B.**, "Hydroxylation of salicylate by microsomal fractions and cytochrome P – 450", *Biochem. J.*, 1991, **276**: 753 – 757.
- 50. INZE, D. VAN MONTAGU, M.**, "Oxidative Stress in Plants", *Current Opinion in Biotechnology*, 1995, **6**: 153 – 158.
- 51. KUKLINSKI, C.**, "Farmacognosia", Barcelona – España, EDICIONES OMEGA S. A., 1ª ed, 2003, pp. 354 – 366.
- 52. LAPA, J. SOUCCAR, C. LIMA, M. MONTEIRO DE LIMA, T.**, "Métodos de evaluación de la actividad farmacología de las plantas medicinales", Rivaplamed, CYTED, 2001, pp. 70 – 90.
- 53. LIEBERMAN, H. RIEGER, M. BANKER, G.**, "Pharmaceutical Dosage Forms", U. S. A., MARCEL DEKKER, 2ª ed, 1996, pp. 53 – 89; 437 – 514
- 54. LOCK DE UGAZ, O.**, "Investigación Fitoquímica", Perú, FONDO EDITORIAL DE LA PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DEL PERU 1ª ed, 1988, pp. 1 – 19, 91 – 138.
- 55. LUBOWE, I.**, "Conservación y cuidado del Cutis y la piel", Barcelona – España, "El Mueble" S. A., 1ª ed, 1970, passim.
- 56. MANITTO, P.**, "Biosíntesis of Natural Products", New York, ELLIS HORWOOD LIMITED, 1ª ed, 1981, pp. 365 – 424.
- 57.** "Manual de Fitoquímica", Tucumán, Instituto de Estudios Vegetales, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, U. N. T., pp. 1 – 18.
- 58. MARKHAM, K. TANNER, G. CAASI, M. WHITECROSS, M. NAYUDU, M. MITCHELL, K.**, "Possible protective role for 3', 4'- Dihydroxyflavones induced by enhanced UV – B in a UV – tolerant rice cultivar", *Phytochemistry*, 1998, **49**: 1913 – 1919.
- 59. MARTINEZ, S. GONZALES, J. CULEBRAS, J. TUÑÓN, M.** "Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes", *Nutr. Hosp.*, 2002, **6**: 271 – 278.

60. **MAYSER, P. SCHÄFER, U. KRÄMER, H. IRLINGER, B. STEGLICH, W.**, "Pityriacitrin – an ultraviolet – absorbing indole alkaloid from the yeast *Malassezia furfur*", Arch Dermatol Res, 2002, **294**: 131 – 134.
61. **MOLLINEDO, P. SALCEDO, L. VILA, J. FERREIRA, M. DAJAS, F. ALMANZA, G.**, "Evaluation of the antioxidant capacity of three Bolivian plant species", Revista Boliviana de Química, 2001, **18**: 59 – 64.
62. **MONGELLI, E. DESMARCHELIER, C. RODRIGUEZ, J. COUSSIO, J. CICCIA, G.** " *In vitro* antioxidant and cytotoxic activity of extracts of *Baccharis coridifolia* DC.", Journal of Ethnopharmacology, 1997, **58**: 157 – 163.
63. **MORQUIO, A. RIVERA, F. DAJAS, F.**, "Photoprotection by topical application of *Achyrocline satureioides* ("Marcela")", Phytotherapy Research, 2005, **19**: 1 – 4.
64. **MUÑOZ, I. SOTO, V.** "Determinación de la capacidad protectora de antocianinas de un extracto de *Vitis vinifera* en aortas de ratas sometidas a stress oxidativo", (TESIS), Universidad de Chile, 2005, passim.
65. **NEITZKE, M. THERBURG, A. FRANZARING, J.**, "Untersuchungen zur UV – B toleranz andiner pflanzen entlang eines höhengradienten", Juergen Franzaring UV – B: ARG, 2003, **002**: 1 –10.
66. **NOGUEIRA, L. CORREIA, A. MORGADO, R.**, "Técnica Farmacéutica e Farmacia Galénica", Lisboa – Portugal, EDITTORIAL FUNDACAO CALOUSTE GULBEKIAN, 2^a ed, 1983, passim.
67. **OHKAWA, H. OHISHI, N. YAGI, K.**, "Assay for lipid peroxides in animal tisúes by thiobarbituric acid reaction", Analytical Biochemistry, 1979, **95**: 351 – 358.
68. **PAREJA, B. BANARER, M.**, "Farmacotecnia", Lima – Perú, CAMPODONICO EDICIONES S. A., 1^a ed, 1967, pp. 100 – 150, 361 – 388.
69. **PECSOK, R. SHIELDS, L.**, "Métodos Modernos de Análisis Químico", México, EDITORIAL LIMUSA, 5^{ta} reimp, 1990, pp. 49 – 130.
70. **PEÑA, L.**, "Detección, purificación e identificación de productos naturales con actividad antioxidante", Yucatán, CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, 1^a ed, 2001, passim.
71. **PEÑALOSA, R.**, "Guía de Trabajos Prácticos Análisis por Instrumentación", La Paz – Bolivia, 4^{ta} ed, 2002, passim.



- 72. PÉREZ, G.**, "Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes", *Rev. Cubana Invest. Biomed.*, 2003, **22**: passim.
- 73. PINZON, R. GUPTA, M. SAN ROMÁN DEL BARRIO, L.**, "Manual de técnicas de investigación", Proyecto X – 1.- Subprograma X: CYTED, 1995. pp. 109 – 127, 195 – 207.
- 74. QUILHOT, W. FERNANDEZ, E. RUBIO, C. GODDARD, M. HIDALGO, M.**, "Lichen secondary products and their important in environmental studies", M. P. Marcelli & M. R. D. Seaward (Eds) *Lichenology in Latin America: history, current knowledge and applications*: 1998, passim.
- 75. RANCAN, F. ROSAN, S. BOEHM, K. FERNANDEZ, E. HIDALGO, M. QUIHOT, W. RUBIO, C. BOEHM, F. PIAZENA, H. OLTMANN, U.**, "Protection against UVB irradiation by natural filters extracted from lichens", *Journal of Photochemistry and Photobiology B. Biology*, 2002, **68**: 133 – 139.
- 76. RE, R. PELLEGRINI, N. PROTEGGENTE, A. PANNALA, A. YANG, M. RICE, C.** "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization", *Food Chemistry*, 1998, **xx**: 1231 – 1236.
- 77. RIVERA, F. URBANAVICIUS, J. GERVAZ, E. MORQUIO, A. DAJAS, F.** "Some aspects of the in vivo neuroprotective capacity of flavonoids: bioavailability and structure – activity relationship", *Neurotoxicity Research*, 2004, **6**: 543 – 553.
- 78. ROMAY, C. PASCUAL, C. LISSI, E.**, "The reaction between ABTS radical cation and antioxidant status of serum samples", *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 1996, **29**: 175 – 183.
- 79. ROZEMA, J. BJÖRN, L. BORNMAN, J. GABERSCIK, A. HÄDER, D. TROST, T. GERM, M. KLISCH, M. GRÖNIGER, A. SINHA, R. LEBERT, M. HE, Y. BUFFONI, R. BAKKER, N. VAN DE STAAIJ, J. MEIJKAMP, B.**, "The role of UV – B radiation in aquatic terrestrial ecosystems – an experimental and functional analysis of the evolution of UV – absorbing compounds", *Journal of Photochemistry and Photobiology B. Biology*, 2002, **66**: 2 – 12.
- 80. SÁNCHEZ, L. LANCHIPA, P. PANCORBO, J. REGIS, A. SÁNCHEZ, E.**, "Fotoprotectores Tópicos", *Revista Peruana de Dermatología*, 2002, **12**: passim.
- 81. SHUBERT, N.**, "Mecanismos de fotoprotección en algas rojas de interés comercial de Bahía de los Ángeles (Golfo de California, México)", *UABC*, 2003, **34**: passim.

- 82. STROLIN, M. BROGIN, G. BANI, M. OESCH, F. HENGSTLER, J.** "Association of cytochrome P450 induction with oxidative stress *in vivo* as evidenced by 3 – hydroxylation of salicylate", *Xenobiotica*, 1999, **29**: 1171 – 1180.
- 83. TABATABAEI, A. ABBOTT, F.** "LC/MS analysis of hydroxylation products of salicylate as an indicator of *in vivo* oxidative stress", *Free Radic Biol Med*, 1999, **26**: 1054 – 1058.
- 84. TESKE, M. TRENTINI, A.**, "Compendio de Fitoterapia", Curitiba – Pr –Brasil, HERBARIUM LABORATORIO BOTANICO S. A., 2ª ed, 1995, *passim*.
- 85. TORSSELL, K.**, "Natural Product Chemistry", New York, JOHN WILEY & SONS LIMITED, 1ª ed, 1983, pp. 107 – 164.
- 86. TRAVEN, B.**, "How to make your own cosmetics", U. S. A., EDITORIAL HEWITT HOUSE, 4ª ed, 1971, pp. 75 – 78.
- 87. TREASE, G. EVANS, W.**, "Farmacognosia", México, INTERAMERICANA Mc – GRAW – HILL, 13ª ed, 1991, pp. 401 – 454.
- 88. VAN DEN BERG, R. HAENEN, G. VAN DEN BERG, H. BAST, A.**, "Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures", *Food Chemistry*, 1999, **66**: 511 – 517.
- 89. VILA, J. GIMENEZ, A.**, "Estudio Fitoquímico del *Stereocaulon ramulosum* Rausch", *Revista Boliviana de Química*, 1999, **16**: *passim*.
- 90. VILLAGRAN, C. ROMO, M. CASTRO, V.** "Ethnobotany of the southern Andes within the first region of Chile: A Connection Between Altiplano Cultures and the High Canyons of the Superior Loa", *Revista Antropológica Chilena*, 2003, **35**: 73 – 124.
- 91. VITALE, MARÍA.**, "Fotoprotección: Conceptos Básicos y Actualización", *Revista Peruana de Dermatología*, 2002, **12**: *passim*.
- 92. VOIGT, R.**, "Tratado de Tecnología Farmacéutica", Zaragoza – España, EDITORIAL ACRIBIA, 3ª ed, 1971, pp. 95 – 98, 361 – 364.
- 93. ZARATTI, F. FORNO, N. GARCIA FUENTES, J.**, "Ethythemally weighted UV variations at two high – altitude locations", *Journal of Geophysical Research*, 2003, **108**: 1 – 6.



