



Secretaría de Educación Pública

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO Instituto Tecnológico de Veracruz

Evaluación de la actividad antiinflamatoria de dos sistemas (nanogel y organogel) acarreadores de ácido betulínico en un modelo murino

Tesis

Que para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias en Ingeniería Bioquímica

Presenta:

Dalis Sofía Sosa Gutiérrez

Asesores:

Dr. Hugo Sergio García Galindo
Dr. Andrés Antonio Acosta Osorio
Dr. Jorge Fernando Toro Vázquez

H. Veracruz Ver.

Diciembre 2017

RESUMEN

Sosa Gutiérrez Dalis Sofía. M. en C. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Enero del 2018. Evaluación de la actividad anti-inflamatoria del ácido betulínico empleando dos vehículos acarreadores (nanogeles y organogeles) de aplicación dérmica en un modelo murino. Asesores Dr. Hugo Sergio García Galindo, Dr. Andrés Antonio Acosta Osorio Dr. Jorge Fernando Toro Vázquez.

El ácido betulínico (AB) es un compuesto lipofílico que ha demostrado resultados benéficos en la inflamación por vía tópica. Existe una búsqueda constante de la mejora de vehículos transportadores de fármacos. Los organogeles (OG), gracias a sus componentes afines a las membranas de la piel, facilitan el atravesar las diferentes capas de la piel a los fármacos que transportan. Actualmente no existen estudios de organogeles acarreadores de ácido betulínico, y hay pocos estudios que emplean aceites vegetales como medio orgánico en estos sistemas. Por otro lado, los nanogeles (NG) incrementan la absorción de diversos fármacos en la piel debido al reducido tamaño de partícula. Ambos vehículos tienen propiedades que los hacen buenos candidatos para tratar enfermedades en la piel, por lo que en este estudio se buscó evaluar y comparar la actividad anti-inflamatoria de ambos sistemas sobre un edema auricular en ratones. Para lograr esto se elaboraron y caracterizaron cada uno de los vehículos. Los OG compuestos de lecitina, aceite de triglicéridos de cadena media y ácido betulínico, se evaluaron a tres concentraciones de gelante (25, 35, 45%) y tres concentraciones de compuesto bioactivo para medir su efecto en las propiedades termo-mecánicas. De forma paralela se desarrollaron los NG siguiendo el método de polimerización de emulsión, donde previamente se desarrolló una nanoemulsión de AB, la cual se reticuló con un polímero de poli acrilato (Carbopol 940®); en estos sistemas se evaluaron tres concentraciones de carbopol (0.5, 1, y 1.5%) y tres tiempos de activación del polímero (6, 12 y 24h), y se caracterizaron termo-mecánicamente y micro-estructuralmente. Finalmente, se evaluó la actividad anti-inflamatoria del AB siguiendo un modelo de edema auricular inducido con TPA

para posteriormente determinar el porcentaje de inhibición del edema por porcentaje en peso y se corroboró histológicamente.

En general, los resultados mostraron que los OG AB fueron termorreversibles y estables hasta 74°C (a partir de esta temperatura los sistemas mostraron cambios de fases, tendencia a fundirse o a tener un re-arreglo estructural); reológicamente demostraron tener valores altos de G' (módulo de almacenamiento), pudiendo clasificarlos como geles fuertes, comparados con los NG. Los testigos [hidrogel acarreador de ácido betulínico (HG AB)] mostraron valores de G' aún más bajos con respecto a los NG, debido a la interacción de los componentes (fosfatidilcolina de soya, glicerol) de la nanoemulsión empleada para obtener el NG AB. Se encontró que a mayor concentración de reticulante, se produjo una mayor elasticidad para ambos sistemas (NG y OG), y que el tiempo de activación del reticulante, para el caso de los NG, comenzó a ser significativo incrementando G' a partir de concentraciones de 1% de carbopol. De manera paralela, en los OG se encontró que las concentraciones del AB mostraron efecto sobre la elasticidad de los sistemas, el cual fue más notorio a 35% de gelificante. Este efecto sugiere que el AB puede actuar como gelificante en ATCM, o incluso actuar como co-gelificante. En cuanto al porcentaje de inhibición de la inflamación, se encontró que los NG AB y OG AB inhibieron el edema (52 y 42%, respectivamente), sin mostrar efectos adversos como el fármaco de referencia, diclofenaco que produjo el 30% de defunciones. Histológicamente, en los tejidos de orejas tratadas con los nanogeles y organogeles no se evidenció discontinuidad en la epidermis y dermis, a diferencia del grupo con el ácido betulínico libre y el grupo testigo con edema, y que además mostraban menos cantidad de infiltrado inflamatorio respecto a estos mismos grupos.

ABSTRACT

Sosa Gutiérrez Dalis Sofía. M. en C. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Enero del 2018. Evaluación de la actividad anti-inflamatoria del ácido betulínico empleando dos vehículos acarreadores (nanogeles y organogeles) de aplicación dérmica en un modelo murino. Asesores Dr. Hugo Sergio García Galindo, Dr. Andrés Antonio Acosta Osorio Dr. Jorge Fernando Toro Vázquez.

Betulinic acid (AB) is a lipophilic compound that has shown beneficial results in topical inflammation. There is a constant search for the improvement of drug transport vehicles. The organogels (OG), thanks to their components related to the membranes of the skin, facilitate the crossing of the different layers of the skin to the drugs they transport. There are currently no studies of organogels carrying betulinic acid, and there are only a few studies that utilise vegetable oils as an organic medium in these systems. On the other hand, nanogels (NG) increase the absorption of various drugs in the skin due to the reduced particle size. Both vehicles have properties that make them good candidates to treat diseases in the skin. In this study, we pursued to evaluate and compare the anti-inflammatory activity of both systems on auricular edema in mice. To achieve this, each of the vehicles was prepared and characterized. The OG composed of lecithin, medium chain triglyceride oil and betulinic acid, were evaluated at three concentrations of gellant (25, 35, 45%) and three concentrations of bioactive compound to assess their effect on their thermo-mechanical properties. In parallel, the NG were developed following the emulsion polymerization method, where an AB nanoemulsion was previously developed, which was cross-linked with a poly acrylate polymer (Carbopol 940®). In these systems, three concentrations of carbopol (0.5, 1, and 1.5%) and three times of activation of the polymer (6, 12 and 24h) were evaluated, and characterized thermo-mechanically and micro-structurally. Finally, the anti-inflammatory activity of AB was assessed following a model of atrial edema induced with TPA to subsequently determine the percentage of edema inhibition by weight percentage which was corroborated histologically.

In general, the results showed that OG AB were thermoreversible and stable up to 74°C (from this temperature the systems showed phase changes, a tendency to melt or to have a structural rearrangement); rheologically they showed to have high values of G' (storage module), being able to classify them as strong gels, compared with the NG. The controls [betulinic acid carrier hydrogel (HG AB)] showed even lower G' values with respect to the NG, due to the interaction of the components (soy phosphatidylcholine, glycerol) of the nanoemulsion used to obtain the NG AB. It was found that the higher the concentration of crosslinker, the greater the elasticity for both systems (NG and OG), and that the time of activation of the crosslinker, for the case of NG, began to be significant increasing G' from concentrations of 1% carbopol. In parallel, in the OG it was found that the concentrations of the AB showed effect on the elasticity of the systems, which was more noticeable at 35% of gelling. This effect suggests that the AB can act as a gelling agent in ATCM, or even act as co-gelling agent. Regarding the percentage of inhibition of inflammation, it was found that NG AB and OG AB inhibited edema (52 and 42%, respectively), without showing adverse effects as the reference drug, diclofenac which produced 30% of deaths in experimental mice. Histologically, discontinuity was not evident in the epidermis and dermis of tissues from ears treated with nanogels and organogels, unlike the group with free betulinic acid and the control group with edema, and also showed less inflammatory infiltrate compared to these same groups.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Compuestos bioactivos.....	3
2.2. Ácido Betulínico	4
2.2.1. Distribución y aislamiento del ácido betulínico.....	4
2.2.2. Propiedades físicas del ácido betulínico.	4
2.2.3. Propiedades bioactivas del ácido betulínico	5
2.2.3.1. Actividad anti-VIH de derivados del ácido betulínico	5
2.2.3.2. Actividad anticancerígena.....	6
2.2.3.3. Actividad antibacterial	7
2.2.3.4. Actividad anti-malaria.....	7
2.2.3.5. Actividad analgésica y anti-inflamatoria	8
2.3. Definición de inflamación.....	10
2.4. Inflamación: protocolos <i>in vivo</i>	11
2.4.1. Mecanismo de inflamación del TPA	12
2.4.2. Inflamación auricular inducida por aplicación repetida de TPA.....	13
2.5. Administración de compuestos bioactivos por vía tópica.....	14
2.6. La piel como biomembrana	15
2.7. Sistemas de entrega.....	16
2.8. Geles	17
2.8.1. Estructuras de formación de los geles	17
2.8.2. Clasificación de los geles.....	18
2.9. Organogel.....	20
2.9.1. Aplicaciones de los organogeles	21
2.9.2. Propiedades de los organogeles	22

2.9.3. Tipos de gelificantes que se han empleado para el desarrollo de organogeles	23
2.9.3.1. Lecitina como molécula gelificante	24
2.9.3.2. Fosfolípidos	25
2.10. Hidrogeles.....	29
2.11. Nanogeles.....	30
2.11.1. Métodos de síntesis de nanogeles.....	31
2.11.1.1. Polimerización en emulsión, micro y nanoemulsiones.....	31
2.11.2. Polímeros empleados en la preparación de hidrogeles y nanogeles ..	33
2.11.3. Polímeros sintéticos del ácido poliacrílico (PAA): Carbopol.....	34
2.11.4. Nanogeles a partir de nanoemulsiones (NE) empleando carbopol	36
2.12. Nanoemulsiones.....	38
2.13. Caracterización de nanoemulsiones.....	39
2.13.1. Tamaño de partícula.....	39
2.13.2. Polidispersión.....	40
2.14. Caracterización de geles.....	41
2.14.2. Caracterización estructural (microestructura).....	42
2.14.2.1. Microscopía de luz polarizada (MLP).....	43
2.14.2.2. Microscopía avanzada.....	43
2.14.2.3. Técnicas espectroscópicas aplicadas a geles.....	45
2.14.3. Caracterización reológica	45
2.14.4. Caracterización Térmica.....	49
3. JUSTIFICACIÓN	53
4. HIPÓTESIS	54
5. OBJETIVOS	55
5.1. Objetivo general.....	55
5.2. Objetivos específicos.....	55
6. MATERIALES Y MÉTODOS	56
6.1. Materiales.....	56

6.2.	Metodología general	56
6.2.1.	Desarrollo de las nanoemulsiones de ácido betulínico	58
6.2.2.	Caracterización de las NE AB	58
6.3.	Desarrollo de nanogeles de ácido betulínico	60
6.3.1.	Diseño experimental para la formulación de los nanogeles.	60
6.3.2.	Caracterización reológica de los NG AB	61
6.3.3.	Caracterización microscópica de los NG AB	62
6.4.	Formulación de organogeles acarreadores de ácido betulínico	63
6.4.1.	Método del tubo invertido.....	64
6.4.2.	Diseño experimental para la formulación de los organogeles.....	64
6.4.3.	Caracterización de los organogeles	65
6.4.4.	Comportamiento reológico de los OG AB	65
6.4.5.	Determinación de temperatura de transición de fases	66
6.5.	Evaluación de bioactividad <i>in vivo</i>	67
6.5.1.	Inflamación crónica inducida por aplicación repetida de TPA en oreja de ratón 68	
6.5.1.1.	Análisis estadístico.....	69
6.6.	Análisis histológico.....	69
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	71
7.1.	Caracterización de nanoemulsiones	71
7.1.1.	Tamaño de partícula	71
7.1.2.	Polidispersidad	71
7.1.3.	Estudio de estabilidad de la NE AB	72
7.2.	Caracterización de Nanogeles acarreadores de AB.....	74
7.2.1.	Caracterización reológica de los NG AB	74
7.2.2.	Caracterización microscópica de los nanogeles	80
7.3.	Caracterización de organogeles acarreadores de ácido betulínico	82
7.3.1.	Prueba de tubo invertido y determinación de la concentración crítica gelante.....	82
7.3.2.	Propiedades térmicas de los OG AB	84

7.3.3. Caracterización reológica de los OG AB	89
7.4. Evaluación de la actividad antiinflamatoria <i>in vivo</i>	92
7.5. Histología	97
8. CONCLUSIONES	103
9. BIBLIOGRAFÍA	105

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. Propiedades fisicoquímicas de los organogeles _____	22
TABLA 2. Tipos de gelificantes empleados para el desarrollo de organogeles _____	23
TABLA 3. Estudios donde han empleado Fosfolipon 90H® para el desarrollo de vehículos acarreadores de fármacos. _____	28
TABLA 4. Polímeros y monómeros utilizados en la preparación de hidro, micro y nanogeles. _____	34
TABLA 5. Investigaciones donde emplean carbopol en la elaboración de nanogeles. _____	37
TABLA 6. Factores y niveles del diseño factorial para la preparación de nanogeles acarreadores de ácido betulínico con un diseño factorial 3^2 _____	61
TABLA 7. Factores y niveles del diseño factorial para la preparación de organogeles acarreadores de ácido betulínico con un diseño factorial 3^2 _____	65
TABLA 8. Grupos experimentales para el estudio de actividad anti-inflamatoria del AB acarreado en diversos vehículos _____	67
TABLA 9. Determinación del intervalo visco-elástico lineal a través del módulo de almacenamiento y punto de cruce. _____	75
TABLA 10. Prueba de Tukey para G' y $\log(G')$ para todas las formulaciones de OG AB. _____	91
TABLA 11. Prueba de Tukey para media de los pesos (mg) de las orejas evaluadas. _____	93

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Estructuras de ácido betulínico y betulina (Ghaffari, 2012).	5
FIGURA 2. Introducción del ácido betulínico al sitio de unión de PLA ₂ bovina. (a) Vista del sitio de unión de calcio. (b) Representación del ácido betulínico insertado en el sitio de unión. El grupo carboxílico, ubicado en el fondo de la cavidad, interactúa con el átomo de calcio, no visible en esta perspectiva. Fuente: (Bernard et al., 2001)	9
FIGURA 3. Posibles vías para penetrar o cruzar las capas de la piel. (1) a través de la capa cornea intacta; (2) a través de los folículos pilosos con glándulas sebáceas asociadas (3) a través de glándulas sudoríparas (Cornell y Oresajo, 2010).	16
FIGURA 4. Esquema de formación de un gel	18
FIGURA 5. Clasificación de los geles (Edelsztein, 2010).	20
FIGURA 6. Estructura de la 1,2-diacil-sn-3- fosfocolin (Tamargo Santos et al., 2011).	24
FIGURA 7. Representación esquemática de la estructura química de algunos fosfolípidos naturales (Vikbjerg, 2006).	25
FIGURA 8. Métodos para preparación de nanogeles. Fuente: (Escalona y Quintanar, 2014).	32
FIGURA 9. Síntesis de nanogeles mediante polimerización en emulsiones: a) Polimerización de monómeros (1) Agentes reticulantes bifuncionales (2) Polimerización en emulsiones W/O estabilizadas con tensoactivos. (3) Los nanogeles pueden ser transferidos a un medio acuoso mediante la eliminación de tensoactivos y solventes orgánicos b) Polimerización de monómeros en emulsiones O/W estabilizadas con tensoactivos. Fuente: (Kabanov y Vinogradov S., 2009)	33

FIGURA 10. Aspecto del Carbopol a) Reacción química de ácido poliacrílico con una base, hidróxido de sodio (NaOH); b) Polímero reticulado seco, se hidrata y se hincha; c) Polímero en polvo. Fuente: (Di Giuseppe et al., 2015).	36
FIGURA 11. Determinación del tamaño de partícula, representación gráfica de modelos: a) Monomodal b) bimodal (McClements, 2011).	41
FIGURA 12. Método del test tubo invertido: a) organogel y b) un organogel fallido. Fuente: (Sagiri et al., 2013).	42
FIGURA 13. Micrografía de un Nanogel acarreador de triterpenos aislados de Ganoderma lucidum (Shen et al., 2014).	44
FIGURA 14. Interpretación de pruebas oscilatorias, ángulo de desfase. Fuente: (Rheology Theory an Applications. TA Instruments).	46
FIGURA 15. Determinación de la región lineal visco-elástica por medio de un barrido de deformación. Fuente: (Rheology Theory an Applications. TA Instruments).	48
FIGURA 16. Esquema grafico del fundamento del funcionamiento del DSC (Schick, 2015).	51
FIGURA 17. Diagrama de flujo de las etapas de la investigación	57
FIGURA 18. Incidencia de luz en la muestra y representación esquematica de las partes del Turbiscan (Formulation, 2016; Loyo 2017).	59
FIGURA 19. Esquema del modelo para inducir inflamación crónica y evaluar la actividad anti-inflamatoria de diversos sistemas.	68
FIGURA 20. Distribución de tamaños de partículas de las NE AB.	72
FIGURA 21. Apariencia tipo translúcida de las NE AB.	73
FIGURA 22. Gráfica de estabilidad de la NE AB a los días de su preparación.	73
FIGURA 23. Barrido de deformación (Tratamiento 0.5%-6h)	76
FIGURA 24. Módulo elástico de NG a concentración de 0.5% con diferentes tiempos de activación versus porcentaje de deformación.	78

FIGURA 25. Módulo de almacenamiento de NG AB a tres concentraciones de reticulante activado a las 6 horas. _____	79
FIGURA 26. Micrografías obtenidas con SEM de NG AB de menor a mayor aumento: a) Micrografía de la topografía de la muestra a 80x, b) Micrografía a 9 kx, c) Micrografía a 40 kx de las redes poliméricas que conforman la estructura del gel, d) Micrografía a 80 kx, e) Micrografía a 120 kx de los agregados esféricos que conforman la red tridimensional. _____	81
FIGURA 27. Determinación de CCG de sistemas de aceite de triglicéridos de cadena media y PC con 85% de ácido esteárico tipo comercial (fosfolipon). _____	82
FIGURA 28. Prueba de tubo invertido para determinar la CCG de sistemas de aceite de triglicéridos de cadena media y de la lecitina Avanti (con ácidos grasos insaturados). _____	83
FIGURA 29. Termo-reversibilidad de las formulaciones de FFN 90H y AB en ATCM, al someterlas a dos rampas de calor. _____	84
FIGURA 30. Exotermia de gelificación de los OG AB enfriando a una rampa de 10°C/min. _____	86
FIGURA 31. Termogramas de endotermia de fusión, calentando los sistemas de OG AB a una rampa de 5°C/min. _____	87
FIGURA 32. Entalpías de fusión de los OG AB: a) Gráfico de interacciones AB- Gelante b) Prueba de Tukey. _____	88
FIGURA 33. Entalpías de gelificación de los OG AB a) Prueba de Tukey b) Gráfico de interacciones. _____	89
FIGURA 34. Reograma del barrido de deformación de la formulación 25% FFN 90H® y 15mg de AB en ATCM. _____	90
FIGURA 35. Gráfico de interacciones del efecto de G' a diferentes concentraciones de FFN 90H® y AB _____	92

FIGURA 36. Representación de los grupos testigos: a) Grupo sano b) Grupo con inflamación crónica _____ 94

FIGURA 37. Porcentaje de inhibición del edema _____ 96

FIGURA 38. Análisis histológico de oreja de ratón del testigo sano teñido con HE en 20x y 10x, visto en un microscopio Olympus BX51. a) Tejido laxo, b) Cartílago elástico, c) Folículo piloso, d) Músculo estriado, e) Dermis y f) Epidermis. Obsérvese que el epitelio se muestra una morfología regular al igual que las demás estructuras celulares que conforman el tejido auricular. _____ 98

FIGURA 39. Análisis histológico de oreja de ratón del grupo al que únicamente se le aplico el inductor de inflamación (TPA) con HE en 10x, respectivamente visto en un microscopio Olympus BX51. c) Pérdida en la continuidad de la epidermis (úlceras), así como denso infiltrado inflamatorio rodeando a ésta, a) efecto de quemadura química de los tejidos, b) Coagulación del colágeno y en la luz de los vasos sanguíneos. Se observa cambios reactivos en dermis y capa muscular. _____ 98

FIGURA 40. Análisis histológico de oreja de ratón del grupo tratado con ácido betulínico libre con HE en 20x y 10x, visto en microscopio Olympus BX5. a) Pérdida en la continuidad de la epidermis con tejido de granulación y abundante polimorfo nuclear. b) Infiltrado inflamatorio constituido por polimorfos nucleares. _____ 99

FIGURA 41. Análisis histológico de oreja de ratón del grupo tratado con hidrogeles de ácido betulínico teñido con HE en 20x y 10x, visto en microscopio Olympus BX51. a) Denso infiltrado inflamatorio agudo en los tejidos blandos (tejido adiposo y músculo estriado), b) Absceso con destrucción de la unidad pilo-sebácea. _____ 99

FIGURA 42. Análisis histológico de oreja de ratón teñido con HE en 20x y 10x, del grupo tratado con organogeles de ácido betulínico visto en microscopio Olympus BX51. Detalle del infiltrado inflamatorio constituido por neutrófilos, linfocitos y macrófagos; obserevese el denso infiltrado agudo crónico en el estroma sub epitelial. _____ 100

FIGURA 43. Análisis histológico de oreja de ratón teñido con HE en 20x y 10x, del grupo tratado con nanogeles acarreadores de ácido betulínico visto en microscopio

Olympus BX51. a) Infiltrado inflamatorio moderado en focos b) ligero infiltrado tipo agudo localizado en la dermis. Nótese que no existen daños en ninguna capa del epitelio, la cual se presenta con una estructura celular adecuada. _____ 100

FIGURA 44. Análisis histológico de oreja de ratón del grupo tratado con el fármaco de referencia teñido con HE en 10x y 20x, respectivamente visto en microscopio Olympus BX51. Ligero infiltrado inflamatorio, se observa a) dermis y b) epidermis con anexos, c) cartílago, d) estroma laxos, e) escaso tejido adiposo, f) capa de musculo estriado.

_____ 101

LISTA DE ABREVIATURAS

- AA:** Ácido araquidónico
AB: Ácido betulínico
AINE: Anti-inflamatorio no esteroideo
ATCM: Aceite de triglicéridos de cadena media
C_{l50}: Concentración inhibitoria media
CCG: Concentración Crítica Gelante
DS: Desviación estándar
DSC: Calorimetría diferencial de barrido
FFN 90H: Fosfolipon 90H
FR: Fármaco de referencia
G': Módulo de almacenamiento o de elasticidad
G'': Módulo de pérdida o de viscosidad
GRAS: Generalmente reconocido seguro
HG: Hidrogel
 ΔH_m : Entalpía de fusión
 ΔH_g : Entalpía de gelificación
RLV: Región lineal visco-elástica
NE: Nanoemulsión
NG: Nanogel
OG: Organogel
Pdl: Índice de polidispersidad
PLA₂: Fosfolipasa A₂
PLM: Microscopia de luz polarizada
TEA: Trietanolamida
TPA: 12-O- tetradecanoilforbol-13-acetato
RR: Riesgo relativo

1. INTRODUCCIÓN

El ácido betulínico (AB) es un triterpeno pentacíclico de tipo lupeno que ha demostrado resultados benéficos en la inflamación por vía tópica (Recio *et al.*, 1994; Ciurlea *et al.*, 2010). Sin embargo, tiene baja solubilidad en medio acuoso. Debido a esto es necesario desarrollar sistemas de suministro para mejorar la biodisponibilidad de dicho compuesto bioactivo lipofílico.

Durante las dos últimas décadas, los organogeles de lecitina se han convertido en uno de los más modernos sistemas portadores de compuestos bioactivos. Se prefiere a estos sistemas debido a su larga vida de almacenamiento, termorreversibilidad, estabilidad, y la capacidad de atrapar compuestos de tipo tanto hidrofílico como lipofílico (Kumar y Karate, 2005). La lecitina o fosfatidilcolina (PC) es un agente tensoactivo biocompatible y biodegradable, que actúa como un gelificante y potenciador de penetración en la piel que al ser enriquecido con un ácido graso saturado (ácido esteárico), además de potenciar la capacidad de gelificador ofrece estabilidad oxidativa al vehículo, protección del compuesto bioactivo y aporta a la piel beneficios como hidratación y poder de cicatrización (Lohan *et al.*, 2016).

Por otro lado, los nanogeles han mostrado ser capaces de incrementar la absorción de diversos fármacos en la piel debido al reducido tamaño de partícula, además son considerados sistemas idóneos para la nanomedicina en la administración dérmica de medicamentos poco solubles (Shen *et al.*, 2014).

Ambos vehículos poseen propiedades que los hacen buenos candidatos para tratar enfermedades en la piel, por lo que en este estudio se buscó evaluar y comparar la actividad anti-inflamatoria de ambos sistemas sobre un edema auricular en ratones.

Dentro de los estudios realizados donde emplean los organogeles y nanogeles como vehículos acarreadores de fármacos liposolubles, hasta el momento no existe alguno donde desarrollen sistemas acarreadores de ácido betulínico para la entrega tópica

para el tratamiento de la inflamación. Por ello fue importante caracterizarlos previamente y determinar si eran idóneos para el fin planeado.

2. ANTECEDENTES

2.1. Compuestos bioactivos

Inicialmente, las personas utilizaban las plantas con fines nutritivos, pero después del descubrimiento de las propiedades medicinales de las plantas, estas se convirtieron en una fuente útil para la curación de enfermedades y la promoción de la salud de diversas comunidades humanas (Azmir *et al.*, 2013).

Los compuestos bioactivos de plantas se producen en forma de metabolitos secundarios. Todos los compuestos derivados de sistemas biológicos se pueden dividir en dos grandes grupos. Los primeros son los metabolitos primarios, en los cuales están incluidas las sustancias químicas destinadas a crecimiento y el desarrollo, tales como carbohidratos, aminoácidos, proteínas y lípidos. Los metabolitos secundarios son aquellos que se producen en una fase posterior al crecimiento, no tienen ninguna función en el crecimiento (aunque pueden tener función de supervivencia), tienen estructuras químicas inusuales (Paulsen, 2010). Algunos metabolitos secundarios que tienen efecto en los sistemas biológicos se consideran como bioactivos.

Así, una definición simple de compuestos bioactivos en plantas es: metabolitos secundarios de las plantas que pueden provocar efectos farmacológicos o toxicológicos en humanos y animales. Se dice que un compuesto o una sustancia tiene actividad biológica cuando ejerce un efecto directo en el organismo. Este efecto puede ser positivo o negativo, dependiendo de la sustancia, dosis y la biodisponibilidad (Paulsen, 2010).

Los “compuestos bioactivos” encontrados especialmente en los alimentos de origen vegetal, son definidos como componentes de los alimentos que influyen en la actividad celular y en los mecanismos fisiológicos, con efectos beneficiosos para la salud

(Chávez, 2015). Estos han mostrado algún efecto benéfico en la salud, que va más allá del normalmente asociado con su papel en el crecimiento, desarrollo y alguna otra función normal del organismo, ya sea en la prevención ó tratamiento de una o más enfermedades y mejorando actividades fisiológicas específicas.

Cuando su origen es vegetal se les conoce como fitoquímicos bioactivos y generalmente intervienen en el metabolismo secundario de las plantas, cumpliendo funciones de colorantes, sustancias aromáticas, sustancias reguladoras del crecimiento, protectores contra parásitos, entre otros (Liu, 2003).

2.2. Ácido Betulínico

2.2.1. Distribución y aislamiento del ácido betulínico

Dentro de los compuestos bioactivos se encuentra el ácido betulínico (AB), o ácido 3 β -hidroxi-20 lup-(29) en-28-oico, es un triterpeno pentacíclico tipo Lupeno ampliamente distribuido en el reino vegetal. Cantidades considerables de ácido betulínico (hasta 2.5%) están disponibles en la corteza exterior de una variedad de especies de árboles que son valiosos para fines madereros, principalmente el abedul, del cual deriva su nombre, aunque también se ha aislado de otras fuentes vegetales como *Quisqualis fructus*, *Coussarea paniculata*, leguminosa argentina *Caesalpinia paraguariensis*, hojas de *Vitex negundo*, *Ilex macropoda*, raíces de *Anemone raddeana*, las hojas y la madera de *Doliocarpus schottiana*, *Tovomita krukovii*, frutos del *Chaenomeles lagenaria*, entre otras (Yogeeswari y Sriram, 2005).

2.2.2. Propiedades físicas del ácido betulínico.

El ácido betulínico es un sólido cristalino blanco que exhibe solubilidad limitada en alcoholes orgánicos, tales como MeOH y EtOH, CHCl₃, y éter, tiene una baja solubilidad en H₂O, éter de petróleo, DMF, DMSO, y benceno, es altamente soluble en

piridina y ácido acético. El AB posee una fórmula molecular de $C_{30}H_{48}O_3$ con una masa exacta de 456.3603 (Cichewicz y Kouzi, 2004).

2.2.3. Propiedades bioactivas del ácido betulínico

El AB posee una serie de efectos farmacológicos, destacando el anti-inflamatorio, el anti-cancerígeno, y actividad anti-VIH. Aceite de la corteza del Abedul (*Betulae pix*) se ha utilizado para enfermedades de la piel, como el eczema. En la Figura 1 se observa la estructura química del AB y de la betulina, su semejante reducido (Moghaddam *et al.*, 2012).