ALEXOS





ANEXO 1

GENERACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXIGENO

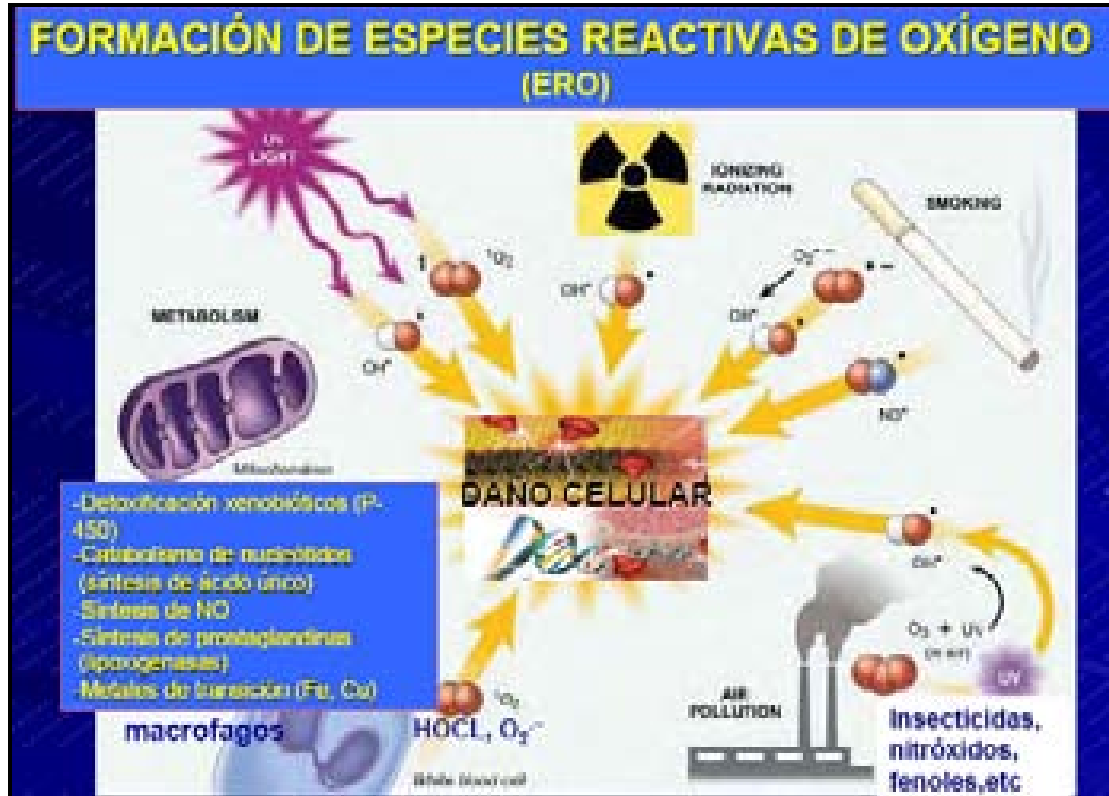


FIGURA 1. Factores que influyen en la Generación de Especies Reactivas de Oxígeno (EROs).

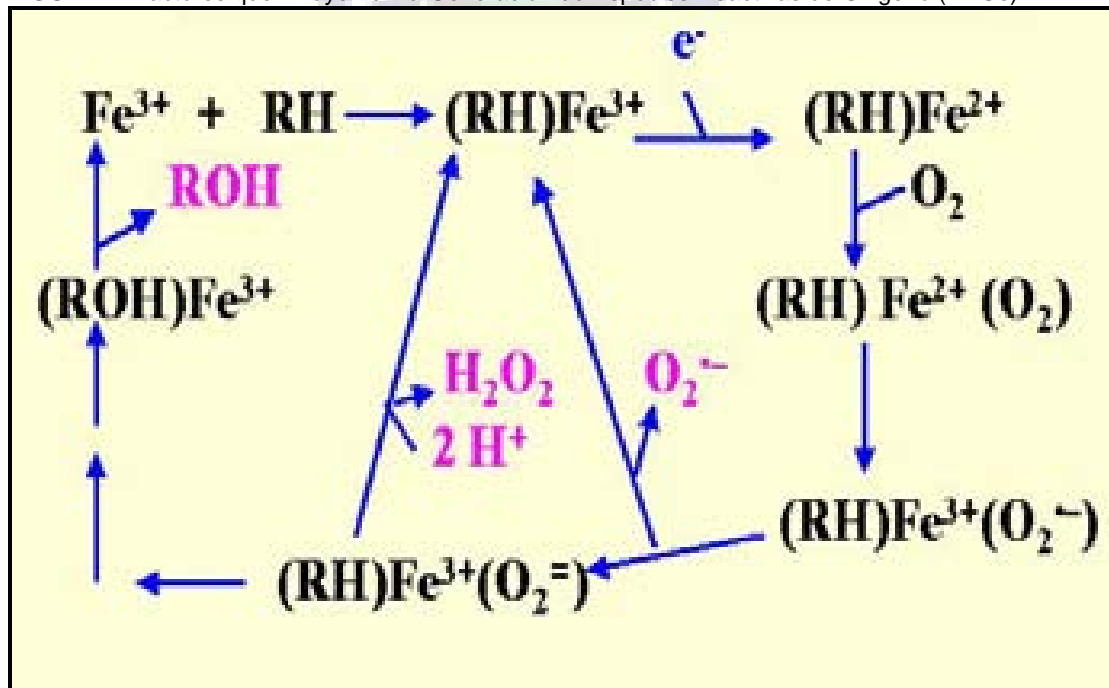


FIGURA 2. Generación de EROs, a partir del mecanismo de acción del citocromo P – 450, en los seres humanos.

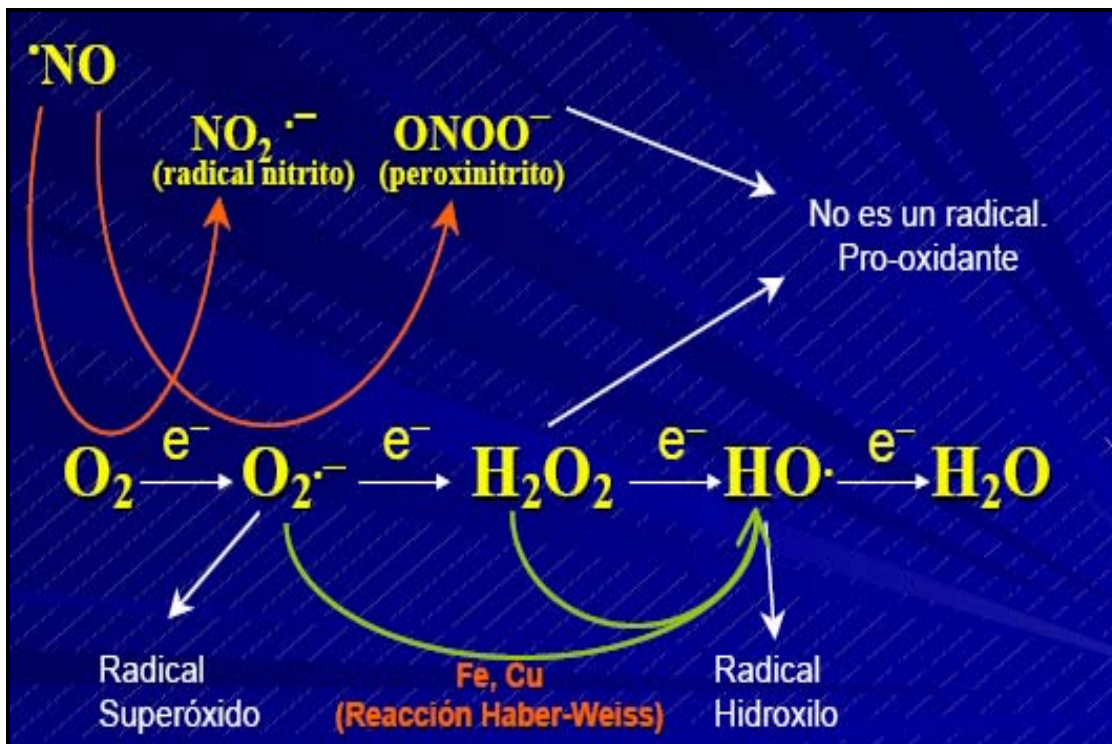


FIGURA 3. Generación de Especies Reactivas de Oxígeno (EROs).

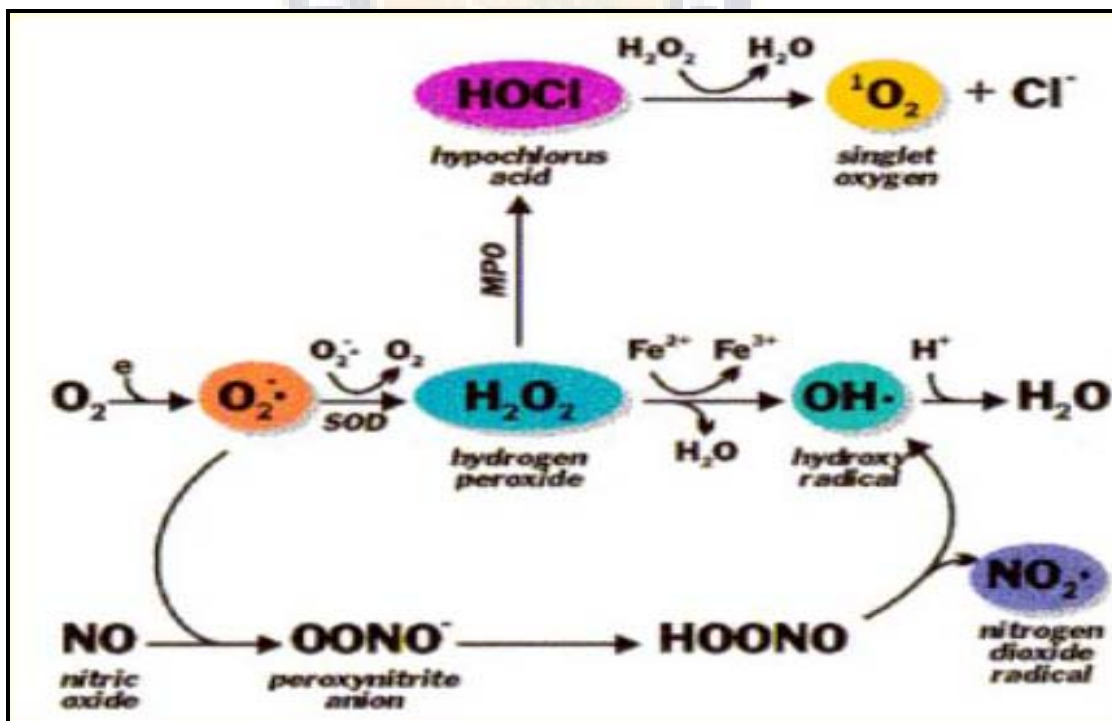


FIGURA 4. Mecanismo de Generación de Especies Reactivas de Oxígeno (EROs).