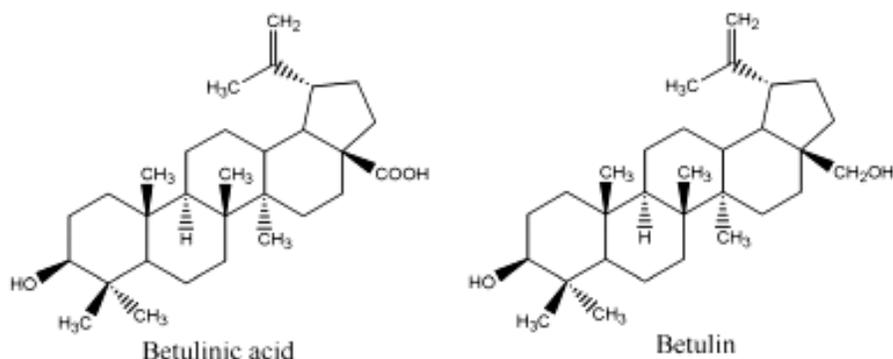


FIGURA 1. Estructuras de ácido betulínico y betulina (Moghaddam *et al.*, 2012).

2.2.3.1. Actividad anti-VIH de derivados del ácido betulínico

Informes indican que los triterpenos pentacíclicos son capaces de inhibir la replicación del VIH-1 en un modelo *in vitro* (Cichewicz y Kouzi, 2004). Entre estos compuestos, el ácido betulínico exhibe actividad inhibitoria contra el VIH-1 en la replicación en células de linfocitos H9 con valores un valor de IC₅₀ de 1.4 μ M, y los valores TI de 9.3 μ M, respectivamente (Kashiwada *et al.*, 1996). Sobre la base de su estructura química, algunos derivados de ácido betulínico se han reportado como inhibidores de VIH-1 de entrada, el VIH-proteasa o de la transcriptasa inversa (RT). Se ha demostrado que derivados de ácido betulínico inhiben el VIH-1 en una etapa muy temprana del ciclo de vida viral. Estos compuestos tienen el potencial de convertirse en complementos útiles

a la terapia actual anti-VIH, que se basa principalmente en combinación de RT e inhibidores de la proteasa (Yogeeswari y Siriam, 2005). El derivado de dimetil succinil de DSB30 betulina (también conocido como YK-FH312 y PA-457) actúa como un inhibidor de la maduración del virus (Sami *et al.*, 2006).

2.2.3.2. Actividad anticancerígena

El AB fue identificado como un inhibidor altamente selectivo del crecimiento del melanoma humano, neuroectodérmico y las células tumorales malignas, se informó que induce la apoptosis en estas células. Se han encontrado alteraciones de las funciones mitocondriales tales como la permeabilidad de transición (PT), las cuales juegan un papel importante en el proceso de apoptosis o muerte celular inducida por agentes quimioterapéuticos (Selzer *et al.*, 2000).

Para comprender el mecanismo de acción del ácido betulínico se han realizado estudios en células de melanoma donde observaron su selectividad citotóxica, así como en otros tipos de tumores malignos incluyendo neuroblastoma, glioblastoma, meduloblastoma, tumor de Ewing, leucemia y en muestras de tumores primarios, así como en modelos de xenoinjerto de ratón (Thurnher *et al.*, 2003). Se demostró que el ácido betulínico no tiene efecto citotóxico hacia células sanas, a diferencia de las células cancerígenas, contra las que mostró una alta selectividad. Además, sólo mostró su potente actividad antitumoral en células *in vitro*, ya que al realizar estudios en modelos de ratón xenoinjertos con melanoma y cáncer de ovario su toxicidad ejercida fue poca, prolongando la vida de estos ratones solo en un tiempo limitado (Sawada *et al.*, 2004).

El AB es activo *in vivo* contra tumores de ovario inducidos por TPA y melanoma en ratones. No mostró ningún efecto tóxico en los ratones incluso a una concentración de 500 mg/kg. A dosis muy bajas de ácido betulínico (5 mg/kg) se encontró que obstaculiza de forma significativa el desarrollo de tumores (Cichewicz y Kouzi, 2004).

2.2.3.3. Actividad antibacterial

El AB extraído de las hojas de *Vitexnegundo* demostró actividad antibacteriana contra *Bacillus subtilis* a una concentración de 1000 µg/disco con una zona de inhibición de 18.8 mm². El ácido betulínico y sus tres derivados 7β-(oxi 4-hidroxibenzoil) ácido betulínico, 7β-(oxi 4-hidroxi-3'-metoxibencil) ácido betulínico y 27-(4-hidroxi-3'-metilbenzoiloxi), aislados de la corteza del tallo de la planta medicinal brasileña *Ziziphus joazeiro*, mostraron una considerable actividad contra bacterias Gram-positivas (Chandramu *et al.*, 2003).

2.2.3.4. Actividad anti-malaria

El AB también se ha evaluado para la actividad antipalúdica contra *Plasmodium falciparum*. Bringmann *et al.* (1997) mostraron que el ácido betulínico presentaba un valor Cl_{50} *in vitro* de 10.46 mg/mL contra *P. falciparum*. La actividad antipalúdica *in vitro* del ácido betulínico también se estudió contra dos cepas de *P. falciparum*, *K1* y *T9-96*, con valores Cl_{50} de 19.6 y 25.9 mg/mL, respectivamente. Sin embargo, experimentos *in vivo* en ratones infectados con *Plasmodium berghei* mostraron que el ácido betulínico no tenía actividad a concentraciones de hasta 250 mg/kg/día (Cichewicz y Kouzi, 2004).

El AB aislado de *Triphyophyllum peltatum* y *Ancistrocladus heyneanus* también exhibió una buena actividad antimalárica *in vitro* contra las fases eritrocíticas asexuales de *P. falciparum*, el parásito de la malaria humana (Yogeerwari y Sriram, 2005).

Las actividades del AB han sido investigadas en distintos sistemas modelo *in vivo* o *in vitro*, simulando el suministro del compuesto bioactivo por algunas vías de administración tales como vía oral (Melo *et al.*, 2009; Cavazos, 2013; Chávez, 2015), inyección intraperitoneal (Steele *et al.*, 1999), vía transdérmica o tópica (Ciurlea *et al.*, 2010).

2.2.3.5. Actividad analgésica y anti-inflamatoria

Algunos triterpenos han demostrado ser eficaces como agentes anti-inflamatorios. La betulina y el ácido betulínico, son los compuestos más eficaces en la inflamación de la piel y edema de la oreja inducido por mezereina, DPT (12-desoxi-forbol 13-tetradecanoato), DPP (phorbol- 12-desoxi 13-fenilacetato) o TPA (12-o-tetradecanoilforbol-13-acetato) en ratones (Sami, 2006). La betulina 1 y el ácido betulínico 2 se encontró que inhiben la actividad de la fosfolipasa A₂ (PLA₂, que desempeña un papel crucial en el proceso de la inflamación) a concentraciones 5 μM en un 30% y 40%, respectivamente (Bernard *et al.*, 2001).

La PLA₂ corresponde a una clase de enzimas que catalizan la hidrólisis de glicerofosfolípidos de membrana en la posición sn-2 para liberar ácidos grasos y lisofosfolípidos. Cuando el ácido graso es el ácido araquidónico (AA), un metabolismo complementario conduce a mediadores pro-inflamatorios tales como prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos y factores activadores de plaquetas (FAP). Por lo tanto, la modulación de la producción de lípidos pro-inflamatorios mediante la inhibición de la actividad de PLA₂ sigue siendo una estrategia potencial para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias (Seno *et al.*, 2001).

En la Figura 2 se presenta la incorporación del ácido betulínico en la proteína. El AB representa un cilindro, de aproximadamente 13 Å de largo con un diámetro de 5 Å, que ocupa el lugar de los sustratos naturales, los fosfolípidos (Bernard *et al.*, 2001).

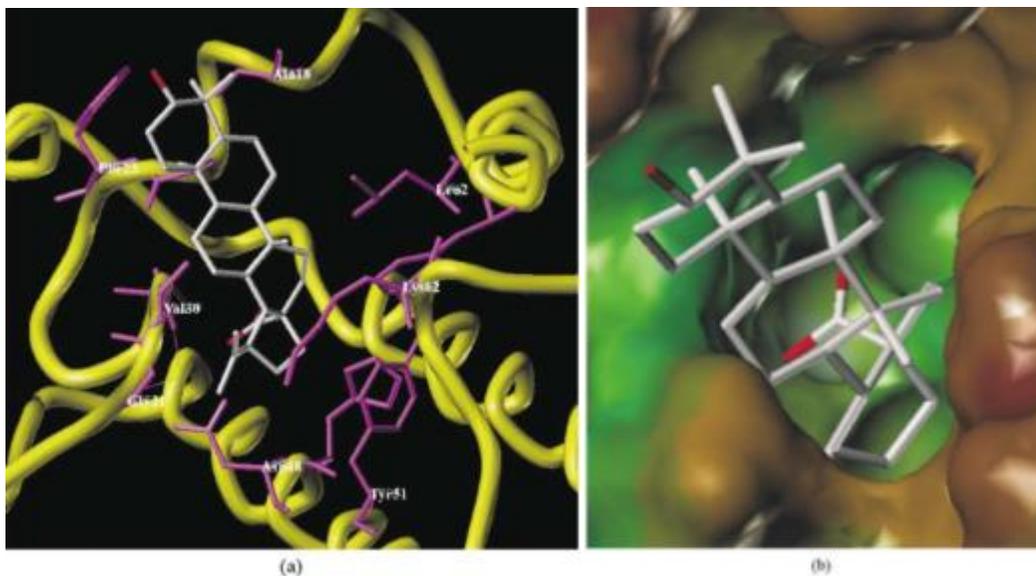


FIGURA 2. Introducción del ácido betulínico al sitio de unión de PLA₂ bovina. (a) Vista del sitio de unión de calcio. (b) Representación del ácido betulínico insertado en el sitio de unión. El grupo carboxílico, ubicado en el fondo de la cavidad, interactúa con el átomo de calcio, no visible en esta perspectiva. Fuente: (Bernard *et al.*, 2001).

Kim y colaboradores (2016) investigaron el mecanismo y efecto anti-inflamatorio del AB en macrófagos inflamatorios RAW264.7 estimulados por lipopolisacáridos (LPS). Encontraron que el AB bloqueó las citocinas pro-inflamatorias en macrófagos RAW 264.7 inducidos por LPS. También suprimió los niveles de ciclooxigenasa-2 (COX-2) y el nivel de ARNm de varias citoquinas pro-inflamatorias, incluyendo al factor de necrosis tumoral α (TNF- α), las interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-12 (IL-12). Y de igual forma encontraron que el AB bloqueó la producción de óxido nítrico (NO) y la expresión de la proteína inducible óxido nítrico sintasa (iNOS).

Los macrófagos son células críticas en el desarrollo de reacciones inflamatorias, ya que producen o secretan varios mediadores pro-inflamatorios y citocinas. La COX-2 está implicada en la síntesis de prostaglandinas E₂ (PGE₂), que produce síntomas inflamatorios, que incluyen fiebre y dolor. La supresión de citocinas y mediadores pro-inflamatorios es vital para controlar las respuestas inmunes. El NO juega un papel

importante en la respuesta inflamatoria como una molécula pro-inflamatoria, que es producida por iNOS. La producción incontrolada o excesiva de NO conduce al desarrollo de diversas enfermedades inflamatorias. Y al encontrar todos estos hallazgos sugieren que el AB, al menos en los macrófagos RAW264.7 estimulados por LPS, ejercen sus efectos anti-inflamatorios al limitar la expresión de enzimas y citoquinas pro-inflamatorias (Kim *et al.*, 2016).

2.3. Definición de inflamación

El término inflamación comprende una compleja serie de respuestas de reparación y protección a lesiones en tejidos, ya sean causadas por infección o lesiones mecánicas. Se puede decir que es un proceso tisular constituido por una serie de fenómenos moleculares, celulares y vasculares de finalidad defensiva frente a agresiones físicas, químicas o biológicas (Villegas, 2014).

La inflamación es la respuesta del sistema inmunológico del organismo, al daño causado a sus células y tejidos vascularizados, por patógenos bacterianos y por cualquier otro agresor de naturaleza biológica, química, física o mecánica. Aunque dolorosa, la inflamación es, normalmente, una respuesta reparadora; un proceso que implica un enorme gasto de energía metabólica. En ocasiones, transcurre hacia una situación crónica que suele dar lugar a una enfermedad degenerativa como artritis, arteriosclerosis o, incluso, cáncer (García, 2008).

La respuesta inflamatoria ocurre en tres fases distintas, cada una mediada aparentemente por diferentes mecanismos:

- (1) Una fase transitoria aguda, caracterizada por vasodilatación local, hiperemia activa e incremento en la permeabilidad capilar.
- (2) Una fase sub-aguda tardía, visiblemente caracterizada por un periodo de hiperemia pasiva, infiltración de leucocitos y fagocitos
- (3) Una fase proliferativa crónica, en la cual ocurre la degeneración de tejidos, lesión endotelial y fibrosis (Estrada *et al.*, 2011).

Cualquier agresión local a un organismo desencadena respuestas en tres niveles de la organización: celular, tisular y orgánico. La respuesta celular es individual y aislada, y tiene por objetivos defender su acervo génico y mantener la conformación nativa de sus proteínas. Para sobrevivir, los organismos deben enfrentarse con los efectos adversos del estrés genotóxico o agresiones que constantemente amenazan la integridad y función de sus genes, y que pueden afectar a los exones o a las regiones no codificantes como los promotores. Tales ataques provienen de agentes ambientales como las radiaciones y los xenobióticos, y también endógenos: productos metabólicos de las células propias que causan lesiones diversas en el ADN. En este contexto, la exposición repetida a la radiación ultravioleta o a algún agente tóxico provoca a corto plazo inflamación cutánea (eritemas y quemaduras solares) y, a la larga, cáncer de piel (García, 2008).

2.4. Inflamación: protocolos *in vivo*

En la búsqueda de nuevos agentes anti-inflamatorios y vehículos para llevarlos al sitio diana, es importante el empleo de modelos experimentales en animales, ya que, dependiendo del protocolo experimental, los resultados se pueden en parte extrapolar al posible comportamiento en humanos. Existen varios tipos de protocolos en función de la forma de aplicación, agente irritante utilizado o duración del proceso inducido. En función de la forma de aplicación se emplean métodos que provocan una irritación tópica, aguda o subcrónica y son válidos para el estudio de sustancias activas en procesos inflamatorios de piel y mucosas. El agente irritante varía en función del modelo que se quiera mimetizar; puede ser AA (ácido araquidónico), TPA, serotonina (5-HT), histamina, carragenina, bradicinina (BK), PLA₂, entre otros. Unos de administración tópica y otros de empleo parenteral (Yueqin, 2007).

2.4.1. Mecanismo de inflamación del TPA

El TPA (acetato de 12-O-tetradecanoilforbol-13) es un éster de forbol, y un potente agente flogógeno promotor de tumores que se encuentra en el aceite de crotón (*Croton tiglium L.*). La administración tópica de TPA provoca un edema agudo con infiltración leucocitaria. El TPA actúa a través de la activación de la proteincinasa-C (PKC), dependiente de Ca^{2+} y fosfolípidos. La PKC desempeña un papel importante en la transducción de señales de una gran variedad de sustancias que activan funciones celulares y de proliferación. La enzima es activada por diacilglicerol (DAG), mediador liberado a partir de fosfolípidos de inositol de la membrana. El TPA y otros ésteres del forbol cuando se intercalan en la membrana pueden actuar como sustitutos del DAG, activando la PKC de forma más permanente que el mediador endógeno, ya que el TPA es difícilmente degradable. La PKC activada actúa a diferentes niveles, incluyendo la liberación de AA, formación de prostanoïdes, incremento de radicales libres y síntesis de diversas proteínas pro-inflamatorias (Young *et al.*, 1989).

El edema de oreja de ratón inducido por TPA se ha utilizado como un modelo animal para probar la actividad anti-inflamatoria. En este modelo, se sabe que el edema de la piel se asocia con un aumento en el contenido de eicosanoides, como la prostaglandina E_2 y el leucotrieno B_4 (LTB_4). Además, no solo los inhibidores de la ciclooxigenasa o 5-lipoxigenasa, sino también antagonistas para LTB_4 inhiben el edema cutáneo inducido por TPA. Estos hallazgos sugieren que los eicosanoides juegan un papel importante en la inflamación cutánea inducida por TPA. El mecanismo del aumento inducido de TPA de los eicosanoides no se conoce por completo, pero se cree que incluye la activación de la proteína C quinasa y la fosfolipasa A_2 , la inducción de la ciclooxigenasa y la translocación/activación de la lipoxigenasa. Además de la inducción de la producción de eicosanoides, se ha demostrado que el TPA induce la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en los queratinocitos, que también se sabe que desempeñan algún papel en la inflamación de la piel. Por ejemplo, un anticuerpo para $TNF-\alpha$ abroga la hinchazón de la piel en la dermatitis de contacto inducida por trinitroclorobenceno en ratones. En la reacción cutánea bifásica mediada por IgE en ratones, además, la exposición al antígeno aumenta el nivel de ARNm de $TNF-\alpha$, y el

tratamiento con anticuerpo anti-TNF- α inhibe las reacciones cutáneas tanto de fase temprana como tardía de la dermatitis (Murakawa *et al.*, 2006).

2.4.2. Inflamación auricular inducida por aplicación repetida de TPA

El método empleado para inducir inflamación fue el desarrollado por Stanley y colaboradores (1991), se basa en el empleo repetido de TPA como agente irritante, que desencadena un proceso prolongado y caracterizado por el incremento del peso de la oreja, infiltración de células inflamatorias e hiperplasia epidérmica, características que pueden recordar algunos de los signos de enfermedades de la piel tales como la psoriasis. Se ha comprobado que los corticosteroides son los únicos fármacos capaces de reducir significativamente los tres parámetros de esta reacción inflamatoria, posiblemente porque reducen la actividad de la PLA₂ y la consecuente producción de eicosanoides estimulada por el TPA. En la aplicación repetida de TPA, inicialmente hay una reacción de características parecidas al edema agudo en donde tras la aplicación de TPA en oreja de ratón, se produce un eritema y vasodilatación entre 1-2 h, y a las 3-4 h aumenta el grosor como consecuencia de la extravasación de líquido, siendo el edema máximo a las 6-8 h. Transcurridas 12-14 h, el edema desaparece, aunque la vasodilatación y el eritema persisten hasta las 24-48 h. A nivel histológico se observa agregación plaquetaria a las 2 h, agregación y adherencia de leucocitos PMN a las células endoteliales entre 4-6 h, y migración hacia el tejido y desgranulación de mastocitos a partir de las 6 h. Al cabo de 6-24 h comienza el acúmulo de leucocitos en la dermis que dan lugar a abscesos subcorneales a las 48-72 h. Tras 48-96 h se observa hiperplasia en la membrana basal epidérmica, debida al incremento del número de células en división. El estudio bioquímico demuestra un incremento de AMPc, PGE₂ y PGE₂ α , además de actividad de la enzima ornitín-descarboxilasa (ODC) y de síntesis proteica.

Y finalmente el décimo día, el peso de la oreja se incrementa, debido al edema dérmico y también a la hipertrofia dérmica, la infiltración celular y posible fibrosis (Stanley, 1991). La ventaja del método es que los fármacos se administran una vez que ya se

ha producido la lesión, por lo que los resultados pueden ser más relevantes desde el punto de vista clínico. Es un buen modelo para ensayar anti-inflamatorios tópicos (Yueqin, 2007).

2.5. Administración de compuestos bioactivos por vía tópica

La evolución de las nuevas tecnologías combinadas con los nuevos conocimientos en biología de la piel tiene innovaciones avanzadas en la disponibilidad de activos y nuevos métodos de suministro de sustancias en la piel. El objetivo de la entrega cutánea es proporcionar una cantidad eficaz de un compuesto activo en el sitio diana de la piel, y por lo tanto optimizar la eficacia y reducir al mínimo los efectos secundarios. Esto se puede lograr por una comprensión de la compleja estructura de la piel y apoyándose en parámetros físicos y químicos de los vehículos aplicados a la piel (Cornell *et al.*, 2010). La administración tópica de fármacos y/o compuestos bioactivos, con el fin lograr una entrega óptima del compuesto por vía cutánea y percutánea, presenta diversas ventajas (Kumar y Katare, 2005), como se muestran a continuación:

- Método no invasivo
- Fácil aplicación
- Aumenta el cumplimiento del paciente
- Aplicación de dosis constante
- Liberación del compuesto bioactivo en el sitio específico
- Interrupción de la administración en el momento que se desee
- Reduce efectos secundarios
- Evita el tracto gastrointestinal

Fuente: (Kumar y Katare, 2005; Raza *et al.*, 2014; Kaur y Singh, 2015).

2.6. La piel como biomembrana

Hay compartimentos definidos y estructuras biológicas dentro de la piel que proporcionan oportunidades para ofrecer activos a través de la misma. La principal barrera de permeación a través de la piel es el estrato córneo (Cornell *et al.*, 2010).

Hay tres vías básicas mediante las cuales los activos penetran a través del estrato córneo:

- Penetración transepidérmica, modulada por la secreción de los apéndices cutáneos. Esta ruta se puede subdividir en vías transcelulares e intracelulares.
- Algunas sustancias hidrofílicas pueden penetrar a través de las glándulas sudoríparas.
- Finalmente, es posible para algunos compuestos penetrar a través de las glándulas sebáceas.

La vía principal es la (1), la ruta transepidérmica (Figura 3), en la que el activo penetra directamente a través de la capa córnea (intacta). La penetración cutánea depende en gran medida de las propias características del compuesto. Hay algunos parámetros reconocidos relativos a la capacidad de penetración percutánea que son comunes a todas las sustancias químicas, algunos son el peso molecular, la constante de disociación (K_d), la solubilidad del compuesto o el coeficiente de reparto octanol-agua (K_{ow}). Como norma general, las moléculas con un peso molecular inferior a 500D penetran mejor que moléculas de mayor peso molecular. La carga neta influye en la penetración de un activo: una molécula no-iónica penetra mejor que una molécula iónica (Wiechers, 1989).

El principal reto para formulaciones tópicas hoy en día es proporcionar una penetración suficiente del fármaco en la piel sin causar alteraciones irreversibles a la función de barrera. Los agentes lipófilos se mueven a través de la barrera por un mecanismo transcelular, mientras que los agentes hidrófilos son propensos a seguir una vía paracelular para cruzar la piel (Raut *et al.*, 2012).

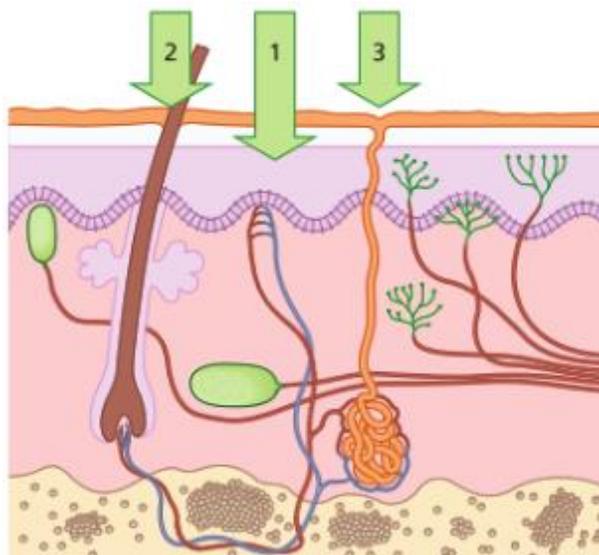


FIGURA 3. Vías para penetrar o cruzar las capas de la piel: (1) a través de la capa cornea intacta; (2) a través de los folículos pilosos con glándulas sebáceas asociadas (3) a través de glándulas sudoríparas (Cornell *et al.*, 2010).

2.7. Sistemas de entrega

En la búsqueda de un vehículo para la entrega del compuesto bioactivo en las capas de piel (entrega cutánea), o través de la piel y en la circulación sistémica (absorción percutánea) han sido desarrollados diversos tipos de sistemas y estrategias de formulación. Las formulaciones basadas en lípidos han sido usadas durante décadas, debido a que mejora eficientemente la penetración de los compuestos a través de la piel. La administración tópica se ha intentado y realizado con éxito utilizando varios sistemas basados en lípidos como, microesferas de lípidos, nanopartículas lipídicas, microemulsiones de lípidos y geles; estos últimos conforman uno de los principales grupos de sistemas de aplicación dérmica, los cuales se han clasificado según diversos criterios, en esta investigación tuvo como objetivo caracterizar los organogeles y nanogeles para posteriormente evaluar el efecto anti-inflamatorio del AB en varios vehículos de aplicación dérmica (Kumar y Karate, 2005).

2.8. Geles

Existen diversas definiciones de estos sistemas; a continuación, se mencionan algunas de éstas.

Flory describió en 1974 los geles como unas estructuras continuas con dimensiones macroscópicas que son permanentes en la escala del tiempo y que, desde un punto de vista reológico, se comportan como un sólido.

La USP (United States Pharmacopeia) define a los geles como sistemas semisólidos que consisten de suspensiones compuestas por partículas inorgánicas pequeñas o moléculas orgánicas grandes interpenetradas por un líquido (Gennaro, 2003).

Recientemente, se ha descrito a un gel como un sistema coloidal de aspecto sólido que fluye al someterlo a esfuerzos relativamente débiles (Reyes-Arellano, 2008).

Un gel es una red polimérica tridimensional reticulada capaz de absorber una gran cantidad de disolvente sin disolverse debido a los enlaces físicos o químicos formados entre sus cadenas (Escalona y Quintanar, 2014).

2.8.1. Estructuras de formación de los geles

Las propiedades macroscópicas del gel están determinadas por la nano y microestructura de la red fibrilar. Para entender mejor el mecanismo de formación de un gel, Estroff y Hamilton (2004), lo asemejan a una proteína, al fragmentar la red tridimensional en estructura primaria, secundaria y terciaria. El esquema de formación de un gel se resume en la Figura 4.

En la estructura primaria, la escala considerada es de Armstrongs a nanómetros y determina la interacción anisótropa en una o dos dimensiones, a un nivel molecular. A la hora de seleccionar moléculas que sean capaces de gelificar, se ha de tener en cuenta que son necesarios en la estructura grupos que proporcionen interacciones de tipo no covalente, como son los enlaces de hidrógeno, por ejemplo, a través de un

grupo amida, interacciones por empaquetamiento π - π o grupos cargados para provocar interacciones iónicas.

En la estructura secundaria, la escala considerada es de nanómetros a micrómetros y define la morfología de los agregados formados por autoensamblaje. Dependiendo de la estructura de la molécula y de variables como la concentración, pH, fuerza iónica, se obtienen diferentes agregados que construyen la estructura fibrilar entrecruzada y son los que proporcionan rigidez a la misma.

En la estructura terciaria, la escala es de micrómetros a milímetros y determina la interacción entre los agregados; es decir, el entrecruzamiento que da lugar a la red fibrilar tridimensional. Aquí son importantes los nodos necesarios para la estabilidad del gel y el grado de homogeneidad de los poros.

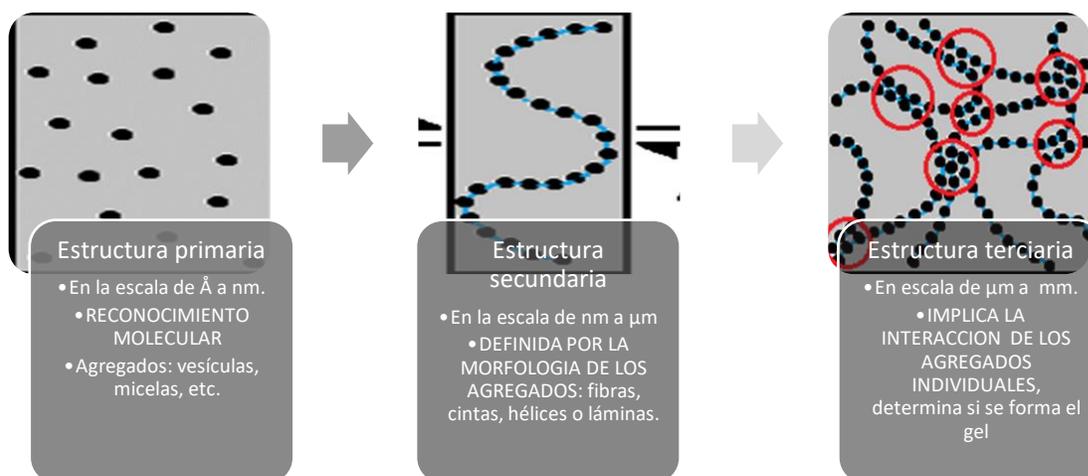


FIGURA 4. Esquema de formación de un gel

2.8.2. Clasificación de los geles

Los geles se pueden organizar según diversos factores (Figura 5). Así se pueden clasificar según su origen. Si se obtienen de recursos naturales o se sintetizan en el laboratorio; según su constitución, si son macromoleculares, es decir, que están

constituidos por macromoléculas o si son supramoleculares. Los geles de tiposupramolecular, son aquellos que se forman por el auto-ensamblaje de moléculas de bajo peso molecular. Dentro de los geles macromoleculares, atendiendo al tipo de fuerza que dirige el entrecruzamiento, se pueden especificar los geles de naturaleza covalente o no covalente. En los geles supramoleculares sólo existe el entrecruzamiento no covalente, los cuales se forman a partir de moléculas de bajo peso molecular (LMOGs: *Low MolecularMass Organic Gelators*) generalmente ≤ 3000 Da, y que se auto-organizan en una red de forma fibrilar (SAFINs: *Self-Assembled Fibrillar Networks*). Lo que caracteriza a estos geles es que la unión de sus moléculas gelificantes se produce mediante interacciones no covalentes, como son los enlaces de hidrógeno, las interacciones π - π , interacciones dador-aceptor, fuerzas solvóforas, fuerzas de van der Waals, y otras, y pueden ser entendidos como “polímeros supramoleculares”, ya que están constituidos por unidades monoméricas que se ensamblan mediante interacciones secundarias direccionales y reversibles. Esta reversibilidad supone una ventaja frente a los geles formados con interacciones covalentes, ya que se puede pasar de un estado fluido a un estado no fluido mediante la influencia de un estímulo externo, por ejemplo, la temperatura, el pH o la luz (Edelsztein, 2010).

Según el medio en el que se forman, se pueden obtener organogeles, si el disolvente usado es de naturaleza orgánica, o hidrogeles, si el disolvente es agua, o aerogeles, en el caso de que el medio sea un gas. Finalmente es posible obtener xerogeles, cuando el medio ha sido eliminado. Existen también moléculas gelificantes, llamados gelificantes anfifáticos, que son capaces de formar geles tanto en disolventes orgánicos como en agua (Edelsztein, 2010; Oteo, 2013).

Esta investigación tuvo como objetivo evaluar la actividad anti-inflamatoria del ácido betulínico llevado en dos vehículos distintos, encontrados en la clasificación de acuerdo al solvente para formar geles, en el apartado 2.9 se comienza haciendo mención de los organogeles y posteriormente en la sección 2.10; se prosigue a describir a los hidrogeles y enseguida de los nanogeles.

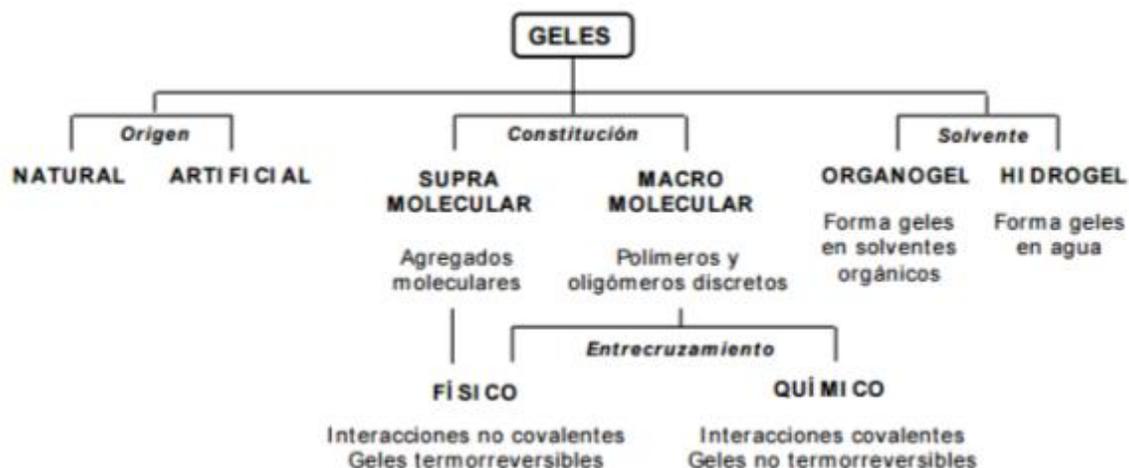


FIGURA 5. Clasificación de los geles (Edelsztein, 2010).

2.9. Organogel

Los organogeles son geles constituidos de líquidos no acuosos, se han mencionado en diversas farmacopeas como entregas tópicas útiles para fármacos lipófilos. No sólo ejercen un efecto local, sino que también son capaces de lograr un efecto sistémico a través de la absorción transdérmica, cuando su naturaleza lipofílica y efecto oclusivo se incrementan por la presencia de un potenciador de penetración (Pénzes *et al.*, 2005).

Los organogeles son sistemas coloidales bi-continuos que coexisten como un sólido micro-heterogéneo (gelificante) y la fase orgánica líquida (Toro-Vazquez *et al.*, 2007) también son llamados "oleogeles" cuando el disolvente es un aceite comestible (Lupi *et al.*, 2013). Los organogeles se forman por la inmovilización de un líquido dentro de una red tridimensional, formado por el autoensamblaje de fibras, formados de moléculas denominadas como gelificantes. La red detiene el flujo de líquido debido a una alteración de la tensión superficial del líquido. El gelificante forma la red que da una estructura de gel. Las interacciones entre las moléculas del gelificante son físicas.

2.9.1. Aplicaciones de los organogeles

Industria de la lubricación: gelificando lubricantes de aceites y grasas con sales metálicas del ácido 12-hidroxiesteárico, con el fin de restringir su movilidad una vez que se aplican a superficies metálicas (Co, 1974; Terech *et al.*, 2000).

Industria alimentaria: Aplicaciones propuestas para la estructuración de aceites comestibles (Lopez-Martínez *et al.*, 2015).

Los organogeles tienen la capacidad de gelificar aceites comestibles en concentraciones muy bajas (~ 0.5 - 2.0% en peso). Las categorías generales de estructurantes de aceite comestible formadores de redes incluyen: triacilglicéridos (TAG), diacilgliceroles (DAGs) (Hughes *et al.*, 2009), monoacilgliceroles (MAGs) (Zetzi y Marangoni, 2012) ácidos grasos (Daniel y Rajasekharan, 2003), alcoholes grasos, ceras, ésteres de ceras (Toro-Vázquez *et al.*, 2007), y mono-estearato de sorbitán (Murdan *et al.*, 1999; Upadhyay, 2007).

La industria cosmética: utiliza la tecnología de organogelación para proporcionar la estructura de los componentes polares de productos de cuidado personal, tales como lápiz labial, cremas hidratantes y protectores solares (Hughes *et al.*, 2009).

Destacando su empleo en la Industria farmacéutica: en la estructuración de productos farmacéuticos dérmicos (Kumar y Karate, 2005).

2.9.2. Propiedades de los organogeles

En la Tabla 1 se resumen algunas de las propiedades de los organogeles.

TABLA 1. Propiedades fisicoquímicas de los organogeles

Propiedades	Efecto
Viscoelasticidad	Siguen el modelo de Maxwell de viscoelasticidad, se comportan como un sólido a velocidades de corte bajas, muestran propiedad elástica. Al aumentar la tensión de corte, las fuerzas de interacción física entre las fibras empiezan a debilitarse hasta que la tensión de corte es suficiente para interrumpir completamente las interacciones entre las fibras, y aquí estos comienzan a fluir.
Termorreversibilidad	Cuando se calientan por encima de su temperatura crítica empiezan a fluir; esto sucede debido a la interrupción de las interacciones físicas entre las moléculas del gelificante atribuidas al aumento de la energía térmica dentro de los organogeles. Al ser enfriados vuelven a su configuración estable.
Quiralidad	La presencia de centros quirales dentro de las moléculas gelificantes, provoca que estos formen un embalaje molecular compacto que proporciona la estabilidad termodinámica y cinética a los organogeles.

Fuente: (Mujawaret *al.*, 2014; Kaur y Singh, 2015).

2.9.3. Tipos de gelificantes que se han empleado para el desarrollo de organogeles

Los gelificantes empleados para elaborar organogeles (organogelificantes), se clasifican en dos categorías dependiendo de peso molecular del gelificante (Balasubramanian *et al.*, 2012) y pueden ser obtenidos de diversas fuentes como se observa en la Tabla 2:

TABLA 2. Tipos de gelificantes empleados para el desarrollo de organogeles

Tipo de gelificantes	Derivados de:
Organogelificantes de bajo peso molecular (LMOGs)	Antrilo y antraquinona
	Esterol (colesterol, ácidos biliares)
	Colesterol- organometálicos
	Esterol- aminoácidos
	Algunos aminoácidos
Organogelificantes poliméricos	Ácidos grasos (fitoesteroles + orizanol, lecitina plurónica, lecitina)
	Polietileno
	Polietilenglicol
	Policarbonato
	Poliésteres
	Etilcelulosa

Fuente: (Balasubramanian *et al.*, 2012).

Diversas investigaciones que emplean fosfolípidos en combinación con ciertos aditivos, han demostrado que funcionan como un vehículo muy prometedor de administración

tópica de fármacos conocidos como organogeles de lecitina (Shchipunov, 2001; Kumar y Karate, 2005; Raut *et al.*, 2012).

2.9.3.1. Lecitina como molécula gelificante

La industria farmacéutica se interesa por los lípidos y en particular, por la lecitina de la soya, que, entre otras aplicaciones, se emplea como emulsionante y gelificante para desarrollar diferentes formas farmacéuticas terapéuticas, cosméticas y nutracéuticas. La lecitina (Figura 6), es un nombre común para 1,2-diacil-sn-3 fosfocolina (Raut *et al.*, 2012). Pertenece a una clase biológicamente esencial de sustancias denominadas fosfoglicéridos o fosfolípidos.

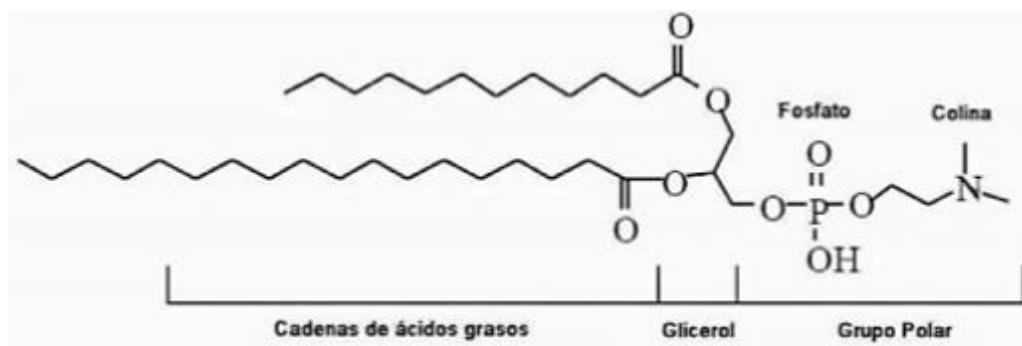


FIGURA 6. Estructura de la 1,2-diacil-sn-3- fosfocolin (Tamargo *et al.*, 2011).

La lecitina de soya es un complejo de fosfolípidos formado por fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol, cuya composición exacta depende de su origen, usualmente, huevos o granos de soya. Los constituyentes principales son fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, los cuales se encuentran no ionizados a un pH fisiológico y no contribuyen a la carga superficial total (Tamargo *et al.*, 2011).

2.9.3.2. Fosfolípidos

Los fosfolípidos (PLs) o fosfoglicéridos son diacilglicéridos que contienen una molécula de ácido fosfórico unida al glicerol mediante un enlace éster y a su vez al ácido se enlaza una base (que puede ser nitrogenada, como la colina o la etanolamina), el aminoácido serina o un alcohol como el inositol, como se puede observar en la Figura 7 (Cavazos, 2013).

Los fosfolípidos son moléculas anfipáticas que forman parte de las membranas celulares y cumplen importantes funciones biológicas en el crecimiento, maduración y el propio funcionamiento de las células, siendo esenciales para la salud humana. Esta propiedad de ser anfipática, es resultado de la presencia de grupos alquilo o acilos hidrófobos y grupos hidrófilos polares. Su naturaleza anfipática les permite formar agregados con el agua, tales como micelas, micelas inversas o vesículas de doble capa. A nivel fisiológico, son los principales componentes de la membrana celular (Chávez, 2015). El fosfolípido más abundante en la naturaleza es la fosfatidilcolina (PC).

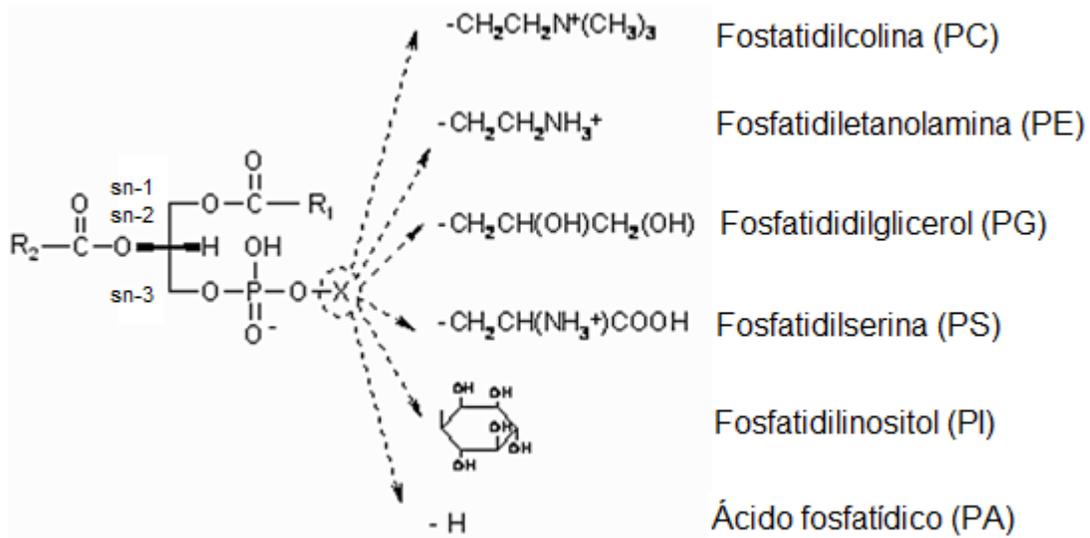


FIGURA 7. Representación esquemática de la estructura química de algunos fosfolípidos naturales (Vikbjerg, 2006).

Además del papel biológico que naturalmente desempeñan, y como consecuencia de su naturaleza anfifílica son empleados como emulsificantes y estabilizantes naturales de productos farmacéuticos, cosméticos y alimentarios, donde presentan biocompatibilidad y biodegradabilidad. Su administración puede ser vía tópica, parenteral u oral, ya que posee afinidad por las membranas celulares sin causar efectos negativos o tóxicos (Cavazos, 2013).

Para mejorar sus propiedades emulsificantes, viscosidad y dispersabilidad, las lecitinas crudas se someten inicialmente al desgrasado, modificación física considerada como el proceso de fraccionamiento más importante en las lecitinas y consiste en la separación de los lípidos neutros, solubles en acetona, de los fosfolípidos prácticamente insolubles. Con este proceso se aumenta el contenido de fosfolípidos en las lecitinas debido a la remoción de los triacilglicéridos sin modificar la proporción de las distintas especies de fosfolípidos. Esto da como resultado una disminución en la cantidad de emulsificante requerida y un aumento en su funcionalidad. El fraccionamiento de lecitina desgrasada con alcoholes como el etanol o el metanol, permite la separación de la fosfatidilcolina y fosfatidilinositol; al ser la primera de éstas más soluble en estos solventes es extraída para obtener una lecitina enriquecida en fosfatidilcolina, con una capacidad emulsificante superior a la de una lecitina desgrasada, muy útil en la emulsificación de sistemas O/W, como en la producción de margarinas (Ochoa, 2013).

2.9.3.3. Fofolipon 90H®

La lecitina hidrogenada y la fosfatidilcolina hidrogenada se obtienen por hidrogenación controlada de las respectivas fracciones de lecitina purificadas. La fosfatidilcolina hidrogenada grado II de ALC (PHOSPHOLIPON® 90 H, LIPOID S 100-3) es una fracción adicional purificada de Grado I, y tiene aproximadamente 95% de pureza. Solo contiene pequeñas cantidades de lisofosfatidilcolina (2% -3%) y los otros fosfolípidos concomitantes (<0.1%).

Tiene una composición de ácidos grasos de aprox. 85 % de ácido esteárico, aprox. 15 % de ácido palmítico, considerado como un material con estabilidad química. Éste Ha sido empleado en la preparación de liposomas y emulsiones para productos cosméticos y farmacéuticos, empleado como protector en piel. Dentro de sus características tiene una temperatura de transición en forma hidratada de aprox. 55°C, es un polvo blanco y cristalino al cual la FDA (Food and Drug Administration) lo determinó como GRAS (generalmente reconocido como seguro), en 2014. Por ello se han realizado diversos vehículos donde se ha empleado y obtenido buenos resultados, algunos de los cuales se citan en la Tabla 3.

TABLA 3. Estudios donde han empleado Fosfolipon 90H® para el desarrollo de vehículos acarreadores de fármacos.

Referencia	Objetivo	Metodología	Resultados
Bhatia et al., 2013	Desarrollar y optimizar un sistema tópico de administración de fármacos basado en un organogel de lecitina acarreador de tamoxifeno	y Fosfolípido y demás gelificadores se mezclan con el disolvente orgánico y se agregó α -tocoferol y propil parabeno	Sistemas de fácil aplicación y bio-compatibles. Con propiedades de viscosidad, resistente a fluir, buena capacidad de dispersión los resultados también podrían extrapolarse con éxito a otros sistemas con otros fármacos de administración tópica
Momoh y Esimone, 2012	Formular liposomas de gentamicina utilizando lípidos y polietilenglicol 4000 (PEG-4000) para la administración oral	Se prepararon usando 30% p/p de Phospholipon 90H® en cera de abejas como matriz lipídica que contenía PEG-4000	La encapsulación y la capacidad de carga del fármaco fue alta, indicando la capacidad de los lípidos para absorber el fármaco. Mostrando buena actividad antimicrobiana especialmente contra <i>Pseudomonas</i>
Sinico et al., 2005	Estudiar la administración de ácido trans retinoico (TRA) en dos formulaciones de liposomas basadas en fosfatidilcolina de soja diferentes	Los liposomas se prepararon a partir de P90 o P90H®, colesterol y TRA para obtener vesículas cargadas positivamente o negativamente	Los liposomas mostraron ser un buen portador para la tretinoína en el tratamiento de la enfermedad de la piel. Los liposomas cargados negativamente hidratan de manera más eficaz la piel de cerdo en el estudio <i>in vitro</i>

2.9.4. Organogeles de lecitina

La primera descripción de los organogeles de lecitina fue al observar que la adición de pequeñas cantidades de agua en soluciones no acuosas con lecitina de soya provoca un aumento brusco de la viscosidad (10^4 - 10^6 veces), originando una transición de la solución viscosa no inicial en un gel o estado gelatinoso (Kumar y Karate, 2005). Los organogeles de lecitina son un sistema micelar único, la matriz de estos sistemas se compone principalmente de:

- Un tensoactivo (lecitina) como moléculas gelificantes,
- Un disolvente no polar como fase externa o continua

Estos sistemas son prometedores vehículos debido a que ofrecen gran variedad de agentes a través de la piel debido a que poseen propiedades de bases oleosas y en base acuosa en su formulación, por ello, se han empleado como vehículos para moléculas de fármacos hidrófilos e hidrófobos. Fármacos hidrófobos se disuelven en la fase de aceite (lecitina + disolvente orgánico) (Raut *et al.*, 2012).

Hasta el momento no existen reportados organogeles acarreadores de ácido betulínico.

2.10. Hidrogeles

Los hidrogeles son redes tridimensionales, hidrófilas y poliméricas capaces de absorber grandes cantidades de agua o fluidos biológicos. Debido a su alto contenido de agua, porosidad y consistencia blanda, simula estrechamente el tejido vivo natural, más que cualquier otra clase de biomateriales sintéticos (Caló y Khutoryanskiy, 2015; Ramirez *et al.*, 2016).

Los hidrogeles han cobrado popularidad en el diseño de sistemas de suministro de fármacos, debido a que poseen características fisicoquímicas y biológicas como:

- Capacidad de hincharse y retener gran cantidad de agua
- Protegen al fármaco de ambientes hostiles

- Sufren transición de fase con respecto a las condiciones ambientales
 - Controlan la liberación del fármaco en respuesta a los estímulos externos como el pH,
- la temperatura, la fuerza iónica y campo eléctrico.

Aunque son muy populares, estos hidrogeles tienen un inconveniente cuando se usan en aplicaciones de respuesta a estímulos en los que la transducción de señales está limitada por la velocidad de difusión. Investigaciones han demostrado que la formación de redes capilares mediante la interconexión de los poros en la estructura polimérica con la reducción del tamaño de partícula los hidrogeles disminuye el camino de difusión, esto a su vez, dió lugar al desarrollo de nanogeles (Maya *et al.*, 2013).

2.11. Nanogeles

Los nanogeles (NG) también llamados nano-partículas de hidrogel (NPs) o nano-hidrogeles con diámetros entre 1 nm y 1000 nm están compuestos de polímeros hidrófilos reticulados y agua (Zha *et al.*, 2011). Su tamaño nanoescala y alto contenido de agua hacen que sean uno de los nanoportadores más eficaces para fármacos y han despertado un interés significativo en aplicaciones biomédicas (Yuan *et al.*, 2012).

A comienzos del 2000, el término nanogel fue definido oficialmente por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC). En comparación con otros nanoacarreadores poliméricos, los nanogeles pueden contener una gran cantidad de agua e incorporar fármacos bioactivos dentro de sus redes tridimensionales de polímeros en nanoescalas (Tahara *et al.*, 2015).

Actualmente solo existe un estudio donde desarrollaron un NG acarreador de ácido betulínico, el cual fue destinado a curar la retinopatía diabética, en dicho estudio emplearon como reticulante Carbopol C974. El NG ABse evaluó contra una nano-suspensión (NS) administrada vía intra-vítrea. Para el desarrollo del NG se elaboró previamente la NS y se liofilizó para posteriormente añadirse al gel y ser neutralizadas

finalmente con TEA (trietanolamida). Como resultados se obtuvo que los NG AB eran eficaces en la etapa inicial de esta patología y mostraron mejor actividad contra la NS (Deepa Pathak, 2012).

2.11.1. Métodos de síntesis de nanogeles

Los métodos utilizados para la preparación de hidrogeles se pueden aplicar para sintetizar micro y nanogeles. No obstante, en los nanogeles la estabilidad coloidal juega un papel muy importante. Estos métodos de síntesis se dividen según el mecanismo de formación de partículas en dos grupos: reticulación de polímeros y polimerización reticulación de monómeros (Figura 8). Ambos enfoques se pueden realizar en solución o en compartimentos bien definidos tales como sistemas micelares, micro y nanoemulsiones, dispositivos microfluidificados o en nanomoldes (Escalona y Quintanar, 2014).

Entre los métodos de polimerización heterogéneos, el más comúnmente utilizado es la polimerización en una emulsión heterogénea (Yuan *et al.*, 2012).

2.11.1.1. Polimerización en emulsión, micro y nanoemulsiones.

Una emulsión es un sistema heterogéneo que consiste en dos fases líquidas inmiscibles, una fase dispersa en pequeñas gotas y una fase continua que las rodea. Además, un tercer componente, los tensoactivos, son necesarios para estabilizar la emulsión. Las reacciones de polimerización que resultan en la formación de nanogeles se pueden llevar a cabo en emulsiones de tipo agua en aceite (W/O) o aceite en agua (O/W) como se aprecia en la Figura 9.

Con las nanoemulsiones se obtienen tamaños de nanogeles entre 150 y 300 nm. El enfoque de nanoemulsión W/O ha sido utilizado para la aplicación de diferentes técnicas de polimerización de radicales controlados. La polimerización en microemulsión inversa W/O, forma emulsiones termodinámicamente estables (Escalona y Quintanar, 2014; Pich y Richtering, 2012).

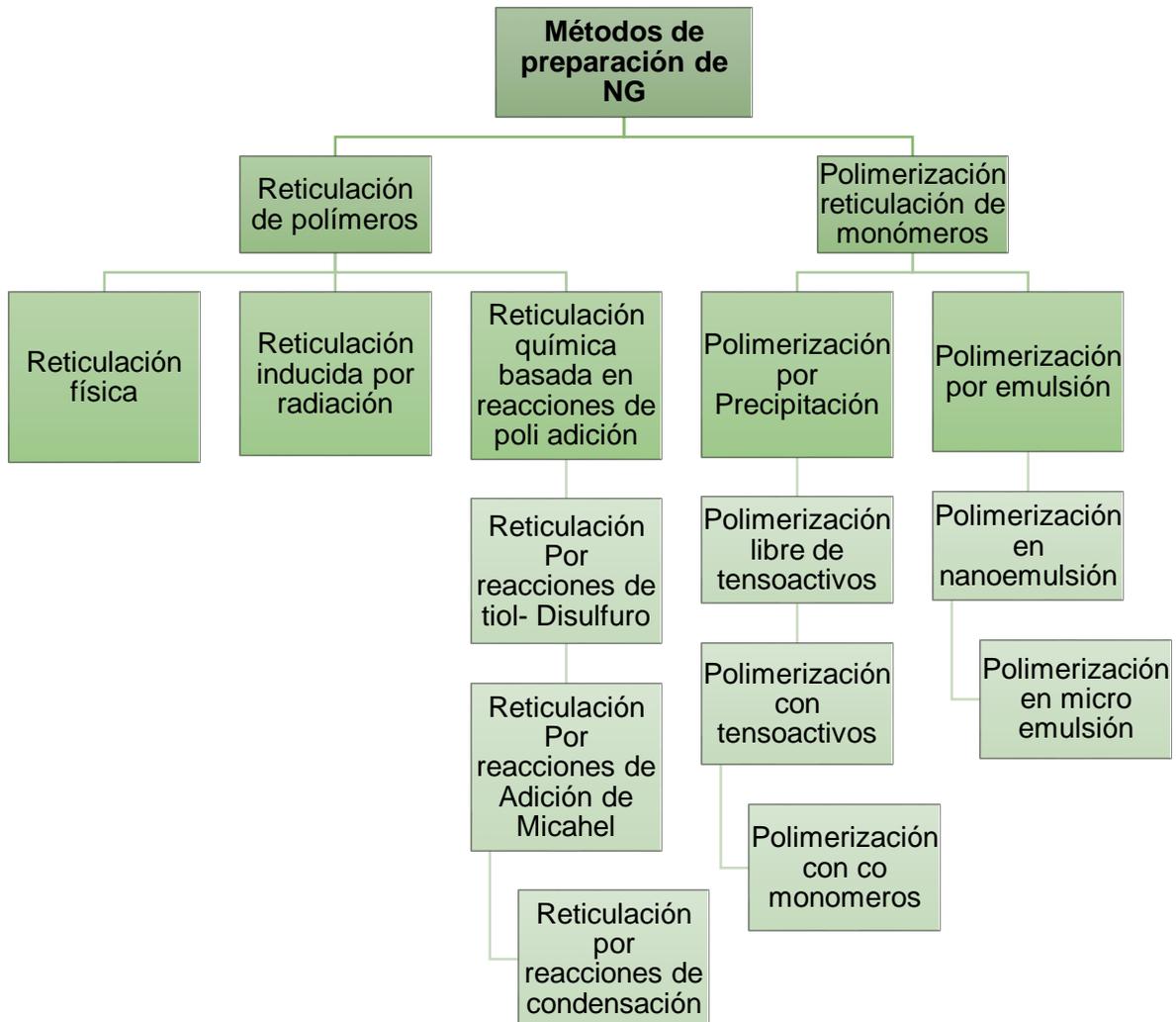


FIGURA 8. Métodos para preparación de nanogeles. Fuente: (Escalona y Quintanar, 2014).

Las ventajas de las técnicas de polimerización de micro y nanoemulsión en comparación con la polimerización por precipitación de tensoactivos, es que las primeras se originan a partir de que las reacciones son producidas en gotitas muy pequeñas las cuales determinan el tamaño de las partículas coloidales. En tales condiciones, se pueden preparar nanogeles extremadamente pequeños y un amplio espectro de monómeros, los cuales son utilizados en el proceso de polimerización (Escalona y Quintanar, 2014).