ANEXO 2

METABOLITOS TIPO FLAVONOIDES

BIOSINTESIS DE FLAVONOIDES

Los flavonoides se forman en las plantas, a partir de la combinación de las vías biosintéticas, del ácido shikímico y del malonil – CoA.

El compuesto obtenido por la vía biosintética del ácido shikímico p. Ej. Ácido cinámico, es luego utilizado como compuesto de partida para la vía del malonil – CoA, en la cual se le adicionan tres acetatos. Con la posterior ciclación se obtiene la estructura clásica de los flavonoides, donde el anillo A se formó por la vía del malonil – CoA, mientras que el anillo B se formó por la vía del ácido shikímico, y el puente de tres carbonos proviene de la adición de fosfoenolpiruvato. Con sucesivas hidroxilaciones y reducciones se forman los diferentes flavonoides, con la opción de una glicosidación final.⁽⁸⁵⁾

ESTRUCTURA QUÍMICA

El estado de oxidación del anillo central es determinante para la formación de varios grupos estructurales.

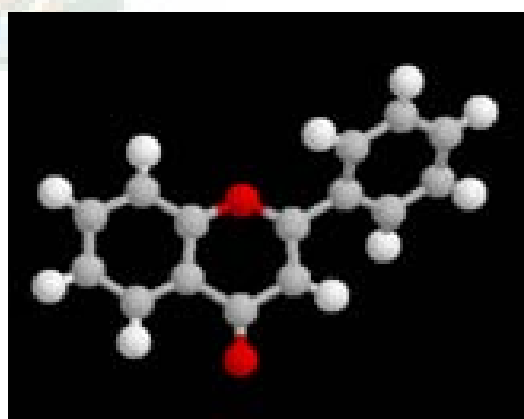
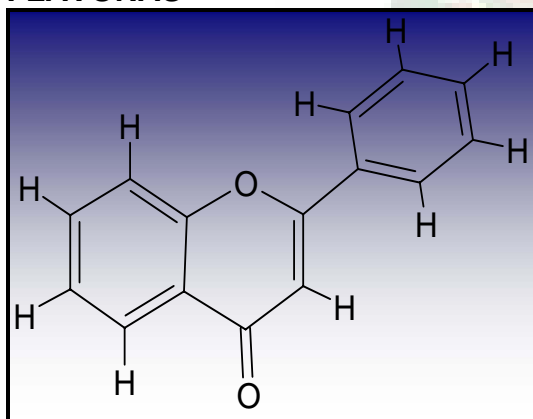
La estructura base puede presentar hidroxilos, metoxilos, estar O – glicosidada o estar C – glicosidada.

En general el anillo A presenta hidroxilos, y no metoxilos, los cuales se ubican mayormente en 7 y 5.

El anillo B en cambio presenta 1, 2 o 3 hidroxilos o metoxilos, los cuales se ubican de la siguiente manera:

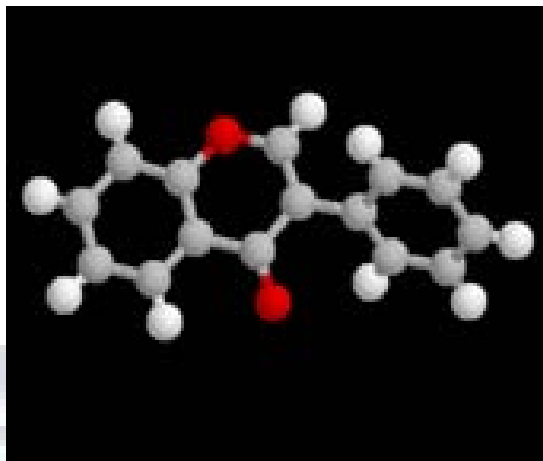
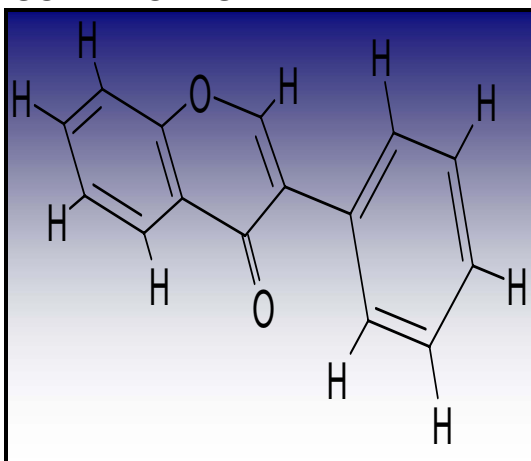
- ♣ si hay un solo hidroxilo / metoxilo se ubica en la posición 4'.
- ♣ si hay dos hidroxilos / metoxilos se ubican en las posiciones 3' y 5'.
- ♣ si hay tres hidroxilos / metoxilos se ubican en las posiciones 3', 4' y 5'.

ESTRUCTURAS TIPO DE LOS FLAVONOIDES CARACTERISTICOS FLAVONAS

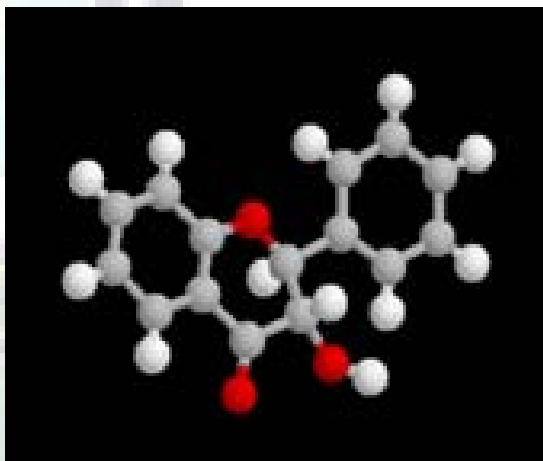
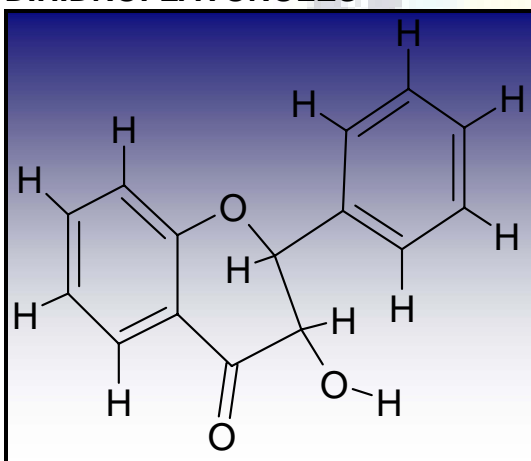




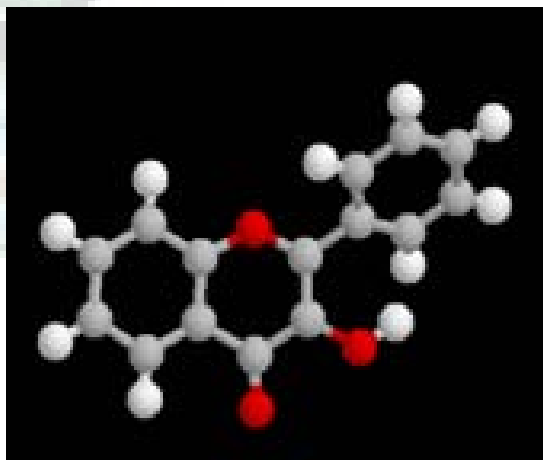
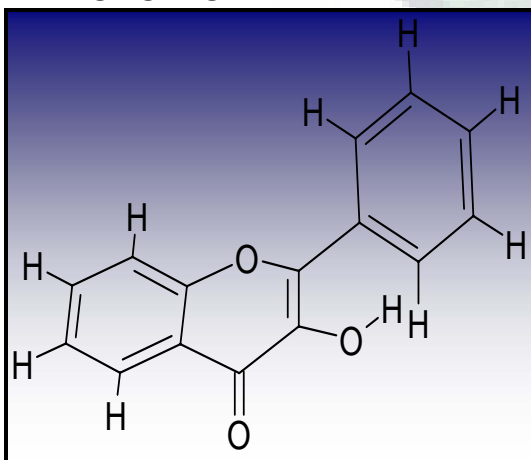
ISOFLAVONAS



DIHIDROFLAVONOLES

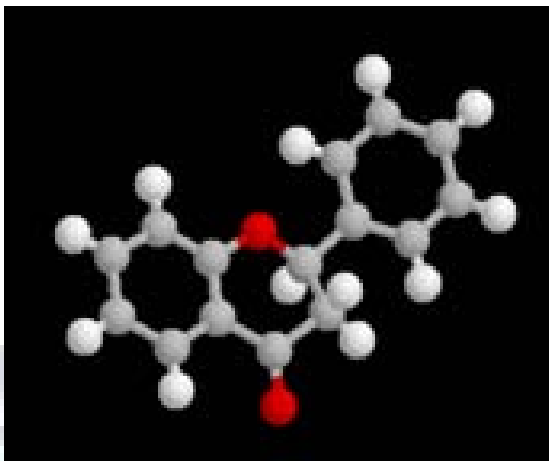
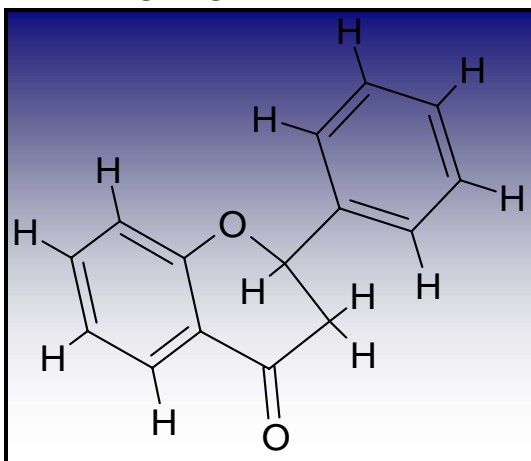


FLAVONOLES

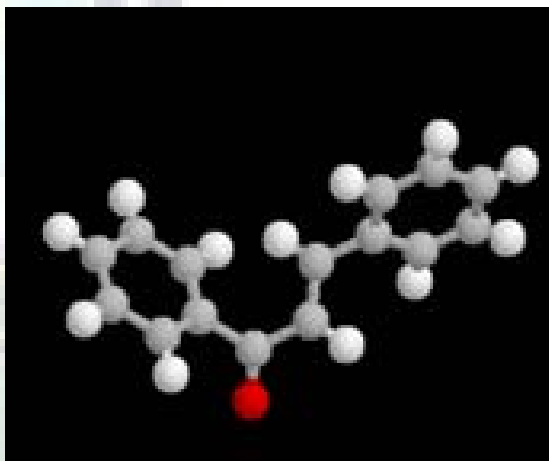
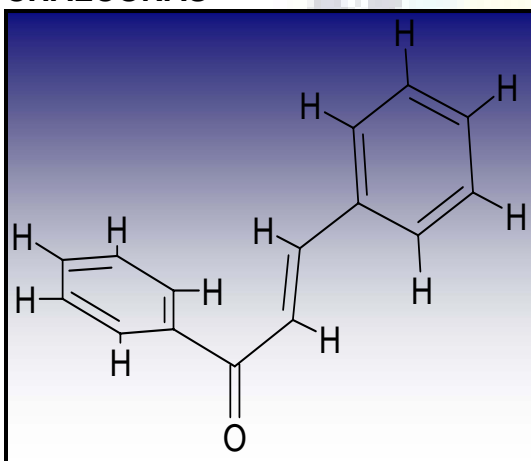




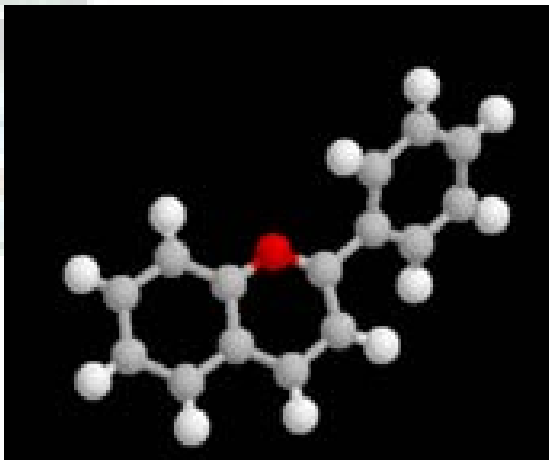
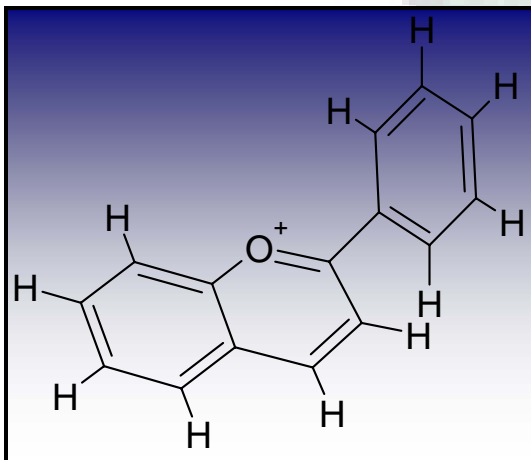
FLAVANONAS



CHALCONAS



ANTOCIANINA





ANEXO 3

METABOLITOS LIQUENICOS

BIOGENESIS DE LOS METABOLITOS LIQUENICOS

Los metabolitos liquénicos se forman a partir de la ruta de la Malonil – CoA y en sus etapas iniciales, la ruta biosintética es similar para todos ellos, formándose cadenas de policetidos de longitud variable, pero con por lo menos cuatro unidades de acetato, con uniones cabeza – cola.⁽¹⁶⁾

La biosíntesis involucra una ciclización, que puede ser de dos tipos:

♣ **CICLIZACIÓN TIPO ÁCIDO ORSELLINICO**

Conduce a la formación de un derivado del ácido orsellinico, el cual a su vez se constituye en precursor para la biosíntesis de dépsidos, tridépsidos, tetradépsidos, depsidonas, depsonas, éteres diarílicos, esteres bencilicos y dibenzofuranos.

En una última fase, el derivado del ácido orsellinico experimenta condensaciones bi, tri y hasta tetramoleculares. Si el derivado del ácido orsellinico experimenta directamente estas reacciones, se obtienen derivados de la serie del orcinol (p – dépsidos, m – dépsidos, tridépsidos, tetradépsidos, depsidonas, depsonas, éteres diarílicos y dibenzofuranos).

Si el precursor es el propio ácido orsellinico, constituido por cuatro unidades de acetato, puede experimentar una sustitución C₁ en la posición 3, que da lugar finalmente a derivados del β – orcinol (p – dépsidos, m – dépsidos, depsidonas y esteres bencilicos).⁽⁵⁶⁾

♣ **CICLIZACIÓN TIPO FLOROGLUCINOL**

A partir de un tetracetido, con una sustitución C₁ en la posición 3 del mismo, dando lugar a la formación de un derivado del floroglucinol, la 3 – metilfloroacetofenona, que por posterior condensación bimolecular origina los ácidos úsnicos.⁽⁵⁶⁾

CLASIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS LIQUÉNICOS

Muchos de los metabolitos secundarios liquénicos manifiestan carácter ácido, aunque no necesariamente posean grupos funcionales típicamente acidicos, de ahí la denominación vulgar de Ácidos Liquénicos. La variedad estructural de los metabolitos liquénicos presenta doce grandes grupos:

- ♣ Ácidos Carboxílicos.
- ♣ Antraquinonas y Compuestos con relación biogenética.
- ♣ Compuestos Fenólicos Mononucleares.
- ♣ Cromonas.
- ♣ Depsidonas y Depsonas.
- ♣ Dépsidos, Tridépsidos y Tetradépsidos.
- ♣ Dibenzofuranos y Compuestos con relación biogenética.
- ♣ Esteres Bencilicos.
- ♣ Éteres Diarílicos.
- ♣ Xantonas.



Los metabolitos liquénicos se pueden clasificar también según su relación biogenética. Siendo:

♣ **Metabolitos Generados por la Ruta Malonil – CoA**

- ♣ **Ácidos Carboxílicos:** Ácidos alifáticos superiores ($C_{17} - C_{23}$), como: Ácido liquesterínico, Ácido rangifórmico y el Ácido roccellico.
- ♣ **Ácidos Úsnicos:** Derivados tipo floroglucinol, como el ácido úsnico.
- ♣ **Antraquinonas:** Emodina, y la Fragilina.
- ♣ **Compuestos Fenólicos Mononucleares:** Derivados primarios del Ácido orsellínico, como el Orcinol y el Ácido rizonico.
- ♣ **Cromonas:** Sifulina y la Sordidona.
- ♣ **Depsidonas y Depsonas:** Derivados de esteres cíclicos. Ácido lobarico, depsidona de tipo orcinol o el ácido psorómico, depsidona de tipo β – orcinol. como. El ácido picrolíquénico, depsona de la serie del orcinol.⁽³⁷⁾
- ♣ **Dépsidos, Tridépsidos, Tetradépsidos:** Dépsidos, (p – dépsidos y m – dépsidos) esteres diarílicos de tipo orcinol, como el ácido lecanorico, o de tipo β – orcinol, como el ácido tamnolico. Tridépsidos, esteres triarílicos de tipo orcinol, como el ácido umbilicarico.
- ♣ **Dibenzofuranos:** Derivados de ácidos carboxílicos fenólicos de tipo orcinol, como el ácido porfirilico.
- ♣ **Esteres Bencílicos:** Ácido alectorialico y Ácido barbatolico, de la serie del β – orcinol.
- ♣ **Eteres Diarílicos:** Ácido epiforélico 1, tipo orcinol.
- ♣ **Xantonas:** Ácido tiofanico y el Liquexantona.

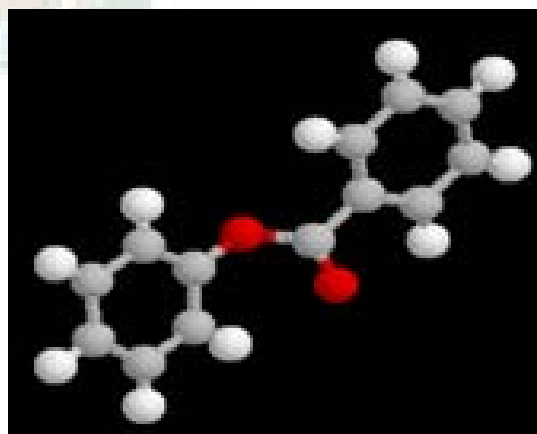
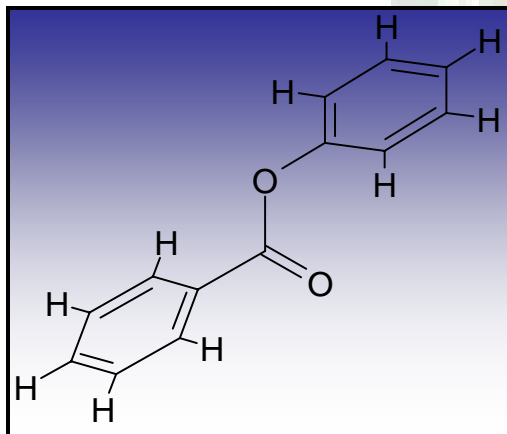
♣ **Metabolitos Generados por la Ruta del Ácido Mevalónico**

- ♣ **Carotenoides:** β – caroteno, γ – caroteno, Violaxantina y Xantofila.
- ♣ **Esteroles:** β – sitosterol, Ergosterol y Fungisterol.
- ♣ **Terpenos:** Incluyen diterpenos, como el 16 – α – hidroxikaurano, y triterpenos como el Ácido leucotilico.