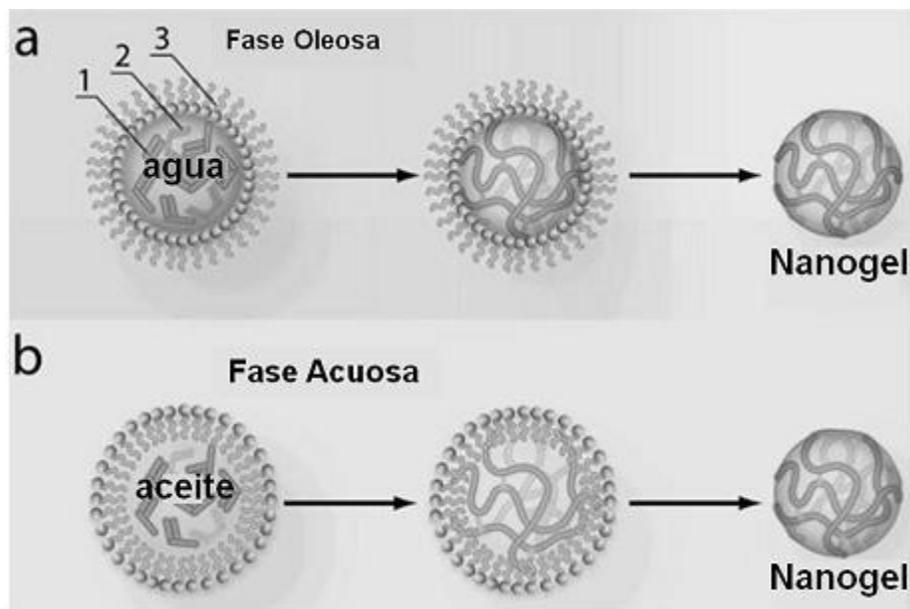


FIGURA 9. Síntesis de nanogeles mediante polimerización en emulsiones: a) Polimerización de monómeros (1) Agentes reticulantes bifuncionales (2) Polimerización en emulsiones W/O estabilizadas con tensoactivos. (3) Los nanogeles pueden ser transferidos a un medio acuoso mediante la eliminación de tensoactivos y solventes orgánicos b) Polimerización de monómeros en emulsiones O/W estabilizadas con tensoactivos. Fuente: (Kabanov y Vinogradov, 2009).

2.11.2. Polímeros empleados en la preparación de hidrogeles y nanogeles

Estos polímeros típicamente contienen grupos hidrofílicos tales como: -OH, -COOH, NH₂, -CONH₂, -CONH-, SO₃H. Los polímeros comúnmente utilizados en la preparación de hidro, micro y nanogeles con aplicaciones farmacéuticas y biológicas, son de origen natural y sintético (Kokkarachedu *et al.*, 2017; Escalona y Quintanar, 2017). Algunos ejemplos de polímeros y monómeros son resumidos en la Tabla 4. Además, en algunos métodos de síntesis se utilizan agentes reticulantes, tensoactivos e iniciadores (Escalona y Quintanar, 2014).

TABLA 4. Polímeros y monómeros utilizados en la preparación de hidro, micro y nanogeles.

Polímeros Naturales	Polímeros Sintéticos	Monómeros
Aniónicos	Aniónicos	Ácido Acrílico (AA)
Ácido Hialurónico (AH)	Poli(ácido acrílico) (PAA)	Ácido Metacrílico (MAA) Ácido
Ácido Algínico (ALG)	Poli(ácido metacrílico) (PMAA)	Acrilamidofenilborónico (APBA)
Carboximetil Celulosa (CMC)	Catiónicos	Acrilamida (AAM)
Carragenina(CAR)	Poliamidoamina (PAMAM)	Butil acrilato (BA)
Sulfato de Dextrano (SDEX)	Polietilenamina (PEA)	Dietilaminoetil metacrilato (DEAEMA)
Sulfato de Condroitina (SC)	Polietilenamina (PEI)	Dimetilamino propilo (DEAP)
	Polivinilamina (PVAM)	Etilenglicol (EG)

Fuente: (Escalona y Quintanar, 2014)

2.11.3. Polímeros sintéticos del ácido poliacrílico (PAA): Carbopol

Particularmente, los hidrogeles formados por polímeros de ácido poliacrílico son muy interesantes además de poseer las ventajas dichas de los nanogeles, también han demostrado ser plataformas ventajosas de suministro controladas por la piel debido a su capacidad para adherirse sobre los tejidos biológicos, fenómeno conocido como biomucoadhesión. Este fenómeno se produce por la interacción de las cadenas

poliméricas con las glicoproteínas de moco o células epiteliales superficiales, permitiendo un contacto más cercano con la superficie biológica por un tiempo prolongado y también un gradiente local incrementado de la concentración de fármaco en el sitio diana. Así, puede aumentar la absorción del fármaco y disminuir su frecuente administración, siendo el mayor beneficio sobre los sistemas farmacéuticos tradicionales. Estos polímeros han sido utilizados en el desarrollo de sistemas de suministro controlado de fármacos en diferentes vías, tal como la vía transdérmica, subcutánea, ocular, rectal, vaginal, pulmonar, dérmica y nasal (Calixto *et al.*, 2015).

Los polímeros de PAA más comúnmente empleados en el desarrollo de hidrogeles farmacéuticos bioadhesivos son el Polycarbophil y el Carbopol (también llamado carbomer) debido a su naturaleza hidrófila y estructura reticulada, son interesantes para controlar la liberación de fármacos (Calixto *et al.*, 2015).

El carbopol es identificado dentro de una familia de polímeros basada en la química del ácido acrílico reticulado modificado (la estructura unitaria del polímero) (figura 10a). Los polímeros se producen a partir de partículas de polímero primario de aproximadamente 0.2 a 6.0 μm de diámetro. Cada partícula puede ser vista como una estructura de red de cadenas poliméricas interconectadas por reticulación (Figura 10b). Dichos polímeros están disponibles como polvos blancos esponjosos (Figura 10c), absorben agua, se hidratan e hinchan. Son modificadores de la reología utilizados para impartir beneficios de espesamiento, suspensión y estabilización. Los grupos carboxilo proporcionados por el esqueleto de ácido acrílico del polímero son responsables de los beneficios del producto (Di Giuseppe *et al.*, 2015).

Los enlaces de hidrógeno sólo se forman cuando se protonan los grupos carboxílicos; esto implica que el hinchamiento de los hidrogeles es dependiente del pH. Los hidrogeles formados por enlaces de hidrógeno tienen propiedades viscoelásticas debido a las extensas interacciones de estos enlaces. Estas uniones son relativamente débiles y pueden alterarse por las fuerzas de cizalla permitiendo su administración (Martínez, 2016).

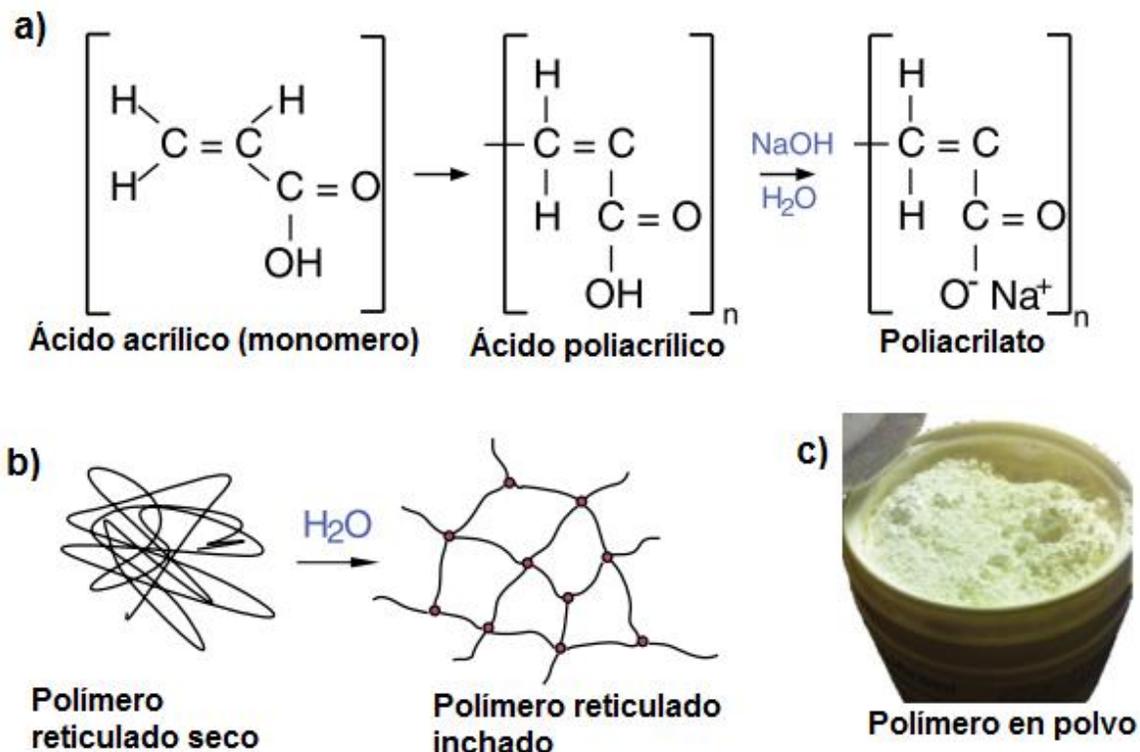


FIGURA 10. Aspecto del Carbopol a) Reacción química de ácido poliacrílico con una base, hidróxido de sodio (NaOH); b) Polímero reticulado seco, se hidrata y se hincha; c) Polímero en polvo. Fuente: (Di Giuseppe *et al.*, 2015).

2.11.4. Nanogeles a partir de nanoemulsiones (NE) empleando carbopol

Los beneficios asociados con el uso transdérmico de nanoemulsiones son mayor solubilidad del fármaco, buena estabilidad termodinámica y efecto potenciador sobre la capacidad transdérmica. La aptitud de la nanoemulsión para aumentar el gradiente de concentración y la actividad termodinámica hacia la actividad en la piel con aumento de la permeación de sus componentes hace que el sistema sea más eficaz para la administración transdérmica. Sin embargo, la baja viscosidad de la nanoemulsión limita su aplicación en el suministro transdérmico debido al uso incómodo. Los geles biocompatibles que tienen una interacción débil con surfactantes ya han sido explorados para modificar el comportamiento reológico de la nanoemulsión. Las matrices de gel variante tales como el carbopol han sido estudiadas para aumentar la viscosidad de la nanoemulsión para aplicaciones transdérmicas. Por lo tanto, la

incorporación de nanoemulsión en la matriz de gel puede dar lugar a nanoemulgel o nanogel, que puede ser más relevante para la aplicación transdérmica en comparación con la nanoemulsión (Arora *et al.*, 2014).

En la Tabla 5 se resumen algunas investigaciones donde han empleado el carbopol como reticulante en nanoemulsiones para el desarrollo de nanogeles.

TABLA 5. Investigaciones donde emplean carbopol en la elaboración de nanogeles.

Referencia	Objetivo	Método	Resultados
Shen <i>et al.</i>, 2014.	Formular nanogeles de Ganoderma lucidum (GLT) para administración tópica con el fin de mejorar el efecto terapéutico de la congelación.	Formulación de Nanosuspensiones de GLT por la técnica de homogenización a alta presión (APV) y se gelificaron con carbopol 940 [®] comparandolo con un gel convencional de carbopol con polvo grueso de GLT.	de El nanogel de GLT incrementó la cantidad acumulativa de GLT en la epidermis cinco veces en comparación con el gel convencional de carbopol con GLP, mostrando que los nanogeles son eficaces para el suministro dérmico adecuada de fármacos poco solubles.
Arora <i>et al.</i>, 2014	Desarrollo de un NG como sistema de administración transdérmica de fármacos poco solubles en agua, ketoprofeno.	El Carbomer 940 [®] se añadió como matriz de gel para convertir la nanoemulsión en nanogel.	El perfil de permeación <i>in vitro</i> de la formulación optimizada se comparó con la nanoemulsión. La velocidad de penetración del nanoemulgel fue dos veces mayor que la de la solución del fármaco.

<p>Mou et al., 2008.</p>	<p>Investigar un sistema de nanoemulsión espesado con hidrogel para la administración tópica de moléculas activas.</p>	<p>Se desarrolló una nanoemulsión de aceite y lecitina de soya, tween 80, poloxámero, PG con APV. Se prepara el gel de carbomer 940® para ser mezclado con la nanoemulsión.</p>	<p>El sistema combinaba la microestructura de la nanoemulsión o/w con la red de gel de hidrogel y tenía una viscosidad adecuada de 133.2 Pa S. El diámetro de partícula fue pequeño y los sistemas mostraron estabilidad a largo plazo. Las velocidades de penetración de los compuestos lipofílicos mostraron ventajas significativas sobre el hidrogel convencional.</p>
<p>De Vargas et al., 2012</p>	<p>Evaluar formulaciones de nanoemulsiones (NE) confinadas en geles para aplicación dérmica.</p>	<p>Las NE fueron preparadas usando el método de emulsificación espontánea: se evaporan los solventes y el carbopol (5%) es dispersado en agua y neutralizado con trietanolamina para ser mezclado con la NE.</p>	<p>Los geles mostraban comportamiento de pseudoplástico no-Newtoniano. Se detectó una elevada cantidad del fármaco en la piel, para las NE de aceite de triglicéridos de cadena media después de la incorporación en hidrogeles.</p>

2.12. Nanoemulsiones

Las nanoemulsiones (NE) son transportadores coloidales (un sistema formado por dos o más fases inmiscibles que pueden ser sólidas, líquidas o gaseosas) que se

componen de dos líquidos inmiscibles, generalmente aceite y agua. Se caracterizan porque uno de los líquidos se dispersa en pequeñas gotas (fase dispersa) en el otro (fase continua) con una distribución de tamaño de unos 20 hasta 200 nm, estabilizadas con pequeñas cantidades de emulsificantes no iónicos y/o polímeros. Son particularmente atractivas por su transparencia y relativamente alta estabilidad cinética (Ochoa, 2013).

Las nanoemulsiones pueden emplearse eficientemente como sistemas de liberación de principios activos a través de la piel, debido a que por su pequeño tamaño de partícula pueden depositarse uniformemente y penetrar a través de la piel y, por su transparencia, fluidez y baja densidad pueden utilizarse estéticamente sobre ella. Sin embargo, sus propiedades reológicas se tienen que mejorar para estos fines debido a que al ser aplicado en la piel debe fijarse un tiempo prolongado. Por ello, en esta investigación se usaron como base para el desarrollo de un nanogel que cumpla con todas las propiedades que harán posible suministrar fármacos por vía dérmica. Sin embargo, las nanoemulsiones no son un sistema en equilibrio, y por lo tanto muestran una tendencia a separarse; no obstante pueden tener cierta inestabilidad a lo largo del tiempo (Gutiérrez *et al.*, 2008).

2.13. Caracterización de nanoemulsiones

La manera directa de evitar las inestabilidades de las emulsiones es conocer sus propiedades.

2.13.1. Tamaño de partícula

El tamaño de partícula en una nanoemulsión es una de las propiedades claves en su caracterización puesto que influye en el tiempo de almacenamiento y estabilidad, las propiedades ópticas, reológicas, biodisponibilidad, sabor y textura del producto (McClements, 2009). El número de partículas en una emulsión es extremadamente grande y aumenta al disminuir el tamaño de partícula (McClements, 2011; Acevedo, 2017). El tamaño de glóbulo de una emulsión es usualmente expresado como el

diámetro de los glóbulos de la fase dispersa; considerando que todos estos tuvieran el mismo volumen en todo el sistema (Chávez, 2015).

2.13.2. Polidispersión

Otra manera de caracterizar las nanoemulsiones es a partir de la polidispersidad del sistema, que indica la uniformidad de una distribución de tamaños, es decir, cuántos tamaños diferentes están presentes en el medio; los cuales pueden ser representados gráficamente en función al número de picos que están relacionados en la distribución del tamaño de partícula. Estos gráficos se definen como monomodal y multimodal, y se pueden observar en la Figura 11 (McClements, 2011; Loyo, 2017). Las distribuciones se conocen como "monodispersas" si la polidispersión es <0.2 . Esta distribución es la deseada debido a que muestra una homogeneidad de tamaño de partícula, y esto se observa con una alta tasa de estabilidad.

La polidispersión de la distribución de tamaño se define normalmente como se muestra en la ecuación 1:

$$\text{Índice de polidispersión} = \left(\frac{\delta a}{a}\right)^2_{Ec. 1}$$

Donde:

- δa es el cuadrado de la desviación estándar
- a es la media de los diámetros

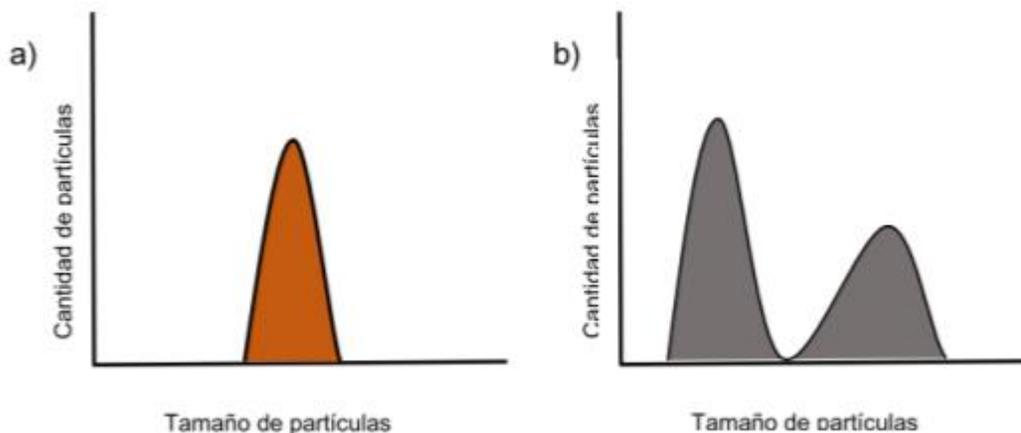


FIGURA 11. Determinación del tamaño de partícula, representación gráfica de modelos: a) Monomodal b) bimodal (McClements, 2011).

2.14. Caracterización de geles

Para caracterizar los geles en general (incluidos NG y OG), es necesario estudiar su estructura desde la escala molecular a la escala macroscópica pasando por la escala nanométrica. Para el estudio de los geles se han utilizado una combinación de diferentes técnicas dentro de las que destaca la reológicas, microscopía avanzada, técnicas de microscopía electrónica o de fuerza atómica, espectroscopía y técnicas de difracción. La información proporcionada por cada una de estas técnicas se ha de combinar, ya que las escalas de medida son diferentes y hay que tener especial cuidado cuando dichas medidas no pueden realizarse en las condiciones normales de gelificación. Por ejemplo, si requieren el tratamiento o secado de la muestra, ya que la estructura sin disolvente puede colapsar y no ser exactamente la misma que en el medio húmedo o gel (Clemente Oteo, 2013). A continuación, se describirán algunas de las técnicas más empleadas para caracterizar estos sistemas.

2.14.1. Determinación de la CCG por método del tubo invertido

La concentración crítica gelificante (CCG) se define como la cantidad mínima de gelificante que se requiere antes de que pueda inducir la gelificación a temperatura

ambiente (Takafuji *et al.*, 2007; Mallia *et al.*, 2009). Si la concentración del gelificante está por debajo de esta concentración, el gelificante fallará al inducir la gelificación y permanecerá en fase líquida. De manera similar, si la cantidad de concentración de la fase acuosa está por encima del límite crítico superior, la gelificación no se produce o se produce un sistema bifásico, donde el exceso del solvente no es retenido en la estructura de la red. Este fenómeno de desorganización en la estructura gelificada con la adición de exceso de agua se conoce como solvatación del gel.

El método más simple para determinar si se forma o no un gel, es llevar a cabo el método de prueba-tubo invertido (Li *et al.*, 2007; Nam *et al.*, 2008). Después de homogeneizar, se permite la formación del gel (la duración de gelificación varía dependiendo de la composición del gel). A continuación, se invierte el tubo de ensayo y si el contenido del tubo de ensayo fluye, el sistema se considera como sol (o tal vez un organogel débil), lo que indica que la composición particular ha fallado para inducir organogelación (Figura 12).

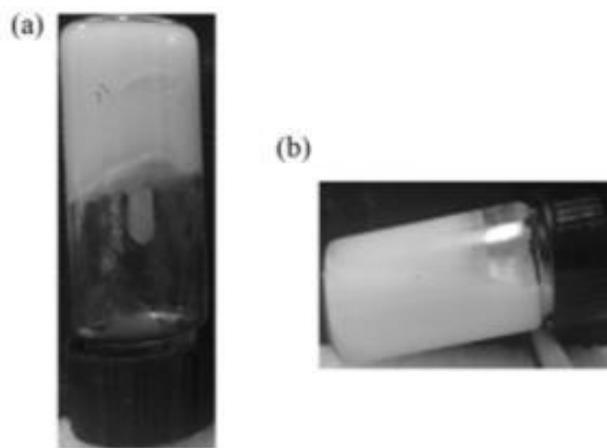


FIGURA 12. Método del test tubo invertido: a) organogel y b) un organogel fallido. Fuente: (Sagiri *et al.*, 2013).

2.14.2. Caracterización estructural (microestructura)

Según el mecanismo de formación del organogel, la estructura molecular de la red tridimensional varía entre organogeles. La arquitectura del gelificante en disolventes orgánicos incluye formas tales como vesículas, túbulos, fibras sólidas, cristales,

varillas, láminas dispuestas en paralelo, hélices, en forma de estrella etc. La mayoría de los productos alimenticios son mezclas de varios componentes. Por lo tanto, la observación microscópica del arreglo estructural de los elementos nos ayuda a comprender posibles interacciones entre ellos. El método de caracterización más simple para analizar las características estructurales de organogeles es el análisis de microscopía (Sagir *et al.*, 2014).

2.14.2.1. Microscopía de luz polarizada (MLP)

Se ha utilizado para analizar la naturaleza cristalina de los organogeles elaborados con ceras y aceites comestibles, donde es posible evaluar el efecto de las condiciones de almacenamiento, velocidad de enfriamiento en los organogeles y birrefringencia de las estructuras cristalinas formadas. La MLP ha mostrado coloides de varios micrómetros de diámetro con intrincadas redes de fibras de geladores ramificados (Sagir *et al.*, 2014).

La microscopía de fase caliente con luz polarizada emplea un elemento de calentamiento controlado unido a una platina del microscopio. La muestra mantenida dentro de un portaobjetos es calentada de manera controlada y monitoreada continuamente a través del microscopio, revelando la secuencia de eventos que se producen durante el ciclo térmico; por ejemplo, la formación de micelas inversas, toroides y su alargamiento en forma de varillas, túbulos o fibras, así como transiciones de fase (Jibry *et al.*, 2004).

2.14.2.2. Microscopía avanzada

Dentro de las técnicas microscópicas, la microscopía de fuerza atómica (AFM), la microscopía electrónica de barrido (SEM) y la microscopía electrónica de transmisión (TEM), en sus diferentes variantes, son muy útiles para el estudio de la estructura del gel en la escala desde micras hasta nanómetros.

En TEM y SEM, la resolución llega a los 0.2 nm, pero convencionalmente implica trabajar a alto vacío, lo que supone secar las muestras.

En SEM se pueden obtener imágenes de alta resolución (aproximadamente de 3-4 nm) de la superficie de la muestra. Las imágenes tienen una apariencia tridimensional y son útiles para la investigación de la estructura superficial de organo, micro y nanogeles. La preparación de la muestra no es sencilla, en muchos casos requiere de recubrimiento con una capa delgada de un material conductor y condiciones de vacío (Esacalona y Quintanar, 2014).

En la Figura 13 se muestra la micrografía de un nanogel elaborado con un carbopol como reticulante, el cual es un vehículo acarreador de triterpenos obtenidos de *Ganoderma lucidum*, el cual fue desarrollado para el tratamiento de congelación. Como se puede observar la imagen no muestra buena resolución, lo cual no favorece una buena interpretación y caracterización de dicho sistema.

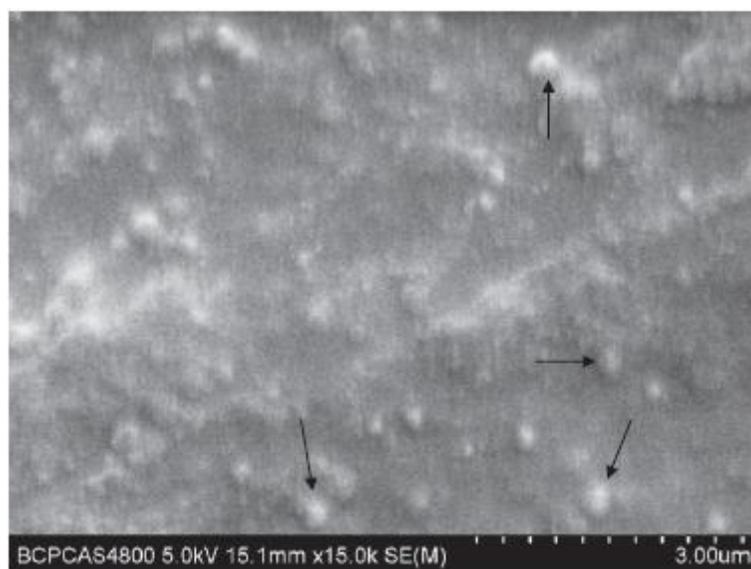


FIGURA 13. Micrografía de un Nanogel acarreador de triterpenos aislados de *Ganoderma lucidum* (Shen *et al.*, 2014).

2.14.2.3. Técnicas espectroscópicas aplicadas a geles

La resonancia magnética nuclear (RMN), el dicroísmo circular (CD), la espectroscopía infrarroja y en algunos casos la fluorescencia, son técnicas espectroscópicas que ayudan a entender la estructura primaria del gel, es decir, las interacciones a nivel molecular. Además, estas técnicas son sensibles a la temperatura por lo que pueden servir para determinar temperaturas de gelificación (Estroff y Hamilton, 2004).

La resonancia magnética nuclear da información de los enlaces formados durante la gelificación y de la temperatura de gelificación. Los tiempos de relajación pueden dar una idea de las partes de la molécula cuyos movimientos conformacionales o rotacionales disminuyen durante la gelificación (Steed, 2011).

Los estudios de espectroscopía infrarroja pueden confirmar la presencia de puentes de hidrógeno y determinar el estado de protonación de los ácidos carboxílicos, pero en el caso de las señales correspondientes al enlace NH, no se puede obtener información cuando se trata de hidrogeles, ya que están ocultas por las bandas del OH del agua (Estroff y Hamilton, 2004; Escuder *et al.*, 2006).

2.14.3. Caracterización reológica

La reología permite describir propiedades macroscópicas del gel. En concreto, en el estudio reológico dinámico, se estudia la respuesta del material a un estrés oscilatorio.

Estudiando los módulos en función de la frecuencia de oscilación, el estrés, la temperatura y la concentración del gelificante se puede caracterizar el gel (Estroff y Hamilton, 2004). La caracterización reológica es útil en la descripción de las propiedades físicas de los organogeles, tales como viscosidad, viscoelasticidad y resistencia mecánica (Barnes, 2000). Se ha encontrado que la mayoría de organogeles muestran propiedades reológicas plásticas (Pénzes, *et al.*, 2005). Desde una perspectiva biomédica, la deformación de geles es necesario después de la aplicación de suficiente cizallamiento para la difusión fácil y mejoramiento de la permeación de fármacos después de la aplicación dérmica. A medida que aumenta la

tasa de corte, la tensión dentro de las muestras aumenta inicialmente de forma no lineal y se acerca progresivamente a la linealidad (Barnes, 2000).

2.14.3.1. Análisis oscilatorio de baja amplitud

Los análisis oscilatorios son frecuentemente el tipo de prueba viscoelástica más utilizado. Esta prueba consiste en someter un fluido a un esfuerzo (τ) o deformación (γ) sinusoidal de una frecuencia dada (ω). Durante este movimiento periódico, el esfuerzo y la velocidad de deformación ($\dot{\gamma}$) evolucionan sinusoidalmente en función del tiempo con la misma pulsación, pero presentando un cierto desfase (φ) una con respecto a la otra como se muestra en la Figura 14. Es importante resaltar, que en gran parte de la literatura se utiliza el desfase denotado por el símbolo “ δ ”, que está dado por el desfase entre el esfuerzo y la deformación o respuesta (Espinosa, 2014). Ambos desfases están relacionados por la ecuación 2:

$$\delta = \frac{\pi}{2} - \varphi \quad \text{Ec. 2}$$

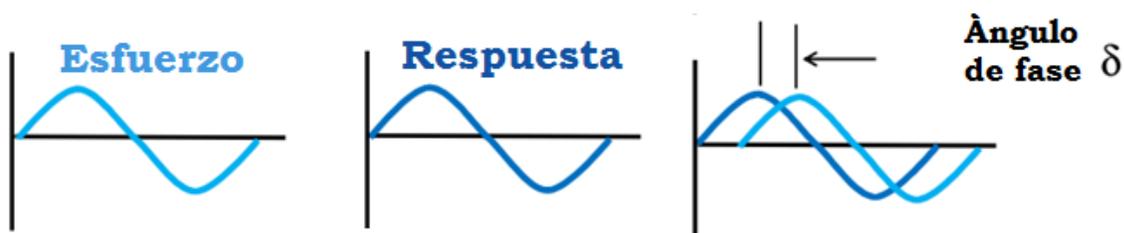


FIGURA 14. Interpretación de pruebas oscilatorias, ángulo de desfase. Fuente: (Rheology Theory and Applications. TA Instruments).