♣ **Metabolitos Generados por la Ruta del Ácido Shiquímico**

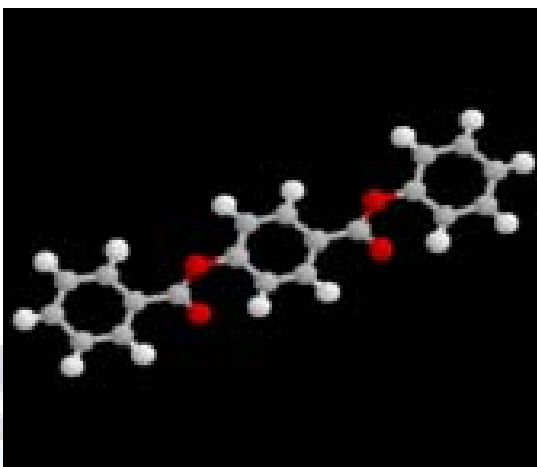
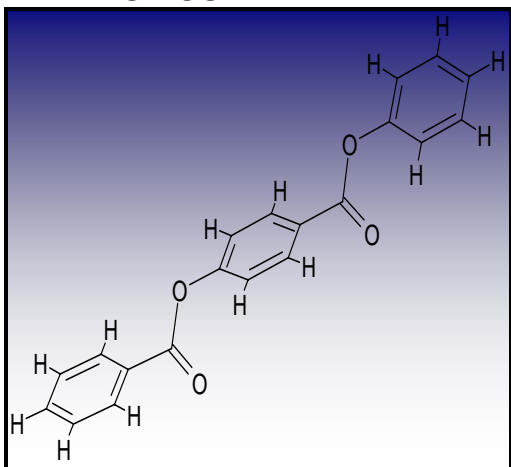
- ♣ **Derivados del Ácido Pulvínico:** Ácido pulvínico.
- ♣ **Terfenilquinonas:** Derivados de la p – benzoquinona, como el ácido poliporico.

ESTRUCTURAS TIPO DE LOS METABOLITOS LIQUENICOS DÉPSIDOS

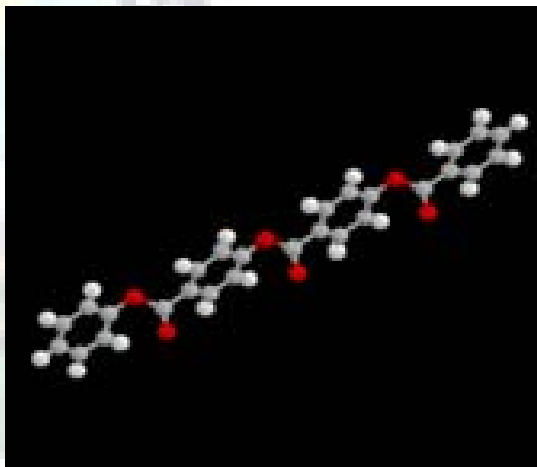
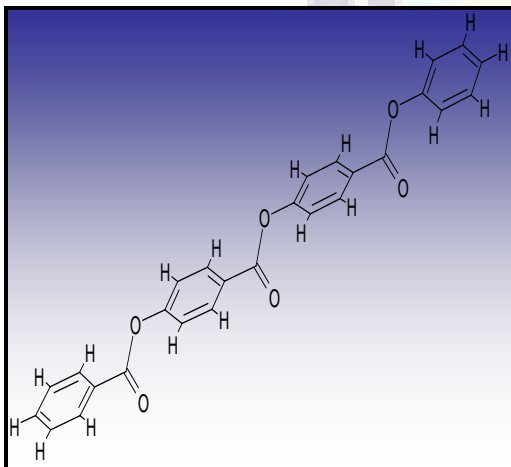




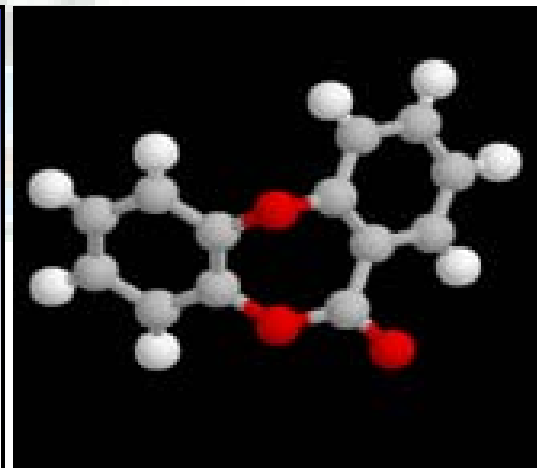
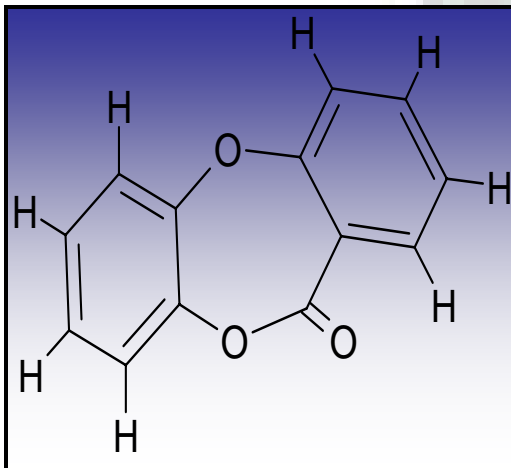
TRIDÉPSIDOS



TETRADÉPSIDOS

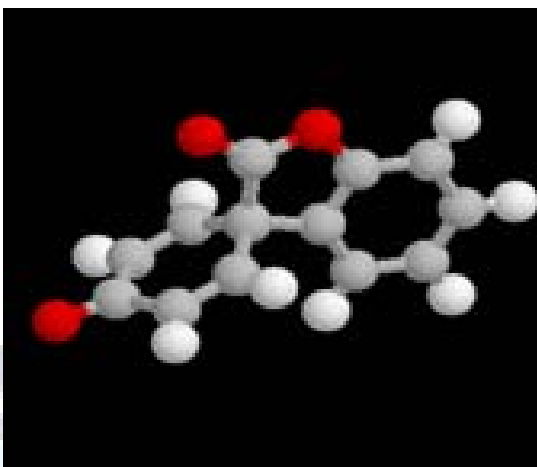
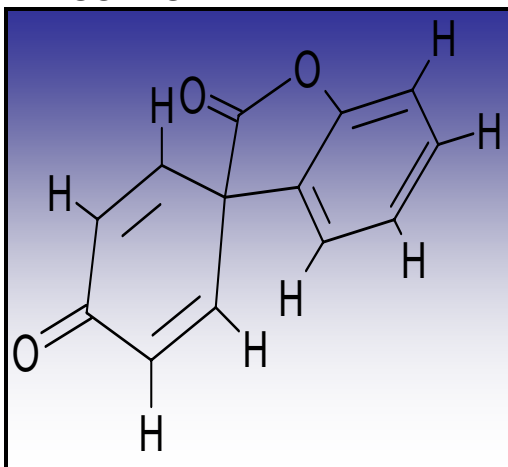


DEPSIDONAS

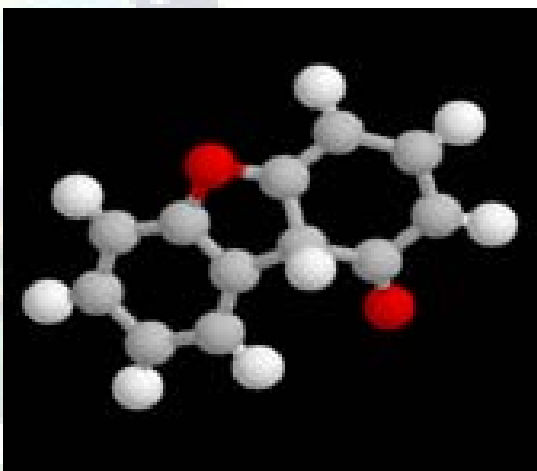
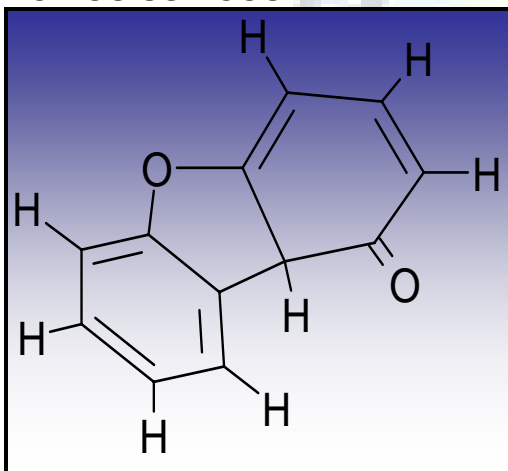




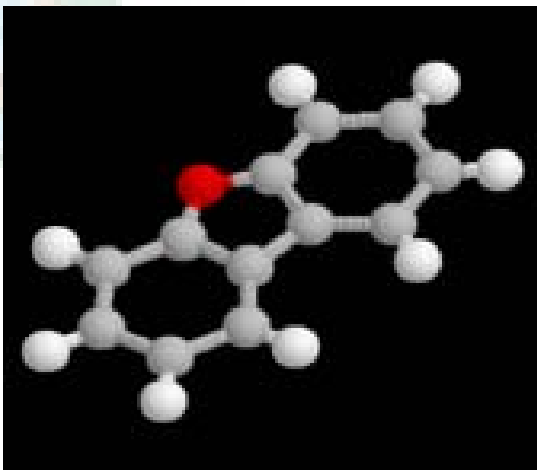
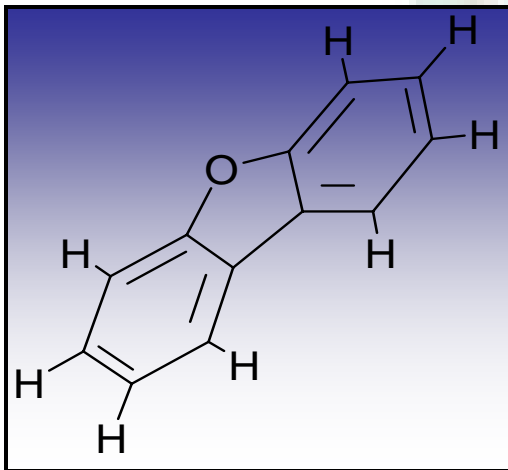
DEPSONAS



ACIDOS USNICOS



DIBENZOFURANOS





ANEXO 4

METABOLITOS ACTIVOS DE LA PLANTA *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel

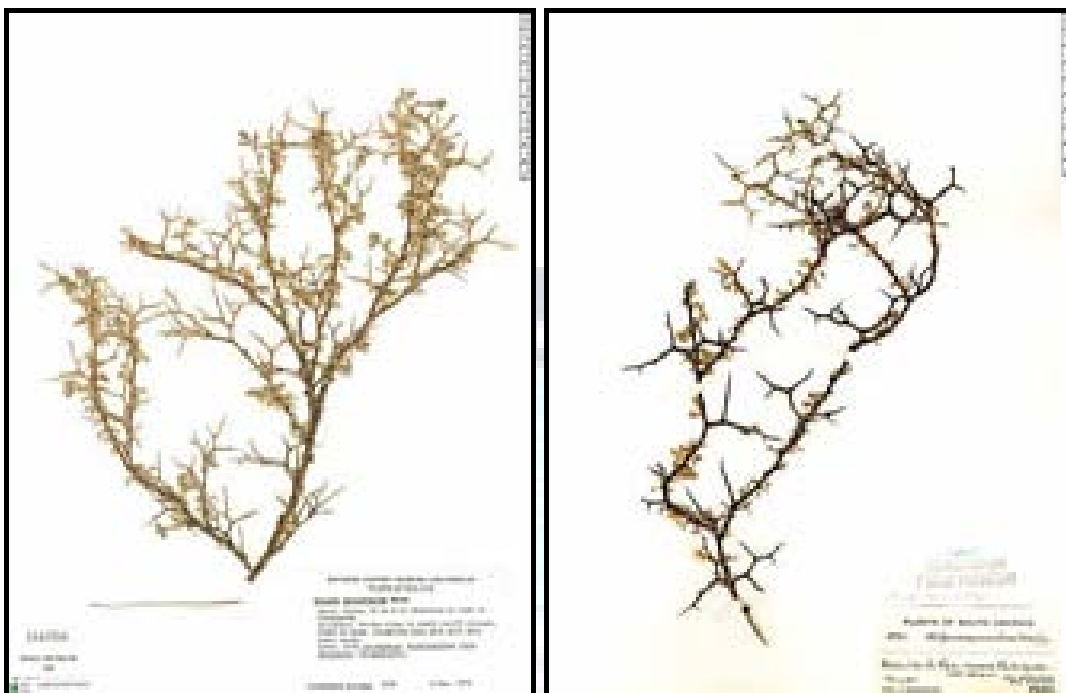


FIGURA 5. Fotos de la Especie Vegetal *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel

METABOLITOS AISLADOS DE LA ESPECIE VEGETAL *Adesmia spinosissima* Meyen ex Vogel

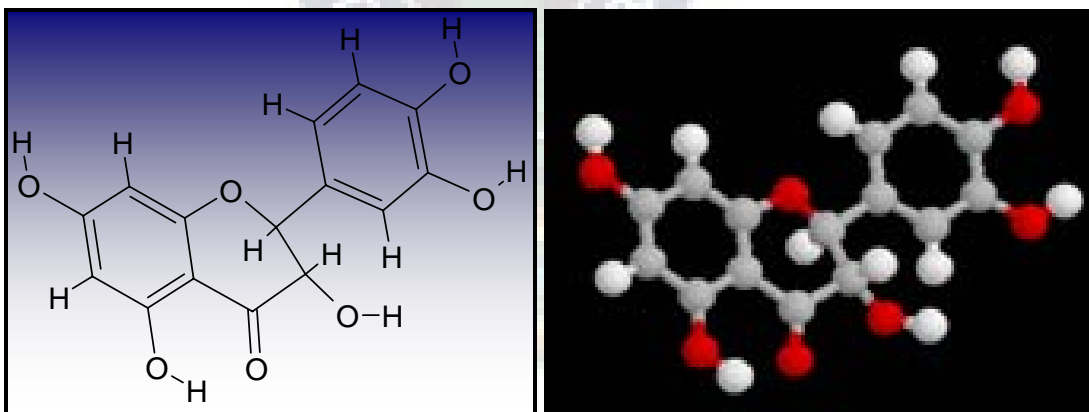


FIGURA 6. Metabolito Activo (AE - 1)



ANEXO 5

METABOLITOS ACTIVOS DELLIQEN *Stereocaulon ramulosum* Rausch



FIGURA 9. Fotos de la Especie Vegetal *Stereocaulon ramulosum* Rausch.

METABOLITOS AISLADOS DE LA ESPECIE VEGETAL *Stereocaulon ramulosum* Rausch

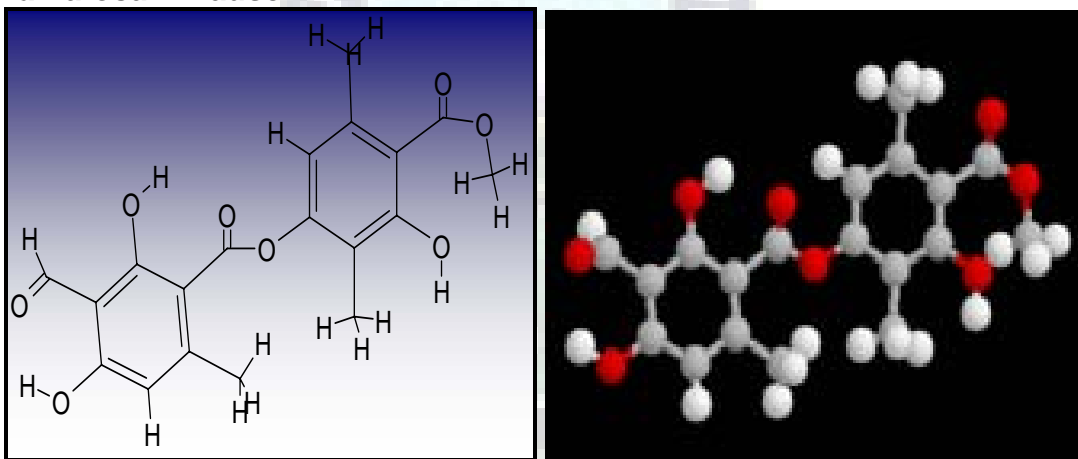


FIGURA 10. Metabolito Activo (Atranorina).

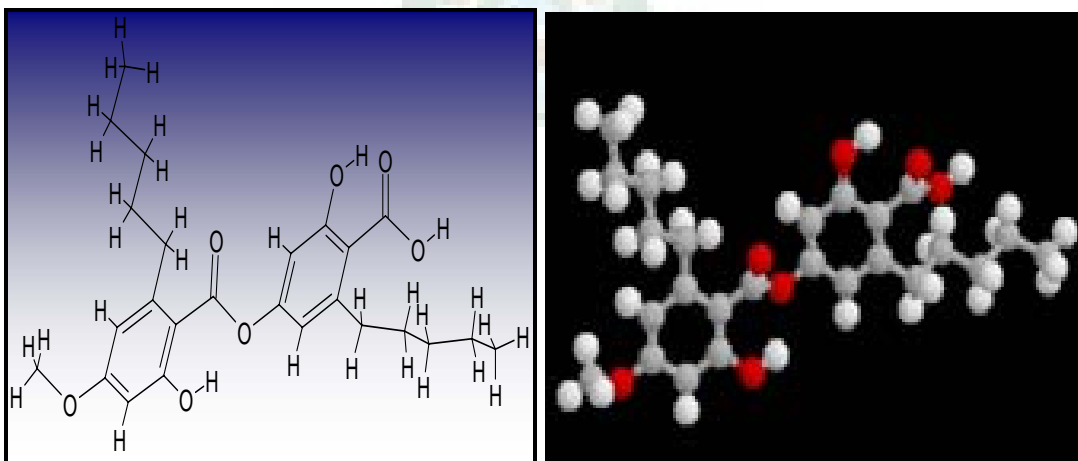


FIGURA 11. Metabolito Activo (Ácido Perlatólico).



ANEXO 6

MECANISMO DE DEFENSA DE UN COMPUESTO ANTIOXIDANTE

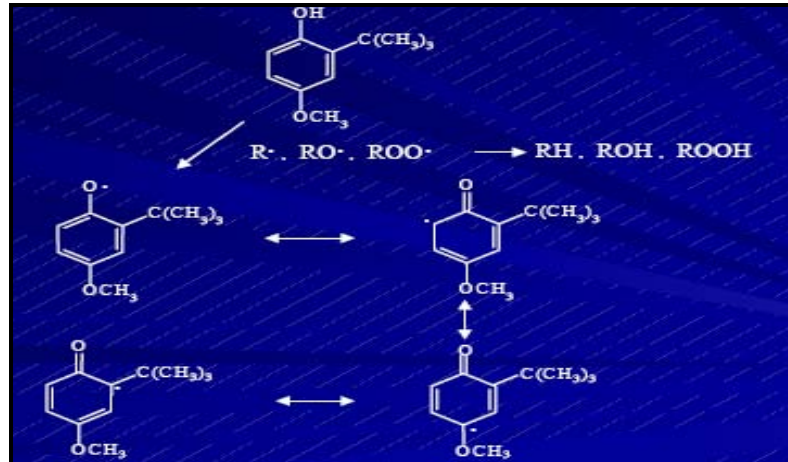


FIGURA 12. Compuesto antioxidante previene o detiene una cadena de propagación enzimático mediante la estabilización del radical generado (estabilización resonante).

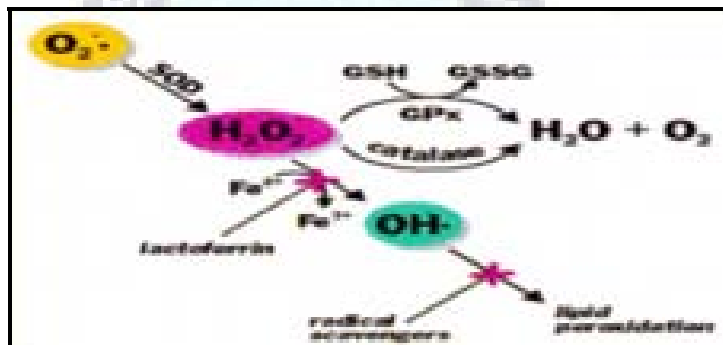


FIGURA 13. Mecanismo de Defensa Antioxidante contra las EROs.

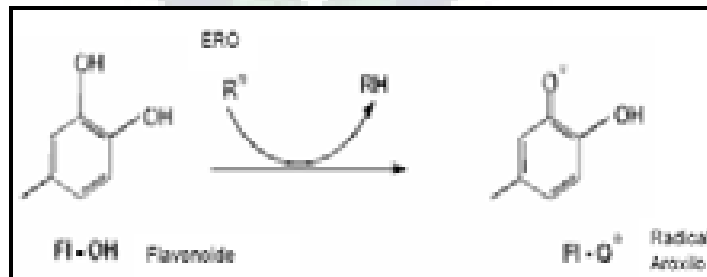


FIGURA 14. Mecanismo de Estabilización de EROs de los Flavonoides.