Las propiedades como de sólido de un fluido a cualquier frecuencia son representadas por el módulo elástico o módulo de almacenamiento (G'), mientras que como líquido

son descritas por el módulo viscoso o módulo de pérdida (G''). La unidad de ambos módulos es el pascal (Pa) en el Sistema Internacional y están definidos por las ecuaciones 3 y 4:

$$G' = G^* \cdot \cos \delta \quad \text{Ec. 3}$$

$$G'' = G^* \cdot \sen \delta \quad \text{Ec. 4}$$

Donde G^* representa el módulo complejo de cizallamiento. A partir de estas ecuaciones, el desfase (δ) se puede relacionar al módulo elástico y viscoso por la ecuación 5:

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad \text{Ec. 5}$$

Con la ecuación 5 se demuestra que el ángulo de desfasaje tiene un valor que varía entre 0° (para un sólido elástico, $G'' = 0$) y 90° (para un líquido viscoso, $G' = 0$). En este sentido, si el ángulo de desfase es un indicador de la presencia de propiedades elásticas o viscosas de un fluido, se puede establecer que si el valor de δ está comprendido entre 0° y 45° el fluido tiene un comportamiento más elástico que viscoso, o viceversa, cuando δ está comprendido entre 45° y 90° (Espinosa, 2014).

2.14.3.2. Barridos de deformación

Se sabe que tanto los barridos de deformación como de tensión proporcionan una base excelente para comparar los productos alimenticios de naturaleza visco-elástica. Se han usado éste tipo barridos para diferenciar geles débiles y fuertes, los geles fuertes pueden permanecer en la región visco-elástica lineal sobre cepas mayores que geles débiles (Steffe, 1996).

Estos barridos miden la respuesta del material al aumento de la amplitud de deformación (deformación o tensión), la cual es controlada a una frecuencia y temperatura constante y permiten determinar la región lineal visco-elástica (RLV), así como los valores del esfuerzo y la deformación críticos. El intervalo visco-elástico lineal comprende aquel rango de esfuerzo donde los valores de las funciones viscoelásticas

no varían significativamente. Se han elegido como funciones viscoelásticas de control, G' , relacionado con la energía que acumula el material bajo estudio por ciclo de oscilación y G'' , asociado con la energía que se disipa y por tanto con la componente viscosa (Alfonso *et al.*, 2013).

En la región lineal (Figura 15), las propiedades reológicas no dependen de la tensión ni del estrés. Los módulos de almacenamiento y pérdida versus el parámetro de barrido se representan en la Figura 15.

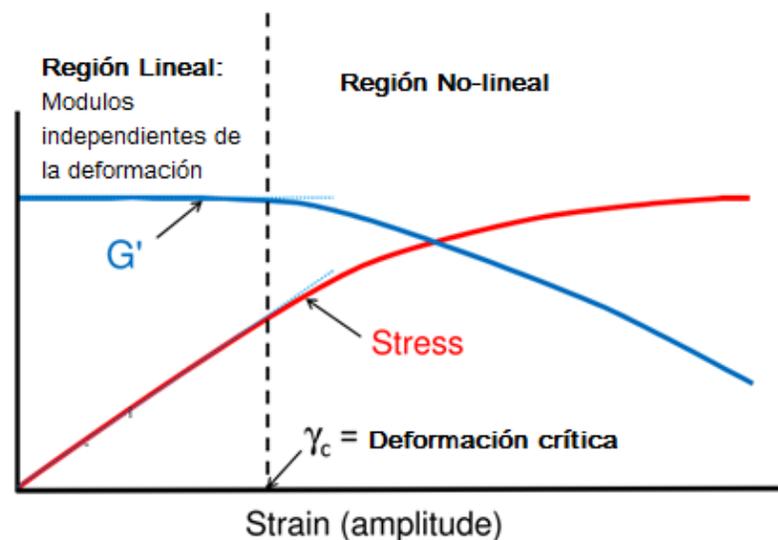


FIGURA 15. Determinación de la región lineal visco-elástica por medio de un barrido de deformación. Fuente: Rheology Theory an Applications (TA Instruments).

El estudio de parámetros dinámicos reológicos, la viscosidad de cizallamiento (η), G' , G'' y tiempo de relajación (τ) permiten dilucidar las propiedades reológicas de organogel. En este tipo de materiales la elasticidad, medida con G' , es mayor que la energía disipada o comportamiento viscoso, determinado por G'' (Terech y Weiss, 1997). La medición se realiza colocando una capa fina de gel, la cual se encuentra entre un componente estacionario y otro móvil. Los tipos de platos estacionarios o móviles pueden ser de tipo paralelos, cilíndricos concéntricos, cono-plano, entre otros.

Los módulos están relacionados con el almacenamiento de energía elástica y la disipación de la energía viscosa, respectivamente. Mediante el uso de estos parámetros la viscoelasticidad lineal o los parámetros reológicos G^* y η^* se pueden calcular (Pénzes *et al.*, 2004).

En términos reológicos, un gel se define como un material en el que el módulo de elasticidad y el módulo de viscosidad son independientes de la frecuencia y el ángulo de desfase (δ) es bajo en un determinado rango de frecuencias (Yang, 2008).

Las propiedades reológicas de los organogeles se ha estudiado ampliamente (Shchipunov y Hoffmann, 1998). Se ha informado de que hay un aumento de 10^4 - 10^6 veces en la viscosidad después de la adición de cantidades pequeñas de agua en comparación con la solución inicial de lecitina (Han *et al.*, 2013), pero en ocasiones, la viscosidad puede aumentar en un factor de 10^{10} inmovilizando aproximadamente 105 moléculas de líquido por molécula gelificante. La composición química de un gelificante también afecta significativamente las propiedades reológicas. Los geles diseñados para uso farmacéutico a menudo llevan medicamentos y éstos pueden afectar su comportamiento reológico (Sagir *et al.*, 2014).

2.14.4. Caracterización Térmica

Organogeles que involucran enlaces físicos son termoestables y pueden permanecer estables durante más de dos años (Edelsztein, 2010). La temperatura de transición de gel a sol se ha estudiado utilizando la técnica de caída de bola (Terech, *et al.*, 2000), el análisis térmico diferencial (DTA), calorimetría diferencial de barrido (DSC) (Toro-Vazquez *et al.*, 2007) y también por medio de reología (Lupi *et al.*, 2013).

DSC es una técnica experimental dinámica que permite determinar la cantidad de calor que absorbe o libera una sustancia, cuando es mantenida a una temperatura constante, durante un tiempo determinado, o cuando es calentada o enfriada a velocidad constante, en un determinado intervalo de temperaturas. Es eficaz para caracterizar las propiedades físicas de los polímeros que componen a los nanogeles y organogeles. Esto permite determinar las temperaturas de fusión, cristalización, y

temperaturas de transición de fases, así como los cambios de entalpía, entropía, la transición vítrea (Ramirez *et al.*, 2016) y otros efectos que muestran cambios en la capacidad calorífica o de calor latente (Schick, 2015). Además, se puede determinar la presencia de agua asociada a los nanogeles y la no asociada, lo que podría ser de utilidad para conocer el grado de hinchamiento.

En los organogeles la temperatura de transición gel-sol ($T_{gel-sol}$), es la temperatura por a la cual se produce la rotura de los agregados auto-ensamblados y se obtiene un sistema fluido, por debajo de la misma se produce la gelificación.

Análisis DSC y DTA de organogeles reportan transiciones térmicas en términos de picos exo y endotérmicas, respectivamente. Durante el calentamiento de un organogel, existe un pico endotérmico a la transición de gel a sol marcado por el inicio de la interrupción en la estructura de red (cuando el gel empieza a fluir). Del mismo modo, durante el enfriamiento, el sistema se somete a su transición de sol a gel como una función de la temperatura. Un pico exotérmico resulta, por la formación de estructuras enredadas. Si el organogel es isotrópico en la naturaleza, la gama de temperaturas de transición no debe ser más de 3-5 °C. Además, su correspondiente calor de gelificación (H_g) y el calor de fusión (H_m) se puede determinar (Toro-Vazquez *et al.*, 2007).

2.14.5. Fundamentos del DSC

Un sistema DSC funcional tiene tres componentes principales: el instrumento en sí, que contiene la electrónica del sistema; la celda, que monitorea el flujo de calor diferencial y la temperatura; y un accesorio de enfriamiento.

El sensor de celda consiste de dos plataformas elevadas separadas para contener la muestra y la referencia. Las cuales están conectadas al bloque de calefacción (base) por tubos de pared delgada que crean resistencias térmicas entre las plataformas y la base. Los detectores de área (termopares) en la parte inferior de cada plataforma miden la temperatura de la muestra y la referencia (Schick, 2016). Un tercer termopar

mide la temperatura en la base, en la Figura 16 se observa una descripción gráfica de los componentes.

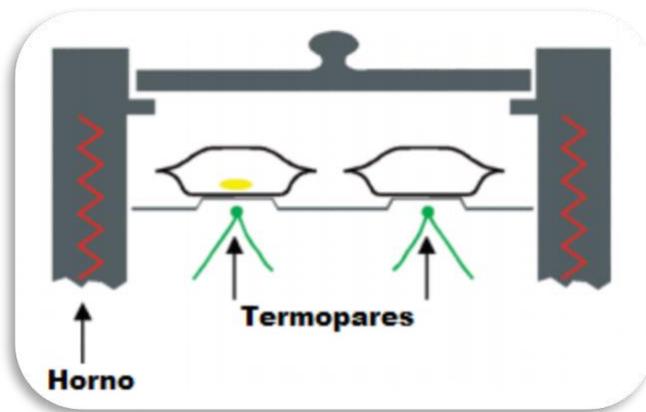


FIGURA 16. Esquema grafico del fundamento del funcionamiento del DSC (Schick, 2015).

En un DSC de "flujo de calor", el material de muestra encapsulado en una bandeja, y la referencia en una bandeja de vacía, se colocan en un disco termoelectrico rodeado por un horno. A medida que se cambia la temperatura del horno, generalmente por calentamiento a una velocidad lineal, el calor se transfiere a la muestra y se hace referencia a través de los termopares. El flujo de calor diferencial a la muestra y referencia se mide mediante termopares de área utilizando el equivalente térmico de la Ley de Ohm.

$$q = \frac{\Delta T}{R} \quad \text{Ec. 6}$$

Donde:

- q = flujo de calor de la muestra
- ΔT = Diferencia de temperaturas entre la muestra y la referencia
- R = Resistencia de del disco termoelectrico

Esta relación no tiene en cuenta el flujo de calor extraño dentro del sensor o entre el sensor y la bandeja de muestra.

La ecuación 7 muestra el modelo de red térmica que representa esta disposición de celda, y la resultante expresión de flujo de calor que describe esta disposición.

$$q = -\frac{\Delta T}{R} + \Delta T_0 \left(\frac{R_r - R_s}{R_r R_s} \right) + (C_r - C_s) \frac{dT_s}{dt} - C_r \frac{d\Delta T}{dt} \quad \text{Ec. 7}$$

Donde:

- ΔT = temperatura medida de la muestra (T_s) menos temperatura medida de la referencia (T_r)
- ΔT_0 = Temperatura medida de la base del sensor menos la temperatura medida de la muestra ($T_0 - T_s$)
- T_0 =Temperatura para el control
- R_r = Resistencia térmica del sensor de la referencia
- R_s = resistencia térmica del sensor de la muestra
- C_r = Capacidad calorífica del sensor de la referencia
- C_s = Capacidad calorífica del sensor de la muestra

El primer término en esta expresión es el equivalente de la expresión convencional de flujo de calor DSC. El segundo y tercer término explican las diferencias entre la muestra y las resistencias de referencia y capacitancias respectivamente. Estos términos tienen su mayor impacto durante las regiones de la curva térmica donde la capacidad de calor de la muestra es el contribuyente predominante al flujo de calor. El cuarto término explica la diferencia en la velocidad de calentamiento entre la muestra y la referencia. Este término tiene su mayor impacto durante los eventos entálpicos (p. ej., Fusión).

3. JUSTIFICACIÓN

El ácido betulínico es un compuesto que ha demostrado resultados positivos sobre la inflamación, sin embargo, por su carácter lipofílico y poca solubilidad, requiere un sistema acarreador para incrementar su efecto.

Los organogeles, gracias a sus componentes afines a las membranas de la piel, facilitan a los fármacos que transportan atravesar las diferentes capas de la piel. Actualmente no existen estudios de organogeles acarreadores de ácido betulínico, y existen pocos estudios que emplean aceites vegetales como medio orgánico.

Por otro lado, los nanogeles han mostrado incrementar la absorción en la piel de diversos fármacos debido al reducido tamaño de partícula.

Ambos vehículos se han convertido en sistemas portadores potenciales de diversos compuestos bioactivos por lo que en este estudio se busca evaluar la bioactividad antiinflamatoria de ambos sistemas sobre un edema auricular en ratones.

4. HIPÓTESIS

La administración tópica de un nanogel y un organogel, como acarreadores de compuestos bioactivos, lograrán una mayor disminución de la inflamación auricular en comparación con otros sistemas de liberación.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

- Evaluar la actividad antiinflamatoria del ácido betulínico probando dos vehículos acarreadores (nanogeles y organogeles) de aplicación dérmica en un modelo murino.

5.2. Objetivos específicos

- Formular, desarrollar y caracterizar organogeles de lecitina como vehículo acarreador de ácido betulínico.
- Formular, desarrollar y caracterizar nanogeles (desarrollados a partir de una nanoemulsión) como vehículo acarreador de ácido betulínico.
- Evaluar la bioactividad de ambos vehículos (nanogeles y organogeles) en un modelo de ratones con edema auricular.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Materiales

La PC (95 % PC de soya) se adquirió de la compañía Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL), Fosfolipon 90H, fue donado por el laboratorio de fisicoquímica de alimentos de la UASLP, la fuente de ácidos grasos de cadena media para desarrollar ambos sistemas fue un aceite comercial (Premiun brand 100% Pure MCT Oil) de la compañía Swanson Health Products (Fargo, Dakota del Norte, Estados Unidos); el ácido betulínico (Grado técnico, 90% de pureza) y el 13-Acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA) fue adquirido de Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany); el glicerol fue grado reactivo (J. T. Baker). El reticulante para los NG (Carbopol 940) fue adquirido de la droguería cosmopolita.

6.2. Metodología general

Esta investigación estuvo compuesta por cuatro etapas generales, las cuales se presentan en el diagrama de flujo en la Figura 17. La primera etapa es el desarrollo y caracterización de nanoemulsiones de ácido betulínico (NE AB) para posteriormente, en la segunda etapa formular y caracterizar los nanogeles acarreadores de ácido betulínico (NG AB), la tercera etapa es el desarrollo y caracterización de los organogeles (OG AB) y finalmente la cuarta etapa, evaluar la bioactividad antiinflamatoria del ácido betulínico en cada uno de los sistemas.

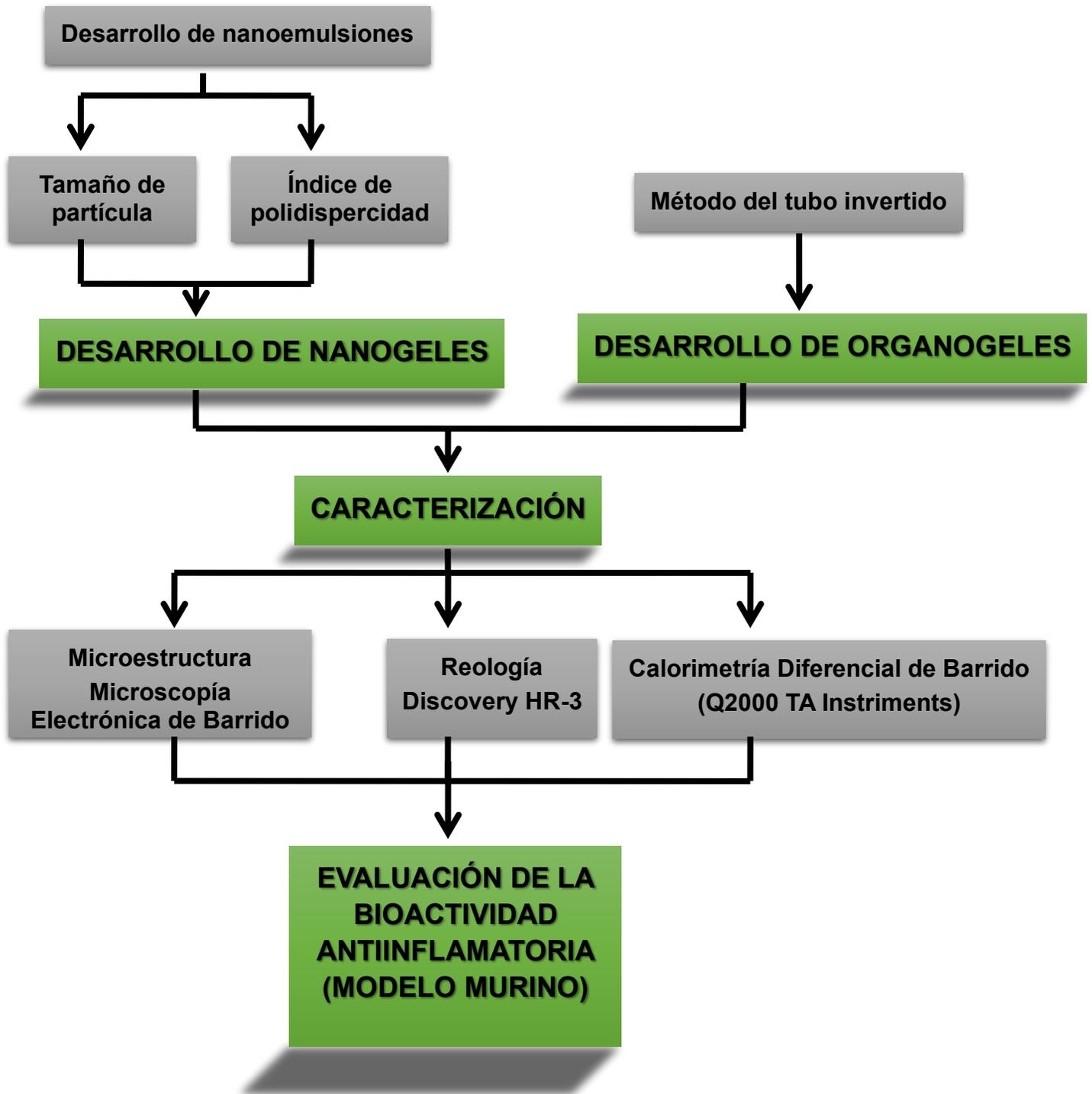


FIGURA 17. Diagrama de flujo de las etapas de la investigación

6.2.1. Desarrollo de las nanoemulsiones de ácido betulínico

Para el desarrollo de las nanoemulsiones se siguió la metodología de Chávez (2015) y Alegría (2017), con algunas modificaciones; para ello cada una de las fases (oleosa:acuosa en la proporción 5:95) fue preparada por separado: en la fase dispersante (acuosa) fue disuelta 1 g de fosfatidilcolina Avanti en el agua Mili-Q a 45°C y se adicionó glicerol, primeramente se homogenizan de forma manual y después se somete a un baño ultrasónico Aquawave 9376 (Barnstead/Labline) por 2 minutos, y por otro lado, en la fase dispersa (oleosa) se pesaron 25 mg de ácido betulínico al cual se adicionaron 0.5 gramos de aceite de triglicéridos de cadena media y al igual que la fase dispersante esta mezcla fue sometida al baño ultrasónico a 45°C hasta que se solubilizó completamente el compuesto bioactivo.

Posteriormente, se mezclaron las dos fases y se obtuvo una emulsión gruesa usando un homogenizador tipo rotor-stator Ultraturrax (T25 digital, IKA) a 20,000 rpm durante tres minutos. Una vez obtenida esta, se sometió a un procesador ultrasónico digital Branson (S-450D, Branson) con una amplitud de 20% durante tres minutos, logrando con esto, disminuir el tamaño de partícula y obtener la nanoemulsión.

6.2.2. Caracterización de las NE AB

6.2.2.1. Análisis del tamaño de partícula

Se determinó el tamaño de partícula y el índice de polidispersidad (PDI) en el equipo Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern Instruments Inc.); este equipo emplea la técnica de Dispersión de Luz Dinámica (DLS) que permite determinar estos dos parámetros, el rango de detección de partícula es de 0.3 nm a 5 µm. Las muestras, antes de someterlas al análisis, se prepararon de acuerdo con Loyo (2017) y Acevedo (2017) consistió en diluir con agua destilada desionizada, utilizando un factor de dilución 1:100 (nanoemulsión: agua), el analito se colocó en la celda Versa Flour Cuvette 170-2415 para la determinación de tamaño de partícula. Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente con un ángulo de dispersión de 90° inmediatamente después de su preparación (T0) y al tercer día de almacenamiento.

6.2.2.2. Evaluación de la estabilidad de almacenamiento

La estabilidad de la NE AB, se determinó con el equipo Turbiscan Lab® Expert (Formulation, 2016). El principio de medición se basa en la dispersión múltiple de la luz estática con muestras (Acevedo, 2017). Para ello, las muestras fueron depositadas en una celda cilíndrica de vidrio y se analizaron por la incidencia de un haz de luz a una longitud de onda de 880 nm que escanea la muestra de arriba abajo, las condiciones de medición fueron a 25 °C durante tres días, esto con el objetivo de asegurar la estabilidad de dicho sistema antes de ser gelificado. Para el análisis de las muestras el equipo cuenta con un detector de transmitancia que mide la cantidad de luz que pasa a través de la muestra y el detector de retrodispersión que mide la luz reflejada por la muestra (Figura 18). El análisis de estabilidad se lleva a cabo como una variación de los perfiles de retrodispersión y transmitancia que permiten detectar cambios en el tamaño de partícula y la presencia de fenómenos de inestabilidad como agregación de partículas y sedimentación entre otros (Loyo, 2017).

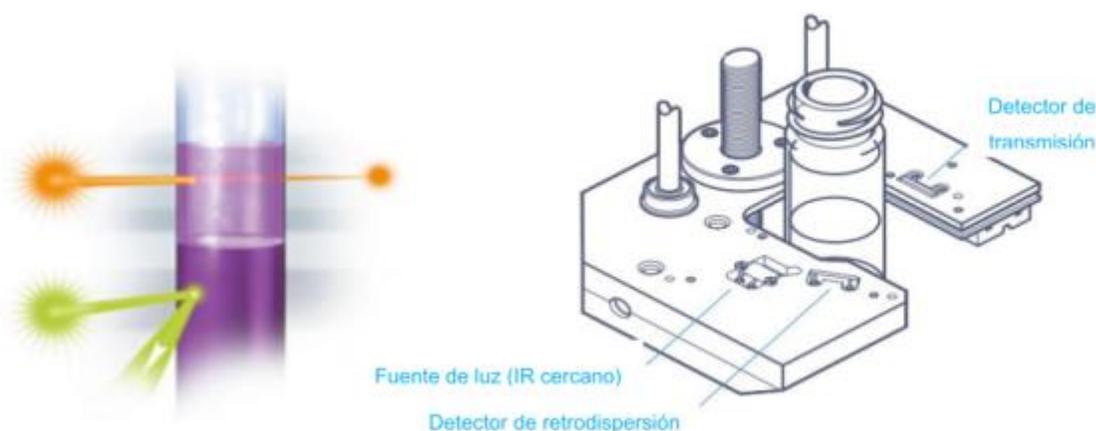


FIGURA 18. Incidencia de luz en la muestra y representación esquemática de las partes del Turbiscan (Formulation, 2016; Loyo, 2017).

6.3. Desarrollo de nanogeles de ácido betulínico

Una vez que han sido desarrolladas y caracterizadas las nanoemulsiones, se procedió a la realización de los nanogeles para ello se siguió la metodología de polimerización de nanoemulsión, la cual ya se describió en el apartado 1.9.1.1 para ello se tomó como referencia el trabajo de De Vargas *et al.* (2012) y de Shen *et al.* (2014) con algunas modificaciones.

Como primer paso se adicionó una concentración determinada de carbopol 940[®] (0.5%, 1% o 1.5%, según el diseño) a la nanoemulsión previamente elaborada y se mezclaron en un agitador magnético durante diez minutos y posteriormente se mantuvo en stock durante un periodo de tiempo específico (4, 12 o 24 horas), para propiciar la activación del polímero a temperatura ambiente. Después del periodo de activación se adicionó la trietanolamida al sistema y se neutralizaron a pH cercanos a siete y se mezclaron para fomentar la formación de las redes poliméricas que forman al gel. Finalmente, los sistemas se almacenaron 24 horas para permitir su estabilización antes de ser caracterizados.

6.3.1. Diseño experimental para la formulación de los nanogeles.

Para el desarrollo de los nanogeles se evaluaron tres concentraciones de reticulante (carbopol 940[®]) y tres tiempos de activación para determinar si estas variables tenían algún efecto en las propiedades reológicas de los sistemas.

Las variables a estudiar son: la concentración de gelante y el tiempo de activación del mismo, estudiando tres niveles en cada una, se realizó un diseño factorial de 3², el cual se muestra en la tabla 6. Haciendo un total de nueve muestras más sus respectivas réplicas.

TABLA 6. Factores y niveles del diseño factorial para la preparación de nanogeles acarreadores de ácido betulínico con un diseño factorial 3²

Tratamiento	Gelificante Carbopol 940® (% p/p)	Tiempo de activación (horas)
1	0.5	4
2	0.5	4
3	0.5	4
4	1	12
5	1	12
6	1	12
7	1.5	24
8	1.5	24
9	1.5	24

6.3.2. Caracterización reológica de los NG AB

Los Nanogeles elaborados a partir de una NE AB empleando carbopol 940® como reticulante fueron medidos utilizando un reómetro modelo Discovery HR2 (TA Instruments, NewCastle, DL, USA) con geometría de cono plato (40 mm de diámetro con 2° de ángulo del cono) equipado con un control de temperatura Peltier situado en la base de la geometría. Las mediciones reológicas se obtuvieron estableciendo la posición inicial del hueco entre la geometría y la muestra de 500 µm. Se permitió que la anchura del hueco variara con el espesor del gel para imponer una fuerza normal de cero durante las mediciones.

Se realizó un barrido de deformación o esfuerzo fijando entre 0.1 y 1000 por ciento de deformación, a una frecuencia y temperatura constante de 1 Hz y 25 °C respectivamente.

Los barridos de esfuerzo permiten determinar la región visco elástica lineal (RVL) así como los valores del esfuerzo y la deformación críticos. La RVL comprende aquel intervalo de esfuerzos para el cual los valores de las funciones viscoelásticas no varían significativamente (Alfonso *et al.*, 2013). Para este estudio se eligieron como funciones viscoelásticas de control, el módulo de almacenamiento o elástico (G'), relacionado con la energía que acumula el material bajo estudio por ciclo de oscilación y el módulo de pérdida (G''), asociado con la energía que se disipa y por tanto con el componente de viscosidad. El punto de corte entre G' y G'' , σ_y (“yield stress”), representa el punto donde al aplicar un determinado estrés el gel se rompe y comienza a fluir; este punto se reconoce cuando $G'=G''$ (Clemente Oteo, 2013).

6.3.3. Caracterización microscópica de los NG AB

Para analizar la estructura de los nanogeles se utilizó un microscopio electrónico de barrido (FE- SEM) modelo MIRA3 marca TESCAN de alta resolución (aproximadamente de 1.5nm), con Beam Deceleration Technology (BDT9) para una resolución con bajos voltajes de haz, debido a que los sistemas son orgánicos, es necesario trabajar con estas condiciones, por el contrario, se dañaría la muestra, el modo de operación del microscopio electrónico de barrido que fue necesario utilizar, para obtener las imágenes de mayor calidad fue trabajando sobre bajo vacío en un modo de operación de la óptica electrónica: *Resolution* con el detector de electrones secundarios (SE), los voltajes que se trabajaron para obtener las imágenes, en diferentes campos fueron entre 9 y 10kv, con distancias de trabajo de ± 9 mm entre el *stap* y el condensador y magnificaciones de 78kx, las imágenes se capturaron con el software *atla* en formato TIF. Como primer requisito las muestras deben estar exentas de líquido, ser lo más planas posibles para que así se genere una imagen más homogénea y la muestra debe ser conductora ya que, de no ser así, se carga durante la irradiación por una acumulación de carga que desvía el haz electrónico y, como consecuencia de ello aparecen distorsiones en la imagen, para evitar este problema la muestra en colocada sobre una cinta de carbono.

Para optimizar la visualización de los sistemas, se realizaron diferentes tratamientos a la muestra:

El primer tratamiento fue liofilizar los sistemas, con el fin de eliminar en su totalidad la actividad de agua de los geles, utilizando una liofilizadora de la marca Freezone, a las siguientes condiciones de trabajo: 0.035mBar, con una temperatura de -53°C por 12 horas. Una vez liofilizados se montaron en el portamuestra del equipo sobre una cinta de carbono, para su posterior análisis.

El segundo tratamiento es realizar una deshidratación con solventes por gradiente de polaridad, con diferentes tiempos de contacto entre el solvente y la muestra.

- EtOH/An (7:3) y EtOH/An (5:5)

6.4. Formulación de organogeles acarreadores de ácido betulínico

Para el desarrollo de los organogeles se siguió la metodología de Dassanayake *et al.* (2009) y Toro-Vazquez *et al.* (2007) con algunas modificaciones. Para la preparación de las formulaciones de los organogeles, previamente se realizó la prueba del tubo invertido la cual se describe en la sección 6.4.1. para determinar la CCG (concentración crítica gelante) y una vez obtenida esta se prosigue a plantear el diseño experimental (sección 6.4.2.). Las muestras fueron preparadas de la siguiente forma, el compuesto bioactivo junto con el Fosfolipon 90H[®] (como agente gelificante) se pesaron en viales con diámetro de 1.5 cm en las concentraciones que se muestran en la Tabla 7 para posteriormente dispersarlos en la fase orgánica (aceite de triglicéridos de cadena media) a 110°C hasta obtener la fusión de todos los componentes del sistema. Una vez logrado solubilizar cada uno de los componentes, las muestras se enfriaron a temperatura ambiente y consecutivamente se sometieron a una temperatura de almacenamiento de 15°C para favorecer la formación de agregados que darán lugar a las redes tridimensionales que impiden el flujo del aceite.