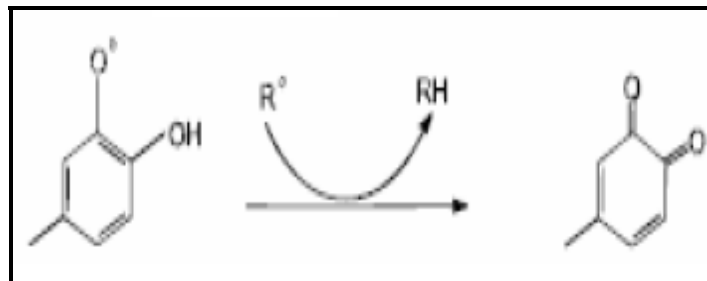


FIGURA 15. Mecanismo de Estabilización de EROs de las Antocianinas.



ANEXO 7

REGENERACIÓN DEL COMPUESTO ANTIOXIDANTE RADICALARIO

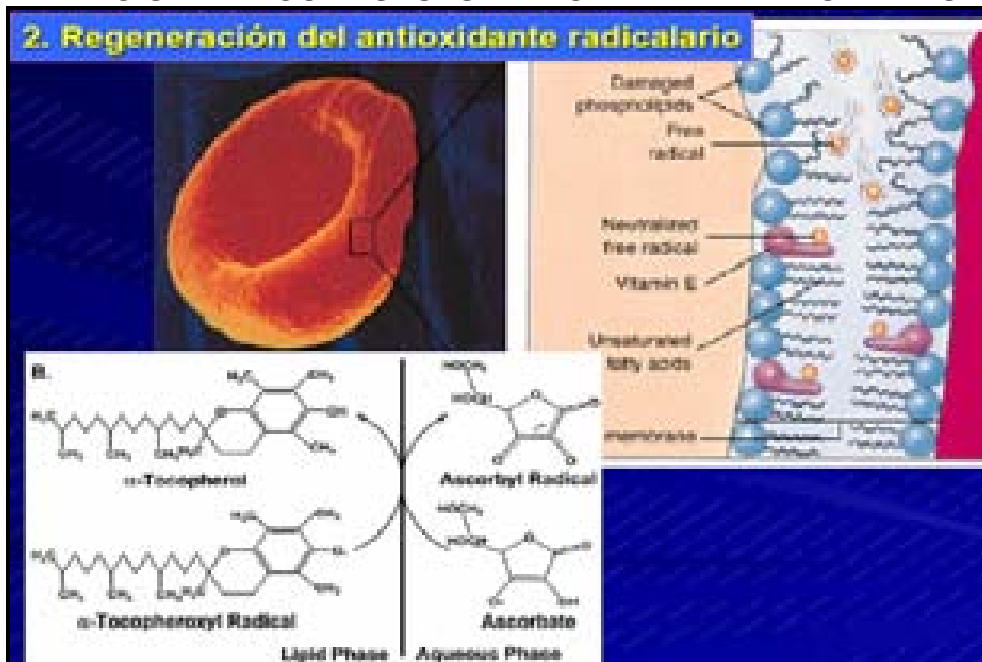


FIGURA 16. Regeneración del Antioxidante Radicalario.

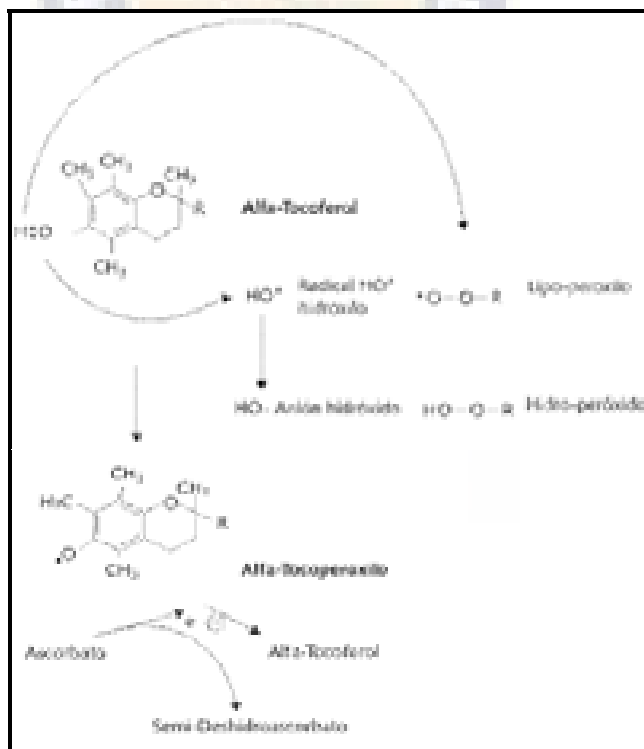


FIGURA 17. Se representa un ataque electrofílico monoeléctrico (un solo electrón) de la valencia que forma el oxhidrilo del alfa tocoferol hacia el radical hidroxilo, estabilizando su reactividad al formar el anión hidróxido. La molécula de alfa – tocoferol al ceder un electrón se constituye en radical alfa – tocoferoxilo , el cual es estabilizado al aceptar un electrón proveniente del ascorbato restituyendo la estructura de alfa – tocoferol. Una reacción similar se lleva al cabo con el radical lipo – peroxilo.

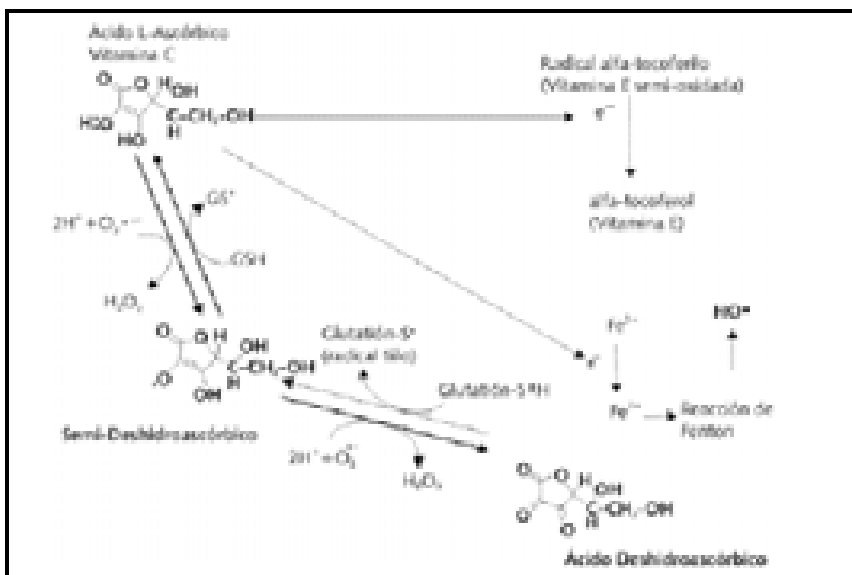


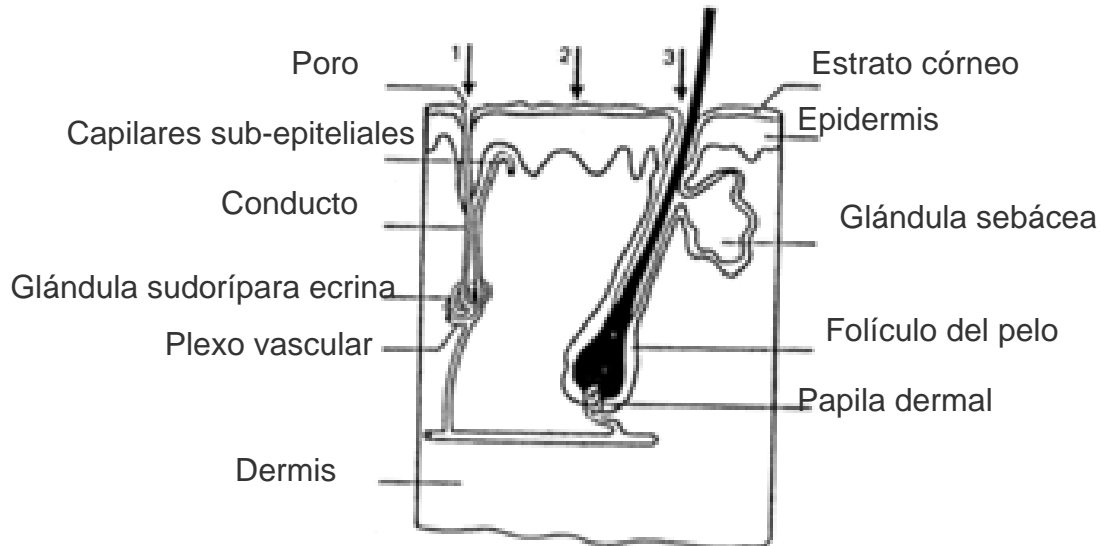
FIGURA 18. Del lado izquierdo se presenta la reacción monoeléctrica en que el ácido L – ascórbico reduce al radical anión superóxido en presencia de protones (H⁺), formando H₂O₂; a su vez, la vitamina C forma el radical semideshidro – ascórbico que, en presencia de O₂ da lugar al ácido deshidroascórbico, el proceso inverso involucra la participación de GSH formándose el radical tiilo. Se presenta en la parte superior la reducción de alfa – tocoferilo a vitamina E, y la reacción prooxidante de la vitamina en la que reduce el ión férrico a ferroso facilitando una posible reacción de Fenton en presencia de H₂O₂.