6.4.1. Método del tubo invertido

El método del tubo invertido o del vial invertido es el método más común para confirmar la gelificación. En este método, la cantidad pesada de un gel (3 g) se toma en un tubo de ensayo (dimensiones en cm: 1.5 x 10), este es calentado cuidadosamente a una temperatura óptima para fundir completamente el sistema, en este caso a 110°C. A continuación, se deja enfriar el vial durante un tiempo suficiente antes de invertir (Balasubramanian *et al.*, 2012; Sagir *et al.*, 2014), tres horas a 15 °C (Shi *et al.*, 2014). Después de la inversión durante una hora, la ausencia de flujo indica la formación de gel puede suponerse que la muestra ha establecido elasticidad, es decir tiene un límite de elasticidad (Sagiri *et al.*, 2012).

6.4.2. Diseño experimental para la formulación de los organogeles

Las variables a estudiar son: concentración de la fosfolipon 90H y ácido betulínico, se realizó un diseño factorial de 3². Haciendo un total de 9 muestras más sus respectivas replicas. Todas las concentraciones son expresadas en porcentaje en peso.

TABLA 7. Factores y niveles del diseño factorial para la preparación de organogeles acarreadores de ácido betulínico con un diseño factorial 3²

Tratamiento	Gelificante (%) FFN 90h	Fase orgánica (%) ATCM	Compuesto bioactivo (%) AB
1	25	75	0.17
2	25	75	0.17
3	25	75	0.17
4	35	65	0.5
5	35	65	0.5
6	35	65	0.5
7	45	55	0.83
8	45	55	0.83
9	45	55	0.83

6.4.3. Caracterización de los organogeles

Después del proceso de organogelación se realizó la caracterización de los organogeles con la finalidad de estudiar la influencia de las condiciones de gelificación en las características de los organogeles, tal como lo son el comportamiento reológico y las temperaturas de transición de fases.

6.4.4. Comportamiento reológico de los OG AB

Organogeles de lecitina acarreadores de ácido betulínico fueron medidos utilizando un reómetro modelo Discovery HR2 (TA Instruments, NewCastle, DL, USA) con geometría de placas paralelas (40 mm; la placa superior) equipado con un control de temperatura Peltier situado en la base de la geometría y una placa calentadora

superior (UHP). Las mediciones reológicas se obtuvieron estableciendo la posición inicial del hueco en 500 μm . Sin embargo, se permitió que la anchura del hueco variara con el espesor del gel para imponer una fuerza normal de cero durante las mediciones. El control del equipo se realizó a través del software TRIOS versión 3.2.0.3877 (TA Instruments-Waters LLC, New Castle, DL, USA). El barrido de deformación se realizó entre 0.1 y 1000 por ciento de deformación, fijando la frecuencia y la temperatura a 1 Hz y 5 °C respectivamente. Previamente al barrido de deformación se llevó la muestra a una temperatura de 110 °C y posteriormente se enfrió a 5°C con una rampa de 10°C/min.

Para los seis tratamientos (más réplica), se obtuvieron del módulo de almacenamiento o elasticidad (G') en función de la deformación oscilatoria y se determinó su RLV así como el punto de cruce de G' y G'' .

6.4.5. Determinación de temperatura de transición de fases

Para determinar los cambios de fase en los organogeles se siguió la metodología reportada por Toro-Vazquez *et al.*, (2007), para lo cual se empleó el equipo de Calorimetría Diferencial de Barrido o DSC (TA Instruments DSC Modelo Q2000 acoplado con un sistema de enfriamiento RCS), el equipo fue calibrado y se utilizó para los estudios de gelificación y de fusión dinámicos. Las muestras de las distintas formulaciones de organogeles de lecitina se pesaron (5-7 mg) y sellaron en recipientes de aluminio (pans), se fundieron a 110°C durante 20 min y después se enfriaron a 15°C a una rampa de 10°C/min. Posteriormente, de una isoterma de dos min a 15°C se calentó nuevamente el sistema hasta los 110°C a una rampa de 5°C/min. Se calculó la energía endotérmica para provocar la fusión del sistema (ΔH_m), así como la exotérmica de gelificación (ΔH_g), y se determinó la temperatura a la cual los sistemas mostraban el pico de la endotermia de fusión (T_m), y la temperatura la cual el sistema comienza a tener un reacomodo molecular para formar nuevamente el gel (T_g) por medio del software del equipo (Análisis universal TA-Instruments 2000, v. 4.0). T_m y T_g se calcularon utilizando la primera derivada del flujo de calor. T_g es la temperatura a la

que la primera derivada de la capacidad calorífica de la muestra parte inicialmente a partir de la línea de base. Por el contrario, T_p es la temperatura a la que la primera derivada de la capacidad de calor asociado a la endoterma de fusión cruzando la línea de base. Los valores ΔH_g y ΔH_m corresponden a las áreas bajo la reacción exotérmica gelificación y de fusión endotérmico, respectivamente.

Una vez caracterizados los sistemas se eligió una formulación de nanogel y una de organogel con base a sus propiedades reológicas para finalmente evaluar la actividad anti-inflamatoria del AB en cada vehículo.

6.5. Evaluación de bioactividad *in vivo*

Se trabajó con ratones de la cepa CD-1 de 7 semanas de edad, que fueron asignados al azar en siete grupos de cinco ratones cada uno, se alimentaron con dieta comercial y agua *ad libitum*, y se mantuvieron en un ambiente climatizado de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ con ciclos de 12 h de luz y oscuridad. El cuidado de los animales se realizó de acuerdo a las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana- NOM-062-ZOO-1999.

Se tuvo un total de dos testigos y cuatro grupos como se observa en la Tabla 8.

TABLA 8. Grupos experimentales para el estudio de actividad anti-inflamatoria del AB acarreado en diversos vehículos

GRUPO1	GRUPO2	GRUPO 3	GRUPO4	GRUPO 5	GRUPO 6	GRUPO 7
SANO	TPA	TPA	TPA	TPA	TPA	TPA
TESTIGO	EDEMA	NG AB	OG AB	HG AB	ABL	FR

Donde:

- **NGAB:** Nanogel acarreador de ácido betulínico
- **OG AB:** Organogel acarreador de ácido betulínico
- **HG AB:** Hidrogel convencional acarreador de ácido betulínico

- **ABL:** Ácido betulínico libre
- **FR:** Fármaco de referencia

6.5.1. Inflamación crónica inducida por aplicación repetida de TPA en oreja de ratón

Se siguió el método propuesto por Stanley (1991) y Yueqin (2007). Los animales se distribuyeron aleatoriamente en grupos de cinco, previamente al análisis, se permitió un periodo de adaptación de dos semanas a los ratones. El TPA se administró en dosis de $2\mu\text{g}/\text{oreja}$ en $20\mu\text{L}$ de acetona, depositando $10\mu\text{L}$ a cada lado de las dos orejas del ratón. El agente irritante se aplicó tópicamente cinco veces en días alternos por la mañana. Los vehículos evaluados se aplicaron durante la segunda semana con dos dosis diarias, el último día de experiencia sólo se aplicó por la mañana y 6 horas más tarde se sacrificaron los animales por desnucamiento y se extrajeron porciones de las orejas de 7mm de diámetro con un sacabocados. En la Figura 19 se muestra un diagrama donde resume lo anterior.

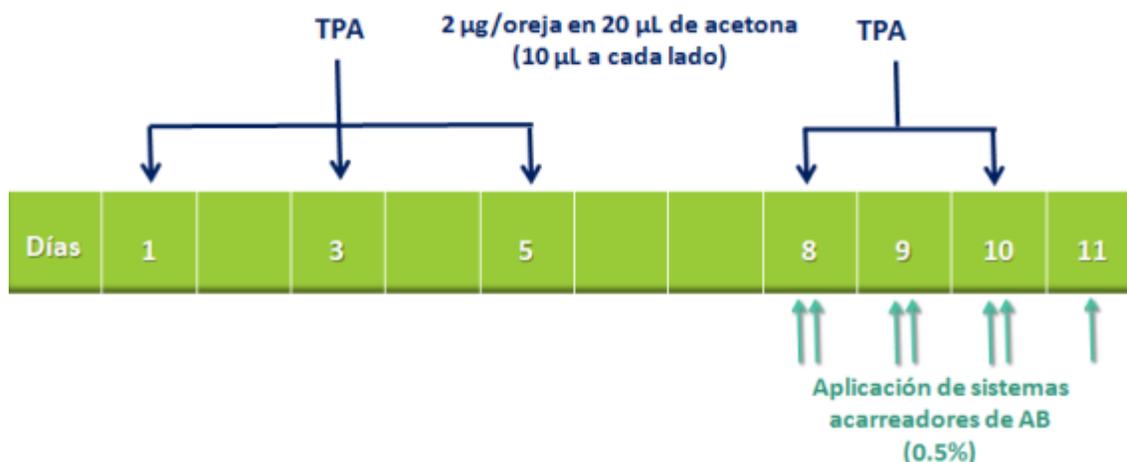


FIGURA 19. Esquema del modelo para inducir inflamación crónica y evaluar la actividad anti-inflamatoria de diversos sistemas.

Se pesaron las orejas y se determinó el edema por diferencia de peso con respecto a un grupo control. La actividad antiinflamatoria se evaluó mediante el cálculo del porcentaje de inhibición del edema, según la siguiente expresión matemática:

$$\%I = \frac{\Delta P_c - \Delta P_p}{\Delta P_c} \times 100 \quad \text{Ec. 8}$$

Donde:

ΔP_c = Media de pesos de las orejas tratadas con TPA (grupo edema) – Media de pesos de las orejas del grupo sano.

ΔP_p = Media de pesos de las orejas tratadas con el sistema acarreador – Media de pesos de las orejas del TPA (grupo edema).

6.5.1.1. Análisis estadístico

Los resultados de los diseños fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) y la comparación de medias mediante la prueba Tukey, con un nivel de significancia del $p < 0.05$ utilizando el software estadístico MINITAB 17.

6.6. Análisis histológico

Una vez obtenidas y pesadas las porciones de las orejas, los tejidos se conservaron en formaldehído neutralizado al 10% para realizar el estudio histológico de cada uno de los tejidos sano y enfermos.

Posteriormente se realizaron tres cortes en cada una y se encapsularon en un histocassete dejándolo un periodo de 24 horas en formol al 100%, a este paso se le conoce como fijación y tiene como objetivo fijar y preservar el tejido manteniéndolo intacto por un largo periodo evitando que se deteriore por efectos de autólisis o por ataque de microorganismos.

Consecutivamente se pasaron al procesador automático de tejido, los pasos que se llevaron a cabo dentro del procesador son los siguientes. Deshidratación, aquí se deshidrataron los tejidos con alcohol al 70, 80, 90 y 100% durante 8 horas, esto para

que haya un desprendimiento celular de manera gradual y obtener finalmente la muestra deshidratada para facilitar la incorporación de la parafina. En el aclarado, las muestras se sometieron a xilol (3 horas) donde es un lavado entre el alcohol y la parafina, después se vertió parafina al tejido a una temperatura de entre 50-60°C y se dejó reposar hasta que la parafina se secó. Posteriormente las muestras se volvieron a meter en parafina a 60°C para que se deshiciera el bloque formado previamente y se colocaron en un molde de inclusión al cual se le agregó nuevamente parafina líquida. Se enfriaron a 4°C y finalmente se desmontó el bloque de parafina que contenía la muestra. Este proceso es llamado inclusión.

A continuación, se realizaron los cortes transversales (5 µm) de la muestra con ayuda de un micrótomo de deslizamiento (Microm), los cortes se desparafinaron en una estufa convencional a 60 °C para eliminar los restos de parafina y se utilizaron una serie de alcoholes decrecientes para rehidratar el tejido y este pueda ser teñido por los colorantes acuosos.

Y finalmente se concluye el proceso con la tinción, una vez tenidos los tejidos nuevamente hidratados se colocaron en hematoxilina por cinco minutos (encargada de teñir los núcleos de color azul o violeta), se volvieron a lavar con agua y se pasaron por baño rápido de alcohol ácido. Posteriormente, las muestras fueron colocadas en carbonato de litio, se volvieron a lavar con agua y se pusieron en cuatro baños de eosina para teñir los citoplasmas de color rojo. Se colocaron en alcohol al 96% por tres minutos, alcohol absoluto por dos minutos y xilol-absoluto, por último, se colocaron en xilol para montar la muestra en el cubreobjetos.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Caracterización de nanoemulsiones

7.1.1. Tamaño de partícula

La nanoemulsión O/W de ácido betulínico empleada para el desarrollo de los nanogeles se desarrolló a una relación 5:95 bajo las mismas condiciones reportadas por Chávez (2015) y Alegría (2017). La fase oleosa utilizada fue aceite de triglicéridos de cadena media, constituido por ácido caprílico (68.93 %), ácido cáprico (30.77 %) y una fase continua con 10% de PC sin modificar. Estas condiciones se sometieron en el equipo de emulsificación a una amplitud del 20% (90 W) y un tiempo de sonicación de 3 minutos, obteniendo tamaños nanométricos con un promedio de 97.35 nm (DS= 9.713). Con esto se puede corroborar que estos sistemas son adecuados y cumplen con la descripción de una nanoemulsión (rango de 50 a 500 nm) (McClements, 2011).

7.1.2. Polidispersidad

El índice de polidispersidad mide la dispersión de la distribución del tamaño de partícula y, por lo tanto, valores pequeños de Pdl indican una distribución de tamaño de partícula estrecha (Yuan *et al.*, 2008), valores cercanos a 0.2 representan una buena estabilidad, mientras que valores cercanos a 1 indican una baja calidad y un nivel muy alto de polidispersidad (Klang *et al.*, 2011). Los resultados observados de Pdl= 0.198 sugieren una buena estabilidad y son cercanos a los reportados por Alegría (2017). La Figura 20 muestra un perfil típico de la distribución del tamaño de partícula en las nanoemulsiones, la intensidad de la dispersión de una partícula es proporcional a la sexta potencia de su diámetro (a partir de la aproximación de Rayleigh's). Las distribuciones de tamaño de partícula fueron monomodales y aquí se corrobora con la

distribución de tamaño (Percentil D90) el cual fue de 197 nm, este indica el valor que está por debajo del 90% (Percentil D90) de la distribución.

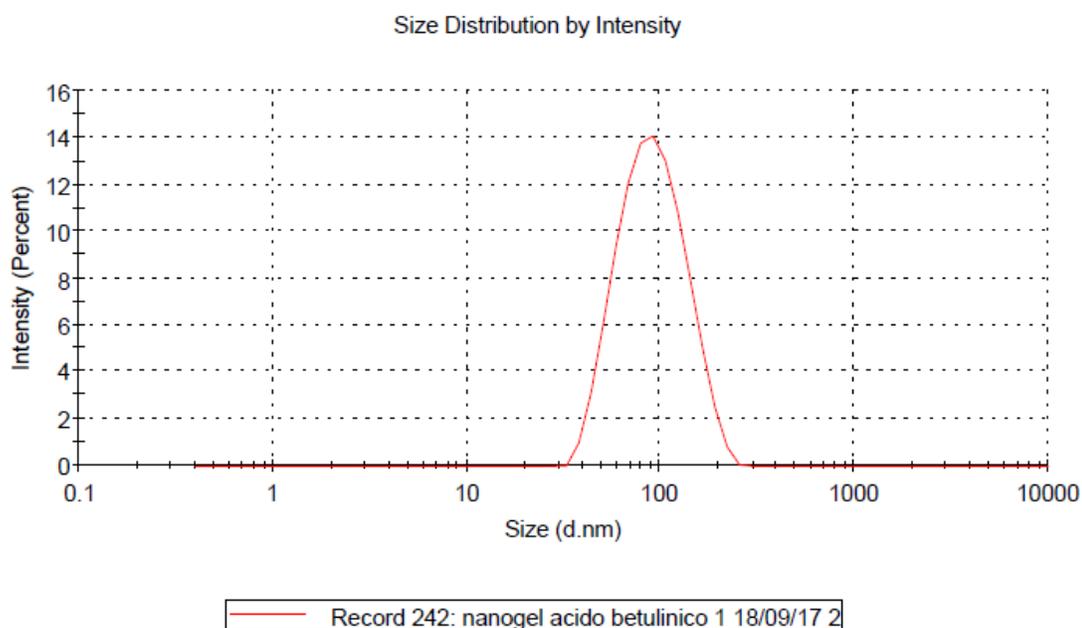


FIGURA 20. Distribución de tamaños de partículas de las NE AB.

7.1.3. Estudio de estabilidad de la NE AB

También se evaluó la estabilidad de las NE AB por tres días mediante el equipo Turbiscan Lab® Expert, con la finalidad de comparar y comprobar los resultados obtenidos por el Zetasizer. En la Figura 21 se muestra la apariencia translúcida de las nanoemulsiones de AB y en la Figura 22 se comprueba que el sistema permanece estable por tres días después de la elaboración, a una temperatura de almacenamiento de 15°C.

Con los resultados obtenidos al caracterizar estos sistemas se puede determinar que los sistemas fueron estables al menos tres días después de su elaboración, presentando tamaños de partícula favorables para reticularlas con el carbopol 940®.

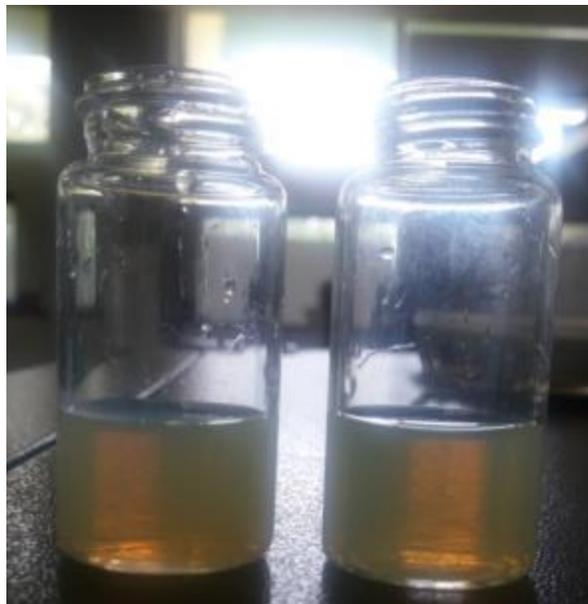


FIGURA 21. Apariencia tipo translúcida de las NE AB.

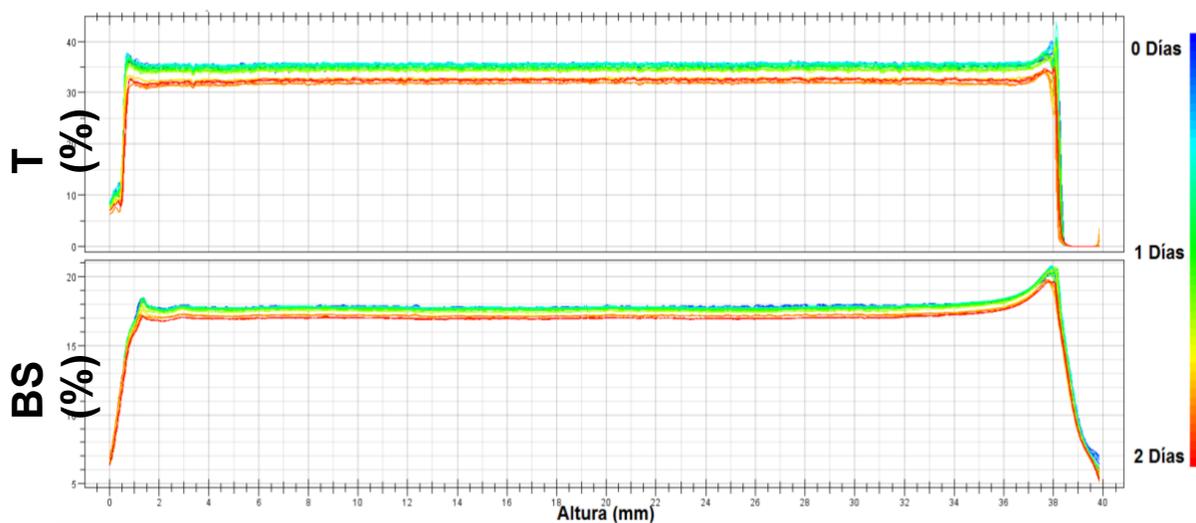


FIGURA 22. Gráfica de estabilidad de la NE AB a los días de su preparación.

7.2. Caracterización de Nanogeles acarreadores de AB

7.2.1. Caracterización reológica de los NG AB

El barrido de deformación o esfuerzo se realizó entre 0.1% y 1000% de deformación, fijando la frecuencia y la temperatura a 1 Hz y 25 °C, respectivamente.

Los barridos de esfuerzo permiten determinar la región viscoelástica lineal (RVL) así como los valores del esfuerzo y la deformación críticos. La RVL comprende aquel intervalo de esfuerzos para el cual los valores de las funciones viscoelásticas no varían significativamente (Alfonso *et al.*, 2013). Para este estudio se eligieron como funciones viscoelásticas de control, el módulo de almacenamiento o elástico (G'), relacionado con la energía que acumula el material bajo estudio por ciclo de oscilación, y el módulo de pérdida (G''), asociado con la energía que se disipa y, por tanto, con el componente de viscosidad. El punto de corte entre G' y G'' , σ_y (yield stress), representa el punto donde al aplicar un determinado esfuerzo de corte, el gel se rompe y comienza a fluir. A este punto se reconoce cuando $G'=G''$ (Clemente Oteo, 2013).

En la Tabla 9 se muestran los parámetros que determinan la viscoelasticidad de los sistemas evaluados, el módulo de almacenamiento o elasticidad (G') y el punto de corte en función de la concentración del reticulante y del tiempo de activación del mismo. Los parámetros resultantes de la regresión fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) y la comparación de medias mediante la prueba Tukey, con un nivel de significancia del $p=0.05$, utilizando el software estadístico MINITAB v. 17. Los resultados muestran que el sistema con mayor % de carbopol y tiempo de activación (tratamiento 1.5%, 24h) fue significativamente diferente de los demás tratamientos en ambos parámetros analizados, mostrando una media mayor de G' , lo que se traduce en una mayor elasticidad del sistema. Se observa que conforme disminuye la concentración del carbopol, disminuye esta propiedad del material para regresar a su forma original, o casi original, después de ser sometido a un esfuerzo de deformación

Islam *et al.* (2004) reportaron valores de punto de cruce de 86 y 89 Pa para geles elaborados con el mismo reticulante donde el disolvente fue agua con polietilenglicol (30% p/p) y glicerol (1% p/p); estos valores, como era de esperarse, tuvieron valores mas altos que los hidrogeles testigos, elaborados en este estudio, los cuales se desarrollaron con agua, reticulante y el AB previamente diluido en acetona; sin embargo, fueron menores que los valores obtenidos en todas las formulaciones de NG AB (ver Tabla 9).

TABLA 9. Determinación del intervalo viscoelástico lineal a través del módulo de almacenamiento y punto de cruce.

TRATAMIENTO	MODULO DE			
	PUNTO DE CRUCE		ALMACENAMIENTO (G')	
	Media (Pa)	Tukey	Media (Pa)	Tukey
1.5%24h	154.71	A	834.29	A
1.5% 12h	140.27	A,B	806.40	B
1.5% 6h	138.20	A,B	772.30	C
1% 24h	120.06	B,C	682.29	D
1% 12h	115.00	C	665.22	D,E
1% 6h	112.6	C	652.13	E
0.5% 24h	108.17	C	614.74	F
0.5% 12h	112.37	C	615.89	F
0.5% 6h	108.17	C	603.50	F
0.5% Testigo	58.22	D	255.93	G
1% Testigo	52.23	D	280.48	G
1.5% Testigo	43.85	D	276.79	G

La Figura 23 es una representación de todos experimentos, en donde se puede observar que G' es superior en al menos un orden de magnitud a G'' ; un comportamiento característico de los geles, ya que son materiales más elásticos que viscosos (Menger y Caran, 2000).

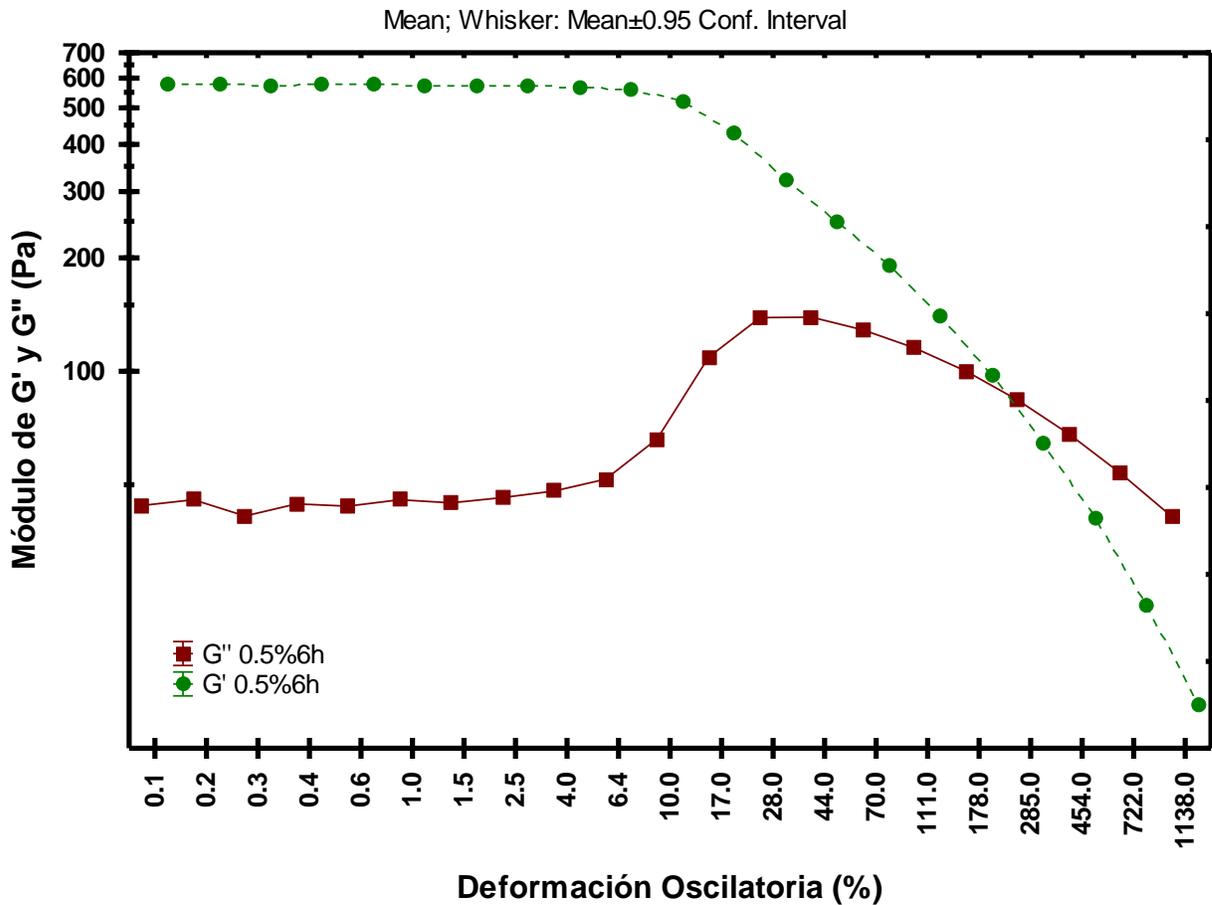


FIGURA 23. Barrido de deformación (Tratamiento 0.5%-6h)

A bajos esfuerzos de deformación se alcanza una meseta o “plateau, en la que el módulo elástico”, que se caracteriza por poseer módulos relativamente elevados, en esta investigación se denota como G' . De los cuales se obtuvieron valores de 600 a 800 Pa, los cuales difieren con el trabajo anteriormente mencionado donde exhibieron valores de 345-436 Pa (Islam *et al.*, 2004).

La región visco elástica lineal (RVL) de los NG se vuelven dependientes de la deformación a $\gamma > 7\%$. La elasticidad del gel disminuye constantemente a medida que aumenta la deformación. Los nanogeles elaborados a partir de nanoemulsiones de ácido betulínico mostraron mayores valores de elasticidad G' , sin embargo en la Figura 24 se puede observar que los hidrogeles testigos mostraron una región visco elástica lineal de G' más extensa que los nanogeles, donde se puede apreciar que los HG testigos son dependientes de la deformación hasta $\gamma > 30\%$, lo que se significa que los NG tienden a ser no solo mas elásticos sino también más fuertes que los hidrogeles controles (Steffe, 1996).

En la Figura 24 también se observan los sistemas a una concentración de 0.5% de carbopol a los tres tiempos de activación evaluados, se observa que el tiempo de activación del polímero no repercute en la viscoelasticidad final de esta concentración.

Aumentar la amplitud de la deformación oscilatoria hace que los materiales fluyan, debido a que induce la rotura de la red inicial. Dos factores que contribuyen a la elasticidad de las estructuras del nanogel. Cuando se neutralizan con TEA, las partículas de microgel hinchadas forman una estructura estrechamente unida formando así una red elástica. El entrelazamiento entre los segmentos de cadena larga y las cadenas laterales de las micropartículas vecinas también ayuda a formar la estructura de red (Islam *et al.*, 2004).

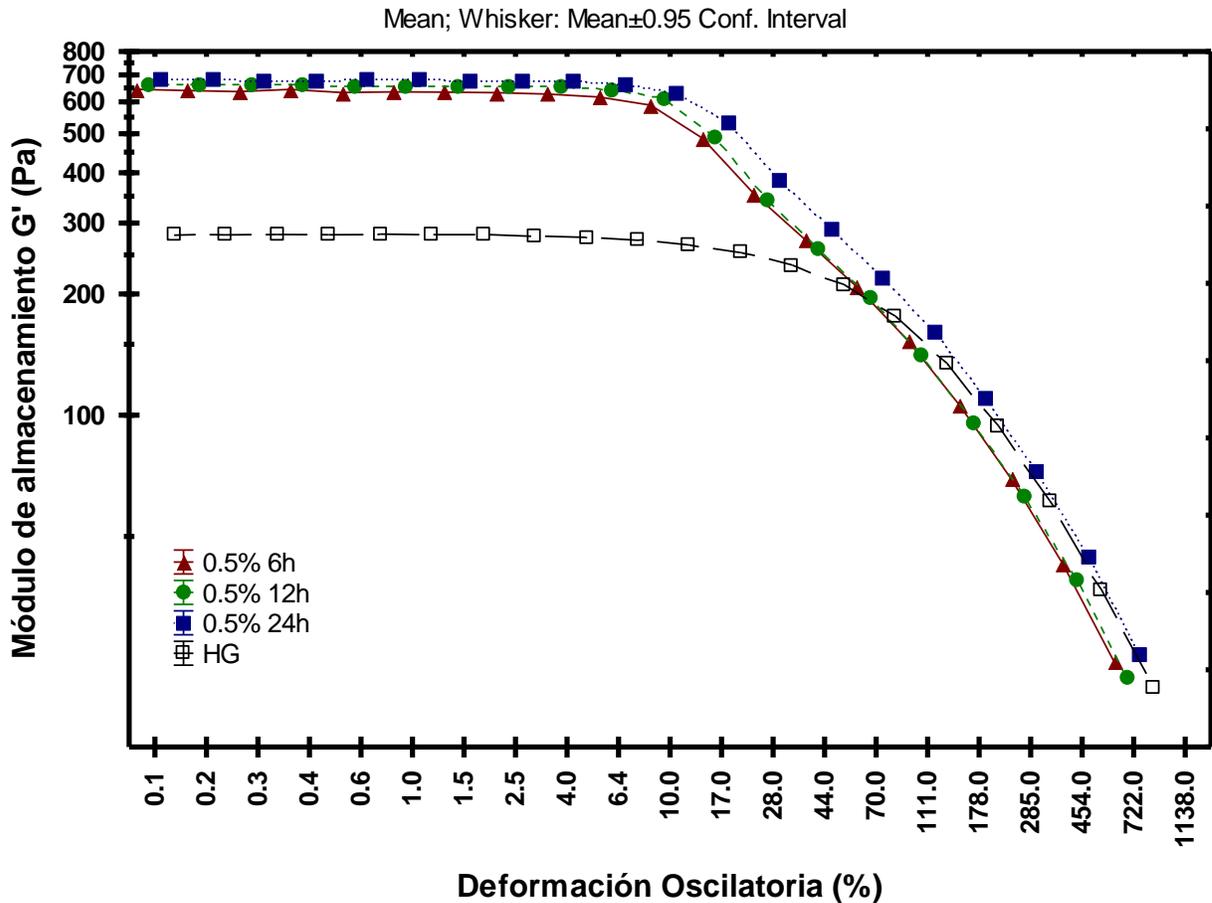


FIGURA 24. Módulo elástico de NG a concentración de 0.5% con diferentes tiempos de activación versus porcentaje de deformación.

Los valores de G' de los nanogeles fueron mayores (por mas de 300 Pa) con respecto a los HG testigos, lo cual se debe a que las NE AB con las que se desarrollaron los NG, presentaron mayor viscosidad causada por los componentes de la nanoemulsión (glicerol y fosfatidilcolina), estos generan mayores fuerzas de atracción entre las partículas dispersadas debido a interacciones polímero-disolvente favorables. En los HG testigos (donde se empleó agua como disolvente) requeriría una concentración de carbopol mucho mayor para obtener valores mayores de G' y γ , como lo reportan Islam *et al.* (2004).

En la Figura 25 se puede observar que a menor concentración de reticulante la elasticidad de los nanogeles decrece ligeramente como una función del esfuerzo de

cizalla aplicado, indicativa de un "empaquetamiento" más próximo en los microgeles con altas concentración de reticulante. Aparentemente, las esferas más pequeñas necesitan a menor esfuerzo para inducir la ruptura de éstas, como lo indica Naé y Reichert (1992). De igual forma, Todica *et al.* (2010) mencionan que un aumento de la concentración polimérica facilita la formación de las conexiones entre las cadenas y conduce al aumento de la viscosidad.

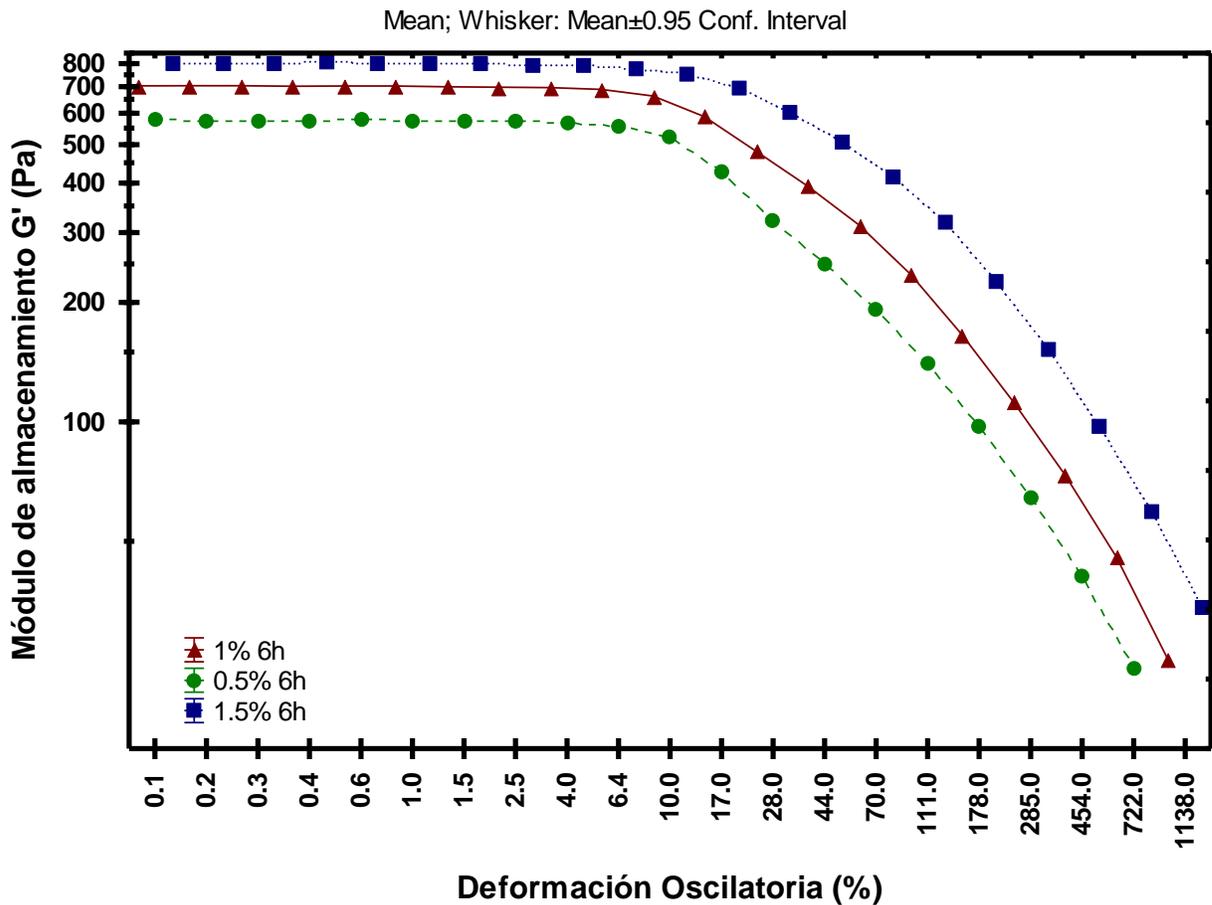


FIGURA 25. Módulo de almacenamiento de NG AB a tres concentraciones de reticulante activado a las 6 horas.

Diversos autores han citado que vehículos con mayor viscosidad reflejan coeficientes bajos de difusión haciendo más difícil atravesar las membranas de la piel. Además,

tomando como referencia a los hidrogeles testigos, se decidió emplear el tratamiento con menor cantidad de reticulante (0.5%) y optimizando el tiempo de activación (6h) debido a que en esta concentración no hubo diferencia significativa.

7.2.2. Caracterización microscópica de los nanogeles

A los nanogeles previamente liofilizados se les realizaron lavados, los cuales mostraron un efecto positivo en la resolución de las micrografías, sin afectar la estructura del sistema.

A continuación, se puede apreciar menor a mayor aumento la muestra de los NG 0.5%-6h, donde en la Figura 26a se observa la topografía de la muestra (colocada en el portamuestras tipo PIN stub), la cual muestra porosidad y algunos relieves no uniformes, en la Figura 26b se muestra a un acercamiento de 9 kx se comienza a observar una especie de agregados que conforman las redes tridimensionales, las cuales son la estructura principal que define estos sistemas; más adelante, a mayores aumentos, en la Figura 26c y 26d se logra observar más detalladamente estas redes, gracias a la capacidad del SEM de producir imágenes en 3D, se aprecia que no todas las estructuras están sobre un mismo plano. Y finalmente, en la Figura 26e es posible apreciar que estas redes que dan la estructura al gel están formadas de agregados, en su mayoría, de forma esférica, o casi esférica, los cuales se visualizaron con tamaños de diámetro por debajo de los 100 nm, corroborando con esto, que los sistemas obtenidos cumplen el rango de partícula para ser clasificado como nanogel.

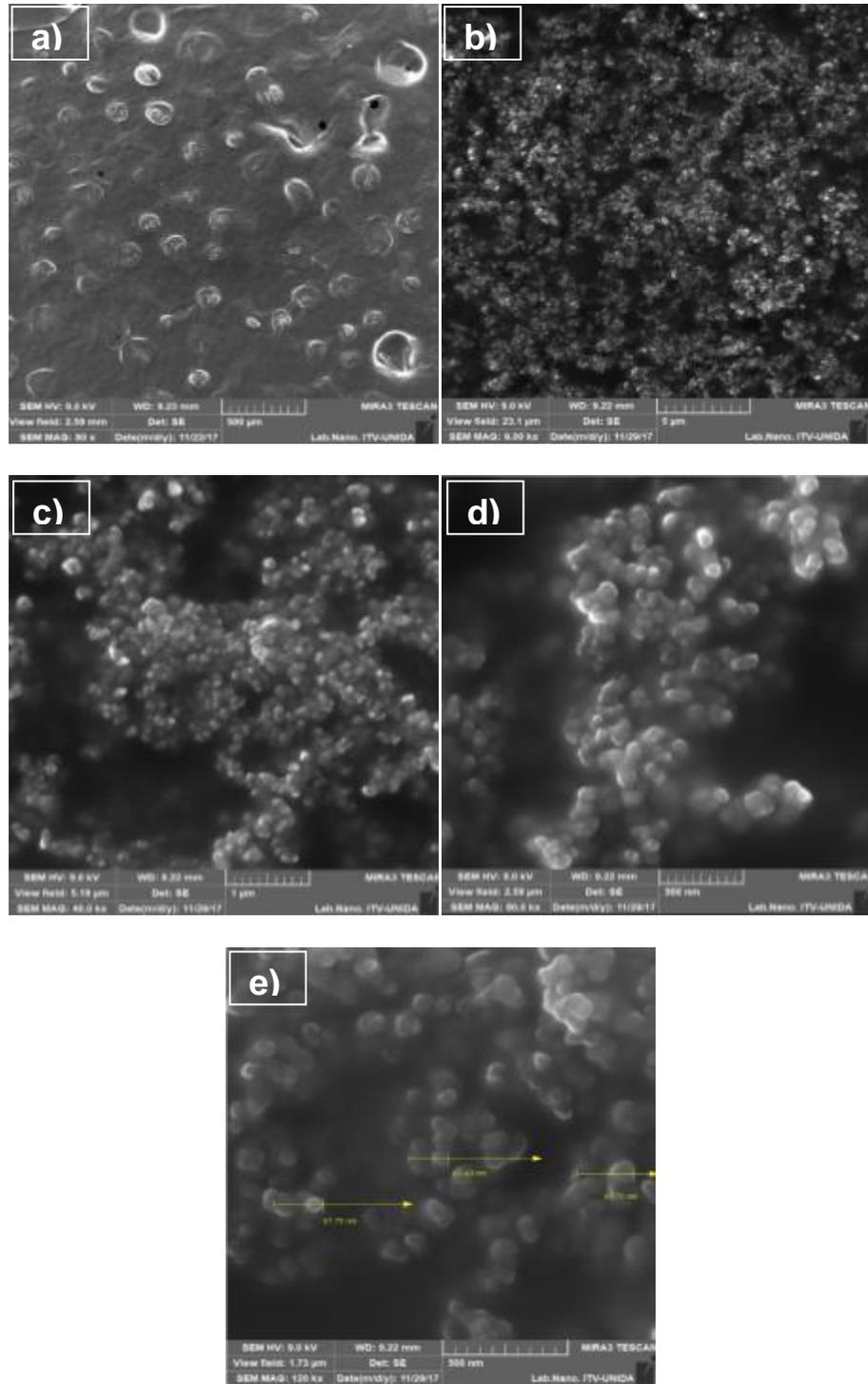


FIGURA 26. Micrografías obtenidas con SEM de NG AB de menor a mayor aumento: a) Micrografía de la topografía de la muestra a 80x, b) Micrografía a 9 kx, c) Micrografía a 40 kx de las redes poliméricas que conforman la estructura del gel, d) Micrografía a 80 kx, e) Micrografía a 120 kx de los agregados esféricos que conforman la red tridimensional.

7.3. Caracterización de organogeles acarreadores de ácido betulínico

7.3.1. Prueba de tubo invertido y determinación de la concentración crítica gelante

Se realizó la determinación de la concentración crítica gelante (CCG) de dos compuestos gelificantes de lecitina de soya [Lecitina de soya al 95% de pureza (Avanti Polar Lipids, Inc. Alabaster, AL), y lecitina con 85% de ácido esteárico (Fosfolipon 90H®)] en aceite de triglicéridos de cadena media.

En la Figura 27 se observan los organogeles elaborados usando como gelificante el fosfolipon (PC con 85% ácido esteárico) en concentraciones del 1% a 30% y se determinó en este sistema una concentración crítica gelante el 25% para el sistema aceite triglicéridos de cadena media y fosfolipon. La gelificación de estos sistemas se debe a que este gelificante tiene en su composición grandes cantidades de ácidos grasos saturados.

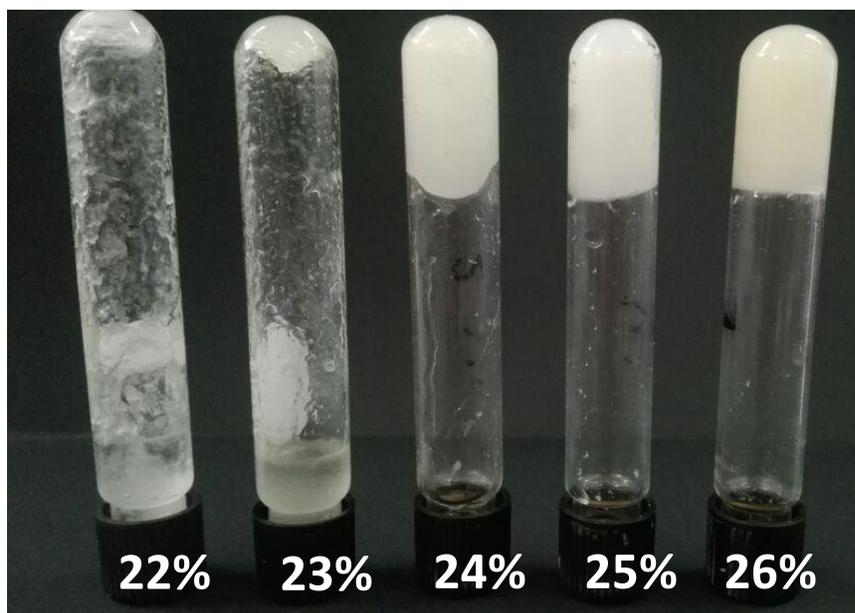


FIGURA 27. Determinación de CCG de sistemas de aceite de triglicéridos de cadena media y PC con 85% de ácido esteárico tipo comercial (fosfolipon).

Por otro lado, al emplear lecitina de soya (Avanti) en concentraciones de 40% y 30%, no se observó algún efecto de gelificación en ninguno de los sistemas (Figura 28). Esta lecitina tiene en su mayor composición (65%) ácido linoleico (C18:2), el que es un ácido graso poli-insaturado, para lecitinas con este tipo de ácidos grasos ya se han obtenido organogeles (Richards *et al.*, 2006); sin embargo, Richards y colaboradores (2006) empleaban grandes concentraciones de Pluronic F-127, el cual es un poliol tensoactivo no iónico (peso molecular de aproximadamente 12,500 daltons) que facilita la solubilización de materiales en medios fisiológicos, y utilizan agua para formar micelas inversas, las cuales al agruparse forman redes tubulares que dan soporte al líquido donde se encuentran. Y en el presente estudio no se empleó dicho poliol.

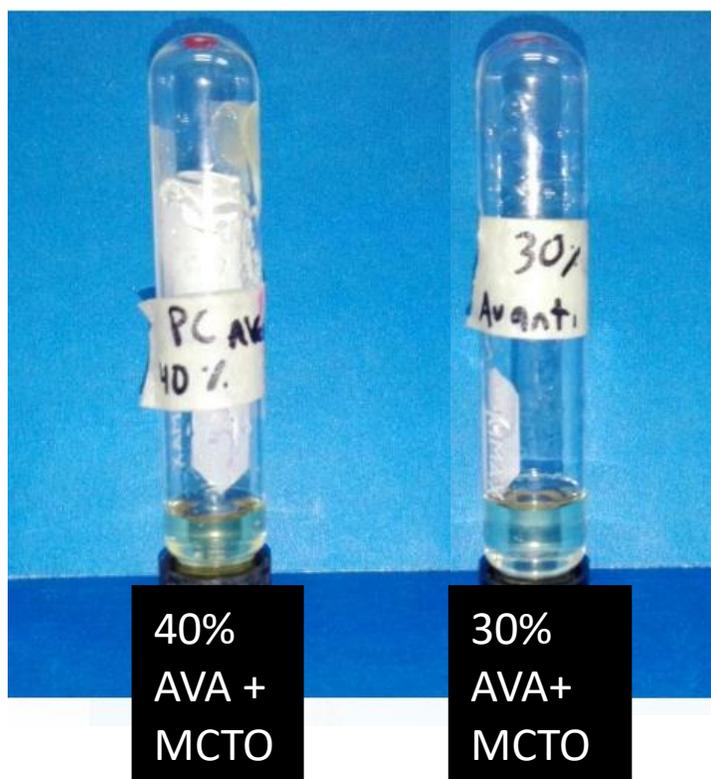


FIGURA 28. Prueba de tubo invertido para determinar la CCG de sistemas de aceite de triglicéridos de cadena media y de la lecitina Avanti (con ácidos grasos insaturados).

7.3.2. Propiedades térmicas de los OG AB

Bajo las condiciones experimentales estudiadas, los organogeles desarrollados por fosfolipon 90H[®] (FFN 90H) en aceite de triglicéridos de cadena media (ATCM) mostraron un comportamiento termorreversible. Esta propiedad es característica de los organogeles y ha sido reportada en diversos sistemas como cera de candelilla en aceite de cártamo con alto contenido de trioleína (Toro-Vazquez *et al.*, 2007), monoestearato y monopalmitato de sorbitan en aceite de canola o de oliva (Dassanayake *et al.*, 2011), monoglicérido en aceite de cártamo con alto contenido de trioleína (Toro-Vazquez *et al.*, 2013). La Figura 29 muestra los termogramas de enfriamiento y calentamiento de los tratamientos con 25%, 35%, 45% de FFN 90H, con 15 mg de AB a los cuales se sometieron a dos ciclos térmicos, aplicando una rampa de enfriamiento de 10°C/min.

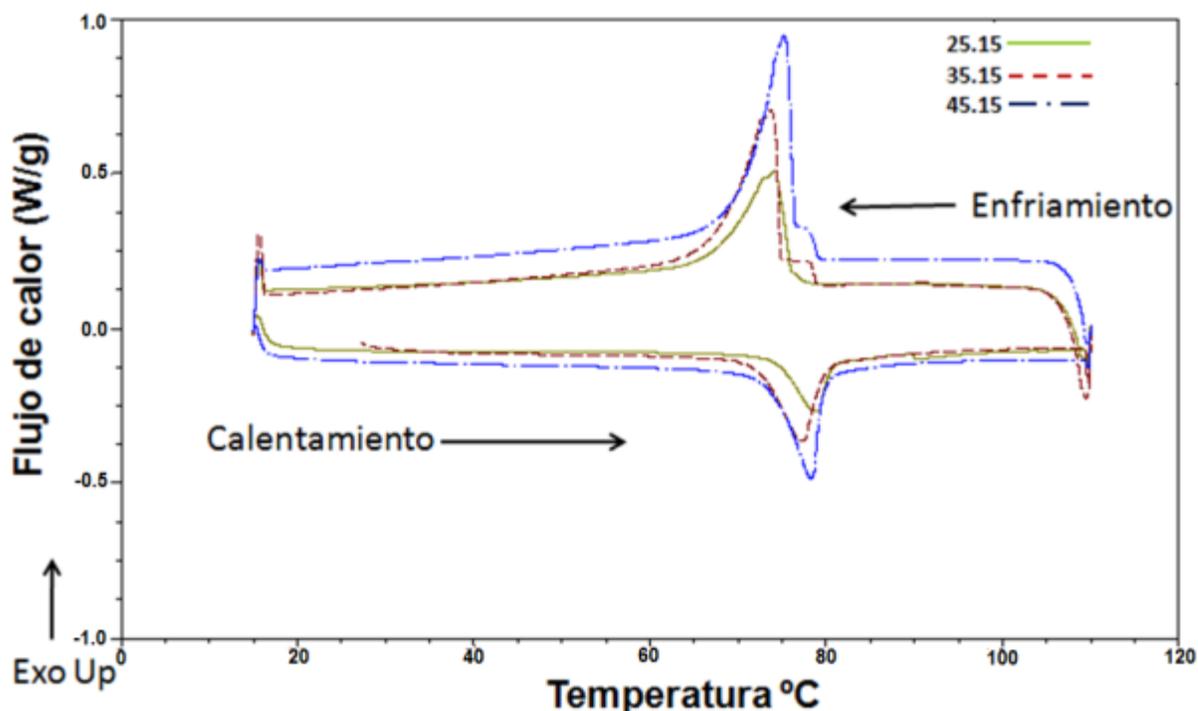


FIGURA 29. Termo-reversibilidad de las formulaciones de FFN 90H y AB en ATCM, al someterlas a dos rampas de calor.

Los termogramas de dispersiones de FLN en aceite de TCM con ácido betulínico mostraron dos picos. El pico presente por encima de la línea base del termograma de enfriamiento (Figura 30) se asoció a la gelificación del sistema al ser una reacción exotérmica y al pico endotérmico (Figura 31), con la fusión de los OG. Se determinaron las temperaturas a las cuales comenzaba la re-estructuración de los agregados moleculares que conforman las redes que le dan rigidez al sistema, la que se denominó como temperatura de gelificación (T_g), y la temperatura a la cual las moléculas comienzan a tener una entropía, temperatura de fusión (T_m). Para todas las formulaciones de los OG AB, ambas temperaturas fueron analizadas mediante un análisis de varianza (ANOVA) y la comparación de medias mediante la prueba Tukey, con un nivel de significancia del $p=0.05$ utilizando el software estadístico MINITAB v. 17 y no se encontraron diferencias significativas, a diferencia de otros autores que han obtenido que al aumentar la concentración de gelificante incrementan las temperaturas de fusión y gelificación, como es el caso de los organogeles de cera de candelilla y de cera de arroz (Dassanayake *et al.*, 2009). Sumado a esto, las Figuras 30 y 31 sugieren que los sistemas tuvieron estabilidad térmica hasta los 70°C , y a partir de ésta los sistemas comenzaron a fundirse, y posteriormente en la rampa de enfriamiento a temperaturas de 79°C , parecían tener un arreglo molecular que confería estabilidad y rigidez al sistema.

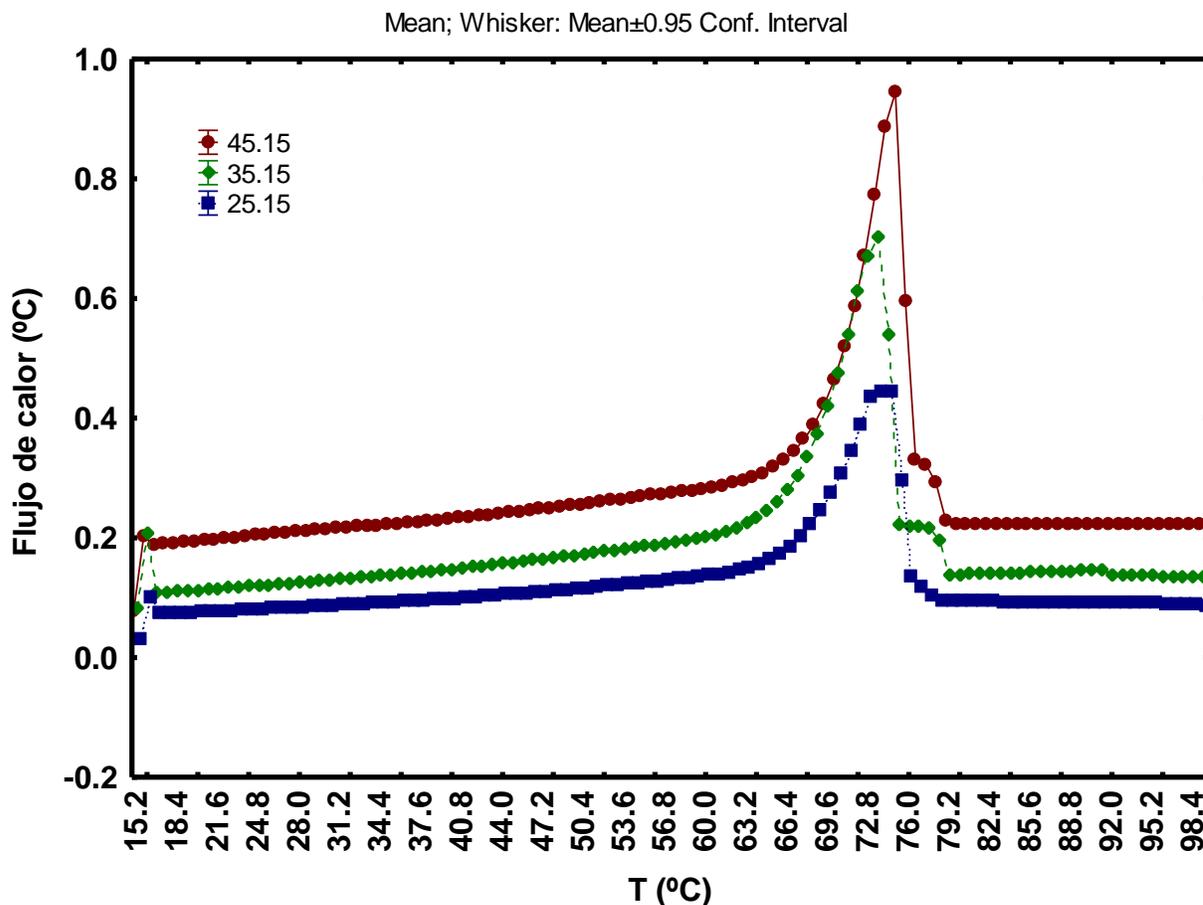


FIGURA 30. Exotermia de gelificación de los OG AB enfriando a una rampa de 10°C/min.