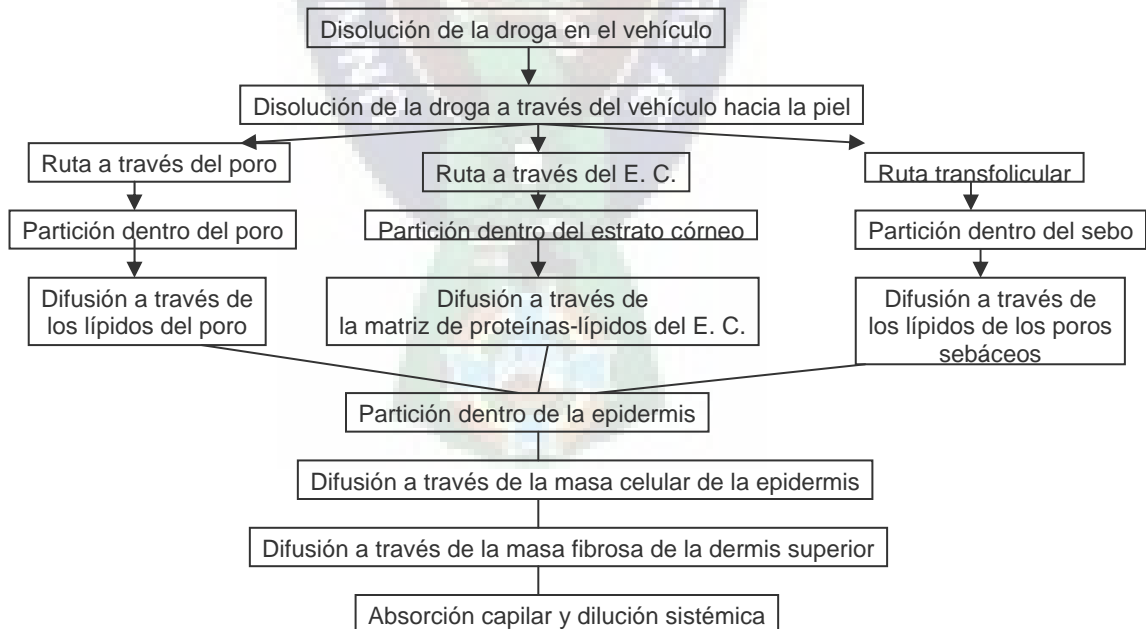


ANEXO 8

RUTAS DE PENETRACIÓN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS



PROCESO DE PENETRACIÓN DE UNA DROGA POR VÍA DÉRMICA





APENDICE





FOTOGRAFIAS



FOTOGRAFIA 1. Procedimiento de pesaje de los auxiliares de formulación para la elaboración de la crema.



FOTOGRAFIA 2. Procedimiento de pesaje de los vasos para la formulación de la crema.



FOTOGRAFIA 3. Procedimiento de elaboración de las bases.



FOTOGRAFIA 4. Procedimiento de elaboración de las cremas.



FOTOGRAFIA 5. Evaluación de la estabilidad de las cremas, por medio del método de variación de temperatura (Temperatura Alta).



FOTOGRAFIA 6. Evaluación de la estabilidad de las cremas, por medio del método de variación de temperatura (Temperatura de Refrigeración).



FOTOGRAFIA 7. Acondicionamiento de los animales de experimentación (conejos) en el bioterio del I.I.B.C.E.



FOTOGRAFIA 8. Pesaje de los animales de experimentación (conejos).



FOTOGRAFIA 9. Elaboración de los cuatro cuadrantes simétricos de 5 x 5 cm, a nivel del dorso del animal de experimentación (conejo).



FOTOGRAFIA 10. Aplicación de la base y crema al 5% en los cuadrantes respectivos del dorso del animal de experimentación (conejo).



FOTOGRAFIA 11. Equipo Espectrofotómetro de Celdas (Longitud de onda de trabajo 750 nm).



FOTOGRAFIA 12. Equipo Sonicador de muestras.

GLOSARIO

ABTS, reacción de: (2, 2' - azinobis - (3 - etilbenzotiazolina - 6 - ácido sulfúrico), Reacción donde el radical monocatiónico $ABTS^+$, es generado por la oxidación del ABTS, con persulfato de potasio (oxidante), y es reducido en presencia de antioxidantes donantes de hidrógeno.

Acetilcolina: Agonista colinérgico y neurotransmisor en la placa de unión del músculo estriado, en las células efectoras parasimpáticas y sinapsis preganglioares simpáticas y parasimpáticas. Es uno de los principales agonistas del óxido nítrico.

Acetil coenzima A: (acetil Coa), Es un tioéster de la coenzima A y ácido acético. Acetil Coa ingresa en el ciclo de Krebs y es usada para acetilar numerosos compuestos.

Ácido araquidónico: Ácido graso poliinsaturado de 20 carbonos, que genera prostaglandinas y tromboxano por la vía de la ciclooxigenasa y leucotrienos por la vía de la lipooxigenasa.

Ácido ascórbico: Importante antioxidante hidrosoluble sintetizado por la mayoría de los mamíferos excepto el ser humano. Además de su acción antioxidante, el ácido ascórbico constituye el sustrato en la síntesis de numerosas moléculas y proteínas.

Alfa tocoferol: Es la forma más común de vitamina E, es un antioxidante liposoluble y uno de los principales protectores de las membranas celulares y lipoproteínas contra la acción de los radicales libres.

Antioxidante: Cualquier sustancia que estando en concentración mucho más baja que la de cualquier sustrato oxidable por un radical libre, previene o demora la oxidación de dicho sustrato. El antioxidante posee una estructura química apropiada para reaccionar fácilmente con un radical libre con un costo mínimo para el organismo.

Apotecio: Aparato esporífero típico de los líquenes gimnocárpicos.

Asca: Saco que contiene cierto número de esporas de origen sexual, propio de los Ascomicetos.

Beta caroteno: Es una de las sustancias más activas de la familia de los carotenoides. Participa como precursor en la síntesis de vitamina A o retinol y posee función antioxidante por su capacidad de atrapar al oxígeno singulete.



Coenzima Q: (CoQ10), llamada también ubiquinona es una quinona liposoluble que actúa como cosustrato en la cadena de transporte de electrones mitocondriales. Constituye además un importante antioxidante liposoluble y con capacidad de regenerar a la forma oxidada de vitamina E.

Crema: Forma farmacéutica constituida por dos fases, una lipófila y otra acuosa. Tiene una consistencia blanda y flujo newtoniano o pseudoplástico, por su alto contenido acuoso.

Droga: Es toda sustancia que puede utilizarse para la curación, mitigación o prevención de las enfermedades en el hombre y los animales.

EROs: Son especies reactivas derivadas del oxígeno que incluyen moléculas químicas radicalarias y no radicalarias.

Emoliente: Sustancia que ejerce un efecto suavizante y calmante sobre la piel y las mucosas inflamadas. Disminuye la irritación y protege frente a agentes irritantes.

Estabilidad: De un preparado galénico, se dice cuando todas sus características y propiedades iniciales se mantienen inmutables durante un periodo de tiempo y en condiciones naturales de conservación.

Excipiente: Dicese a la sustancia mas o menos inerte que se agrega a un preparado galénico con el objeto de darle a la droga la forma y consistencia adecuada.

Factor de protección Solar: (FPS), Se define como la relación entre el tiempo necesario para la aparición de eritema usando un filtro solar y el tiempo necesario para que se produzca ese mismo eritema sin el filtro.

Fenton, reacción de: Reacción que produce radical hidroxilo ($\text{HO}\cdot$) mediante la combinación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) con Fe^{2+} .

Flavonoides: Fitoquímicos fenólicos abundantes en las plantas. Varios de ellos como catequina, epicatequina, proantocianidina, y quercetina poseen propiedades antioxidantes.

Fotodermatitis: Estado anormal de la piel en el que la luz es un factor causal importante.

Fotoprotector tópico: O producto antisolar, es un preparado farmacéutico de aplicación tópica que tiene la propiedad de reflejar, absorber o refractar la radiación ultravioleta de origen solar o de fuentes artificiales, atenuando la acción perjudicial de los rayos solares.

HPLC: high performance liquid chromatography. Técnica de alta sensibilidad para la determinación de numerosas sustancias y moléculas en plasma, orina y otros medios.

Hidroxilo: (radical) ($\text{HO}\cdot$), potente oxidante citotóxico producido por la reacción de Fenton entre el H_2O_2 y Fe^{2+} .

Lipoperóxido: Molécula de ácido graso poliinsaturado o fosfolípido que ha sufrido una degradación oxidativa en el proceso de lipoperoxidación inducido por radicales libres (ver peroxidación lipídica).

Pantallas: Son sustancias inertes cuyo mecanismo de acción consiste en la reflexión de la radiación solar. Actúan impidiendo el paso de los rayos ultravioleta e infrarrojos. No son absorbidos y al no penetrar a través de la piel poseen una alta tolerancia cutánea y en raras ocasiones producen alergias.

Peroxidación lipídica: Reacción autocatalítica donde un radical libre oxida a una molécula de ácido graso poliinsaturado transformándolo en un radical de ácido graso, que a su vez puede oxidar a otra molécula de ácido graso. La peroxidación lipídica genera numerosos productos como malondialdehído, 4 – hidroxinonenal, dienos conjugados, carbonilos y oxígeno singulete que pueden ser determinados mediante diversas técnicas y constituyen métodos de medición de estrés oxidativo.

Preparado galénico: Constituye el medicamento elaborado, que ha sido sometido a una serie de operaciones destinadas a facilitar la administración, la prescripción, la conservación, etc. El preparado galénico se considera un estadio previo a la forma farmacéutica.

Principio activo: Elemento o sustancia que posee actividad farmacológica, modificando las funciones celulares del organismo, constituyente principal de los medicamentos o preparados galénicos.

Propagulo: Corpúsculo o fragmento de tejido que sirve para propagar o multiplicar vegetativamente una planta.

Pseudopodecio: Ciertas formas de talo, en las que aparentemente nacerían los apotecios.

Radical libre: Toda molécula que posee uno o más electrones desapareados en sus orbitales externos.

Superóxido o anión superóxido (O_2^-): Radical libre del oxígeno producido por la reducción del oxígeno molecular en muchas oxidaciones biológicas. Las fuentes de anión superóxido son numerosas siendo la más importante la mitocondria, y en menor orden reacciones enzimáticas catalizadas por la flavina oxidasa, xantina oxidasa NADPH oxidasa y monoamina oxidasa.



También por la autooxidación de tioles, catecolaminas, etc. Es neutralizado por la enzima superóxido dismutasa dando lugar a peróxido de hidrógeno.

Superóxido dismutasa (SOD): Enzima del grupo de las metaloenzimas que cataliza la reducción del anión superóxido a peróxido de hidrógeno. Hay varios tipos, los más importantes son el Zn – Cu – SOD en el citosol y el Mn – SOD en la mitocondria.

Talo: Cuerpo vegetativo no diferenciado en raíz, tallo y hojas.

TBARS: thiobarbituric acid reactive substances, o sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico constituyen una evaluación de dialdehidos producidos por el daño de radicales libres sobre los componentes celulares. Los TBARS son un marcador de estrés oxidativo ampliamente utilizados.

Xantin oxidasa: (XO), Enzima del grupo de las oxido reductasas que utiliza como sustratos xantina, agua y oxígeno formando ácido úrico y anión superóxido. Por lo tanto la XO constituye una importante fuente de este radical libre. Normalmente se la encuentra en la forma de xantina dehidrogenasa (XDH), y es expresada por los endotelios vasculares. Ante situaciones de isquemia y por aumento del calcio citosólico y proteólisis la XDH que normalmente cataliza la xantina para producir ácido úrico y NADH vira a XO cambiando su actividad enzimática.