También se determinaron los valores de las entalpías de gelificación (ΔH_g) y entalpías de fusión (ΔH_m), que corresponden a las áreas bajo la curva de la exotermia de gelificación y la endoterma de fusión, respectivamente, los cuales fueron calculados con el software del equipo (TA-Instruments Universal Analysis 2000, v. 4.0). Los parámetros resultantes fueron evaluados mediante un análisis de varianza (ANOVA) y la comparación de medias mediante la prueba Tukey, con un nivel de significancia del $p=0.05$ utilizando el software estadístico MINITAB v. 17.

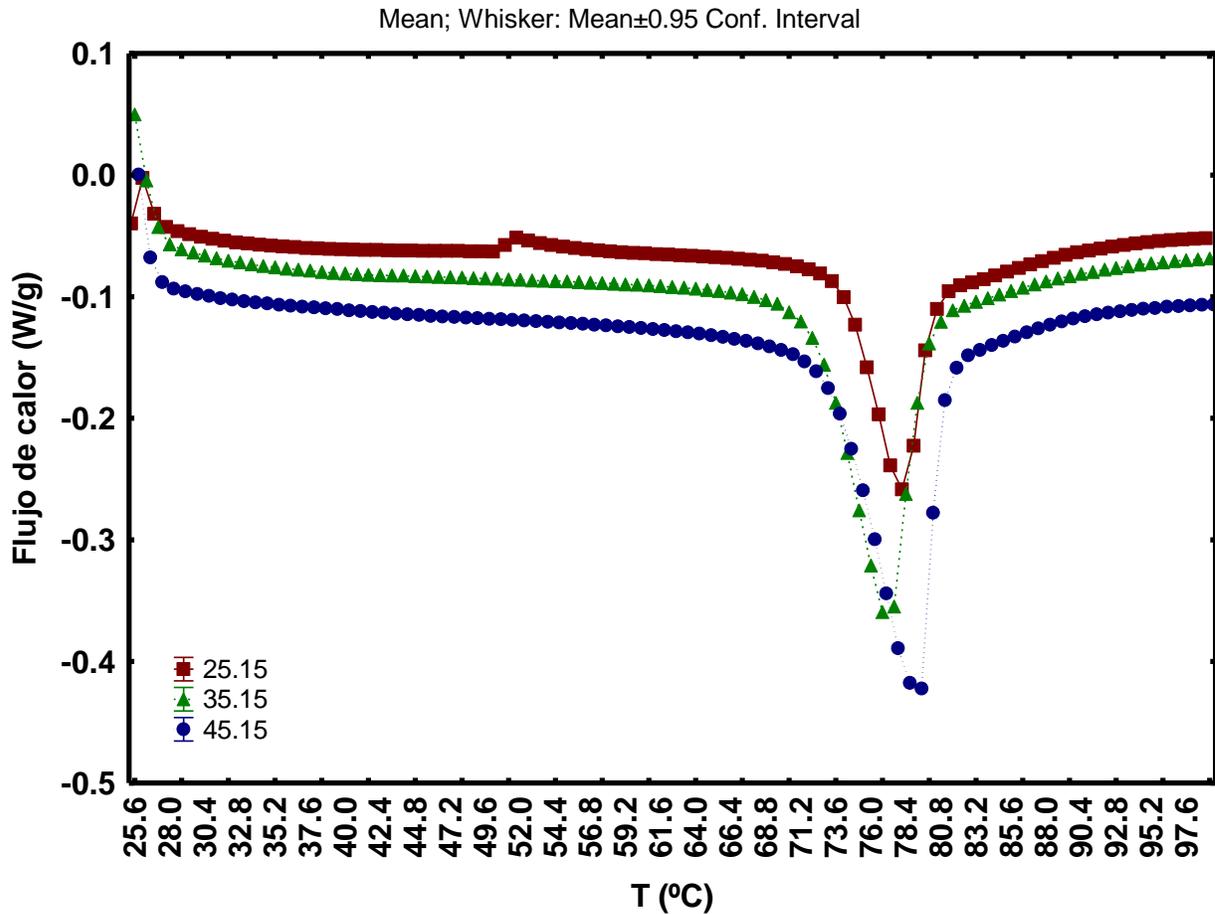


FIGURA 31. Termogramas de endotermia de fusión, calentando los sistemas de OG AB a una rampa de 5°C/min.

Los parámetros asociados a la fusión de organogeles, especialmente ΔH_m se consideraron como mediciones directamente asociadas con el orden estructural de las moléculas de gelante dentro de las unidades de ensamblaje que forman el organogel (Toro-Vazquez *et al.*, 2007). Dentro de este marco los valores de ΔH_m , bajo la prueba de Tukey (Fig. 32b) mostraron una dependencia significativa únicamente de la concentración del gelificante, donde se observa que a mayor concentración de FFN 90H[®], mayor es la cantidad de calor necesario para fundir el gel. Esto indica que los sistemas con 45% de gelificante tuvieron mayor estabilidad con respecto a las otras concentraciones evaluadas, y al ser suministrados en la piel es necesaria mayor energía para poder permitir que el sistema difunda a través de las membranas de la

piel. En el gráfico de interacciones (Figura 32a) se puede apreciar de manera más evidente que el AB no reflejó un efecto significativo en las formulaciones de los organogeles; esto puede deberse a que las cantidades que se agregaron son muy bajas comparadas a las del FFN 90H®.

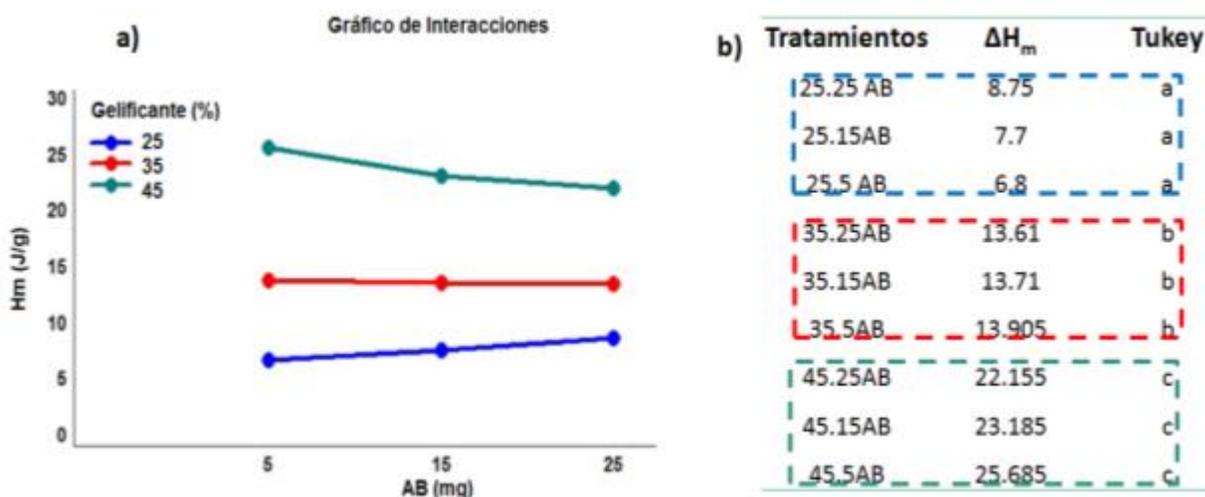


FIGURA 32. Entalpías de fusión de los OG AB: a) Gráfico de interacciones AB-Gelante b) Prueba de Tukey.

De igual forma que en las entalpías de fusión, para las entalpías de gelificación sólo la concentración de gelificante tuvo efecto sobre este parámetro y se encontró que a mayores concentraciones de FFN 90H® durante la rampa de enfriamiento el sistema libera energía y debido a esto sufre una re-estructuración molecular que da a lugar a la formación de las redes que conforman y dan rigidez al organogel. En la Figura 33a se observa que a mayor concentración de gelificante, mayor es la energía exotérmica implicada en la formación del gel, y de igual forma en el gráfico de interacciones (Figura 33b) se comprueba, al igual que en la endotermia de fusión, que el ácido betulínico no tiene efecto en los picos endotérmicos y exotérmicos que se obtienen al someter a dos rampas de calor los sistemas.

Esta dependencia de la entalpía al variar las concentraciones de gelificantes concuerda con algunos autores (Co y Marangoni, 2012; Toro-Vazquez, 2013).

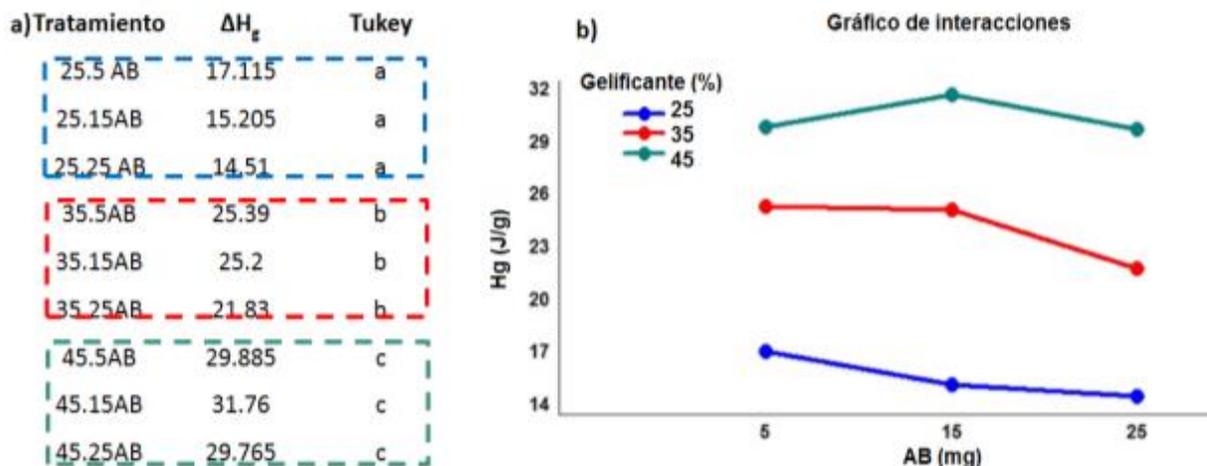


FIGURA 33. Entalpías de gelificación de los OG AB a) Prueba de Tukey b) Gráfico de interacciones.

7.3.3. Caracterización reológica de los OG AB

Los barridos de deformación obtenidos para las formulaciones de FFN 90H a concentraciones de 25% y 35%, AB en ATCM mostraron que el modulo de almacenamiento, cuando se mantuvo en la región lineal viscoelástica, fue siempre mayor, al menos en un orden de magnitud que el módulo de pérdida, evidenciando que tienen comportamientos más elásticos que viscosos, una propiedad particular de los geles (Menger y Caran, 2000). Como representación a lo anteriormente citado se observa la Figura 34.

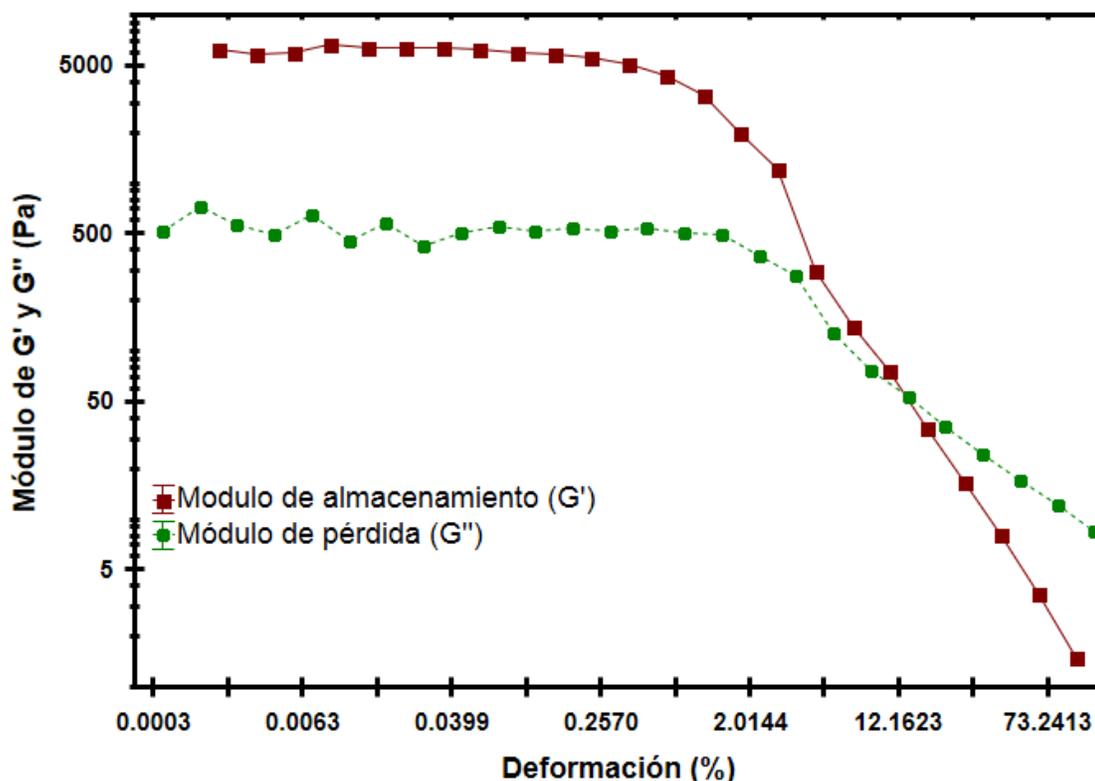


FIGURA 34. Reograma del barrido de deformación de la formulación 25% FFN 90H[®] y 15mg de AB en ATCM.

En la Tabla 10 se muestra un parámetro que determina la viscoelasticidad de los sistemas evaluados, el módulo de almacenamiento o elasticidad (G'). Estos valores fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) y la comparación de medias mediante la prueba Tukey, con un nivel de significancia del $p=0.05$. Para realizar la prueba de Tukey previamente se normalizaron los valores obtenidos de G' , los cuales se transformaron con el logaritmo natural. Los valores de $\log(G')$ Pa a concentraciones de 35% de FFN 90H, muestran similitud a los obtenidos por Alvarez-Mitre *et al.*, (2012), quien utilizó concentraciones de 3% de cera de candelilla en aceite de cártamo, obteniendo valores incluso más altos de $\log(G')$ Pa donde evaluó las condiciones de cizalla durante el proceso de gelificación, velocidad de cizalla y tiempo de almacenamiento. De dicha prueba se obtuvo que todas las formulaciones sometidas al barrido de deformación indicaron diferencias significativas entre sí,

informando que tanto la concentración de gelificante como AB tuvieron un efecto en la elasticidad de los sistemas.

TABLA 10. Prueba de Tukey para G' y $\log(G')$ para todas las formulaciones de OG AB.

TRATAMIENTO	G' (Pa)	LOG (G')	Tukey
35.25AB	69,177	4.8352	a
35.15AB	50,485	4.694	b
35.50AB	35,852	4.5382	c
25.25AB	14,170	4.1495	d
25.15AB	7,538	3.8715	e
25.50AB	5,316	3.7244	f

Lo anteriormente señalado se puede evidenciar en la Figura 35 en el gráfico de interacciones, donde se puede apreciar que la concentración de AB tuvo un efecto en la elasticidad de los OG AB, evidenciando que a mayor concentración de AB, se incrementan los módulos de elasticidad, pero dicho efecto fue más notorio a la concentración de 35% de FFN 90H[®]. Esto sugiere que el AB puede fungir como gelificante empleando ATCM. Cabe destacar que este triterpeno pentacíclico ha sido estudiado en 22 solventes orgánicos y se determinó que tiene poder de formar agregados estructurales que dan lugar a la gelificación (Gopal y Shankar, 2011). Sin embargo, el mayor efecto observado fue al incrementar la concentración de gelificante, ya que los sistemas aumentaban G' al menos en un ciclo logarítmico

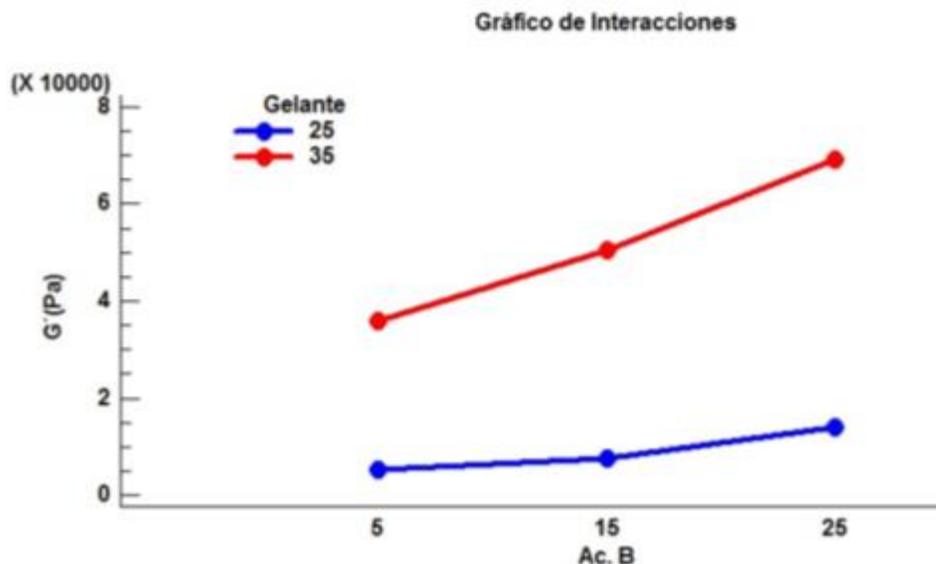


FIGURA 35. Gráfico de interacciones del efecto de G' a diferentes concentraciones de FFN 90H[®] y AB

7.4. Evaluación de la actividad antiinflamatoria *in vivo*

El TPA (encontrado en el aceite de crotón (*Croton tiglium L.*) posee propiedades irritantes, pro-inflamatorias y promotoras de tumores. La aplicación del TPA desencadena todos los eventos propios del proceso inflamatorio: vasodilatación y eritema, extravasación y edema (Young *et al.*, 1989). En la Tabla 11 se puede observar que el grupo tratado únicamente con TPA mostró la media más alta de pesos en mg, mientras que los grupos que presentaron las medias más bajas fueron el grupo sano y el grupo tratado con el fármaco de referencia, lo que antecede permite deducir que la inflamación crónica fue inducida de manera eficaz.

TABLA 11. Prueba de Tukey para media de los pesos (mg) de las orejas evaluadas.

Grupo	Edema (mg)	
Sano	9.9 ±	0.709 ^a
Fármaco de Referencia	11.22 ±	1.429 ^a
Nanogel de ácido betulínico	14.24 ±	1.643 ^b
Organogel de ácido betulínico	15.09 ±	1.668 ^{b,c}
Hidrogel de ácido betulínico	16.33 ±	0.702 ^{c,d}
Ácido betulínico libre	17.2±	1.339 ^{d,e}
TPA	18.92 ±	2.073 ^e

Estos resultados confirman el efecto del edema inducido al elevar a casi el doble de peso del grupo sano, debido a la hiperplasia, extravasación y engrosamiento epidérmico causados en el tejido, tal como se observa en la Figura 36b, donde se muestra el grupo testigo TPA con las características citadas previamente, así como un efecto notorio de eritema y zonas de la epidermis ligeramente ulcerada. Esto es inversamente a lo observado en el testigo sano que no evidenció ninguna de las reacciones citadas y tuvo un color blanco grisáceo de consistencia ahulada (Figura 36a).

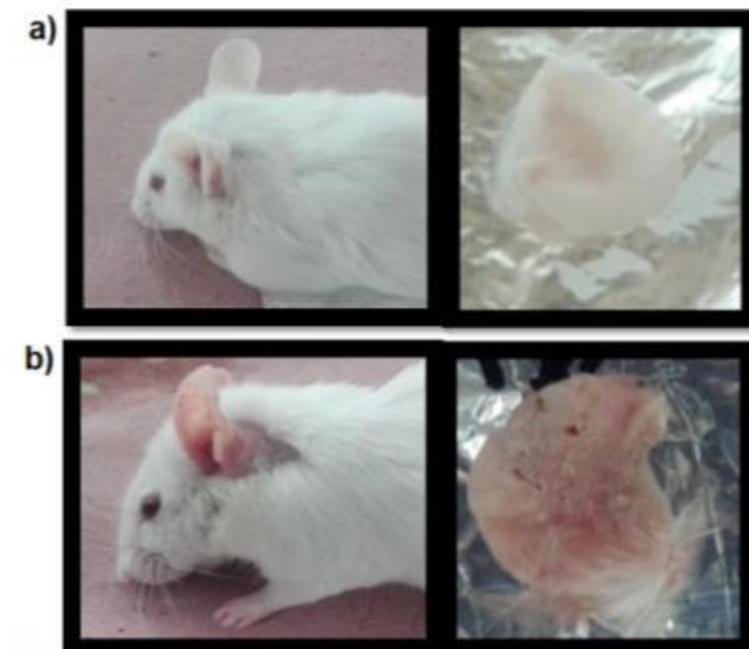


FIGURA 36. Representación de los grupos testigos: a) Grupo sano b) Grupo con inflamación crónica

Los resultados obtenidos del porcentaje de inhibición (Figura 37) del edema en diversos vehículos acarreadores de ácido betulínico muestran que el grupo tratado con el fármaco de referencia (diclofenaco) no mostró diferencia significativa con el grupo sano, y que fue el vehículo que mejor respuesta anti-inflamatoria denotó. Sin embargo, es importante mencionar que al emplear este sistema provocó la muerte del 30% de la población a evaluar. Existen diversos ensayos clínicos y estudios observacionales que vienen cuestionado el riesgo cardiovascular asociado al uso de los AINEs (anti-inflamatorios no esteroideos), como el diclofenaco. Estudios por Batlouni (2009) y Mcgettigan y Henry (2006) demostraron que el diclofenaco es altamente selectivo a la COX-2, inhibiéndola hasta en un 94% y que por lo tanto aumenta el riesgo de eventos cardiovasculares trombóticos. En otro estudio desarrollado por Ferrán (2014), que tuvo como objetivo analizar la evidencia disponible sobre el riesgo cardiovascular asociado al uso de AINEs concluyó que el diclofenaco (después del ibuprofeno), se asoció con mayor riesgo relativo (RR) de accidente cerebrovascular (RR=2.86; IC95%: 1.09-8.36)

y junto con etoricoxib se asoció con mayor riesgo de muerte cardiovascular para esta investigación (RR=3,98; IC95%: 1,48-12,7).

En la Figura 37 se observa que a pesar de que los sistemas evaluados en esta investigación (nanogeles y organogeles) no mostraron diferencias significativas entre sí, los nanogeles mostraron un 52% de inhibición contra 42% de los organogeles. Esto se atribuye a tres factores principales: la encapsulación en tamaños nanométricos del AB, al trabajar con sistemas de menores magnitudes (micro y nanogeles) ofrecen diferentes ventajas en los sistemas de liberación sobre sistemas macroscópicos, ya que favorecen las propiedades de encapsulación a nivel subcelular y son ajustables a diferentes áreas superficiales. Los microgeles son mecánicamente flexibles, lo cual favorece la modulación de la absorción celular y la biodistribución (Espinosa y García, 2017; Yadav *et al.*, 2017), las propiedades humectantes de los componentes del sistema y finalmente al pH el cual es más cercano al de la piel.

También el diclofenaco administrado vía tópica se ha descrito como uno de los compuestos más frecuentemente implicados en enfermedad hepática secundaria a medicamentos en las últimas décadas, junto con la isoniazida y la amoxicilina-ácido clavulánico (Tejada, 2010). Un ensayo clínico con tres períodos de tratamiento (gel de diclofenaco sódico tópico 16 g/día (una rodilla sí y la otra no), 48 g/día (las dos rodillas y las dos manos), diclofenaco oral 150 mg/día), en 40 pacientes sanos, con 14 días de lavado entre cada tratamiento, puso de manifiesto que las concentraciones máximas en plasma del diclofenaco eran entre 40 y 150 veces superiores con diclofenaco oral. Este estudio, de alguna forma cuestiona la antigua teoría de que la eficacia de los AINEs tópicos se produce en la medida en que se absorben y pasan al torrente sanguíneo para su actuación sistémica (Kienzler *et al.*, 2010).

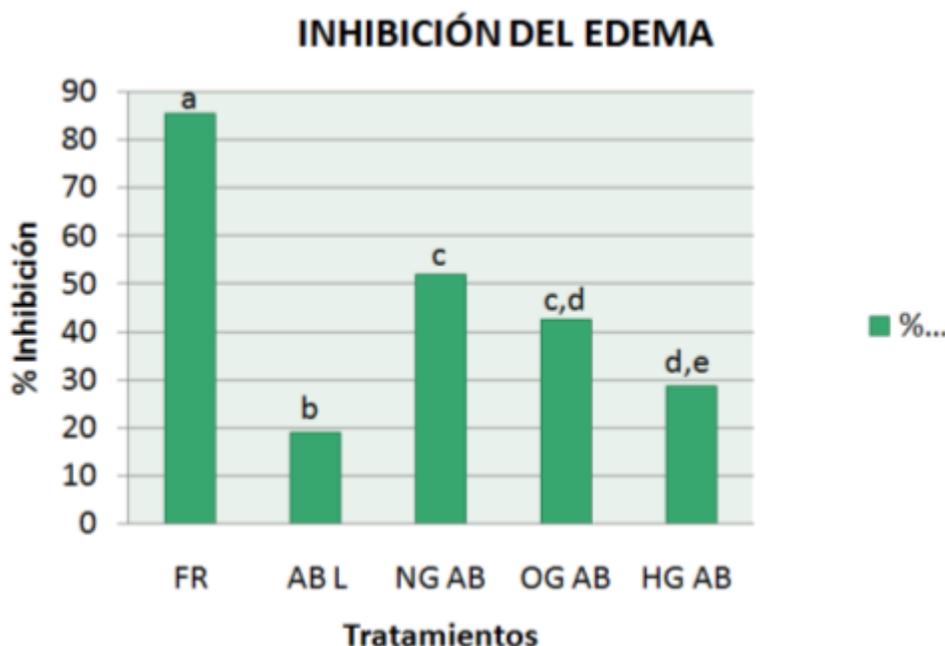


FIGURA 37. Porcentaje de inhibición del edema

Donde:

- FR: Fárrmaco de referencia
- AB L: Ácido betulínico libre
- NG AB: Nanogel acarreador de ácido betulínico
- OG AB: Organogel acarreador de ácido betulínico
- HG AB: Hidrogel acarreador de ácido betulínico

Los nanogeles presentan varias ventajas sobre los hidrogeles. Dado el tamaño nanométrico, los nanogeles tienen potencial en zonas donde los hidrogeles no lo poseen (Escalona y Quintanar, 2014). Se puede comprobar en la figura anterior que los NG AB contra el gel convencional de carbopol 940®(HG AB) y el AB libre si mostraron diferencia significativa demostrando, y también que los NG ABy los OG AB fueron los mejores vehículos para inhibir el edema y las razones coinciden con las mencionadas anteriormente, y que a pesar de no mostrar valores tan altos de inhibición como el gel comercial, mostró ser seguro en el modelo estudiado y reflejaron mas del doble de inhibición que el compuesto libre.

7.5. Histología

Las muestras de las orejas de ratón fueron analizadas luego de las dos semanas de tratamiento en los siete grupos mencionados anteriormente en la sección de metodología. En la Figura 38 se muestra un corte histológico del tejido de oreja de ratón del grupo sano donde se puede apreciar las diferentes capas de la piel y demás componentes celulares del tejido con una estructura celular adecuada, mostrando epidermis, dermis, folículos, cartílago, musculo estriado, sin alteraciones histológicas. Contrario al grupo de ratones enfermos tratados con el inductor de inflamación, el TPA, desarrollaron inflamación crónica severa como se puede observar en la Figura 39, donde se evidencia discontinuidad en la epidermis (o sea, úlcera), denso infiltrado inflamatorio, e inclusive existe evidencia de quemaduras, lo cual se relacionó con el agente inductor de inflamación. Con esto se clasificó como el grupo con más daño tisular, tal como era esperado. De manera similar al grupo TPA, el grupo tratado con el ácido betulínico libre (Figura 40) evidenció denso infiltrado inflamatorio y aún mostró úlceras en la piel, aunque en áreas más pequeñas que el grupo anteriormente descrito. En el caso de los hidrogeles convencionales (Figura 41) se pudo comprobar que las capas de la piel se mostraron uniformes sin discontinuidad; sin embargo, mostraban absceso con destrucción en la unidad pilo-sebácea y denso infiltrado inflamatorio en áreas amplias del tejido.

Los ratones tratados con los organogeles (Figura 42) y nanogeles (Figura 43) acarreadores de ácido betulínico, evidenciaron que el epitelio de las capas que conforman la piel tenía una arquitectura normal, con una morfología regular, compuesta por epidermis y dermis. Se observa estructura de la epidermis homogénea, sin mostrar discontinuidad, similar al tejido del grupo testigo sano y al tratado con el fármaco de referencia (Figura 44). Sin embargo, en los grupos NG AB y OG AB, comenzaron a hacerse presentes pequeños focos de infiltrado inflamatorio, aunque en menor densidad que el grupo tratado con el inductor de inflamación. Cabe resaltar en estos tratamientos (NG AB y OG AB), al igual que el grupo sano y el tratado con el fármaco de referencia no mostraron daños severos como discontinuidad en epidermis

o abscesos en alguna estructura celular como fue el caso de los hidrogeles convencionales y el ácido betulínico libre.

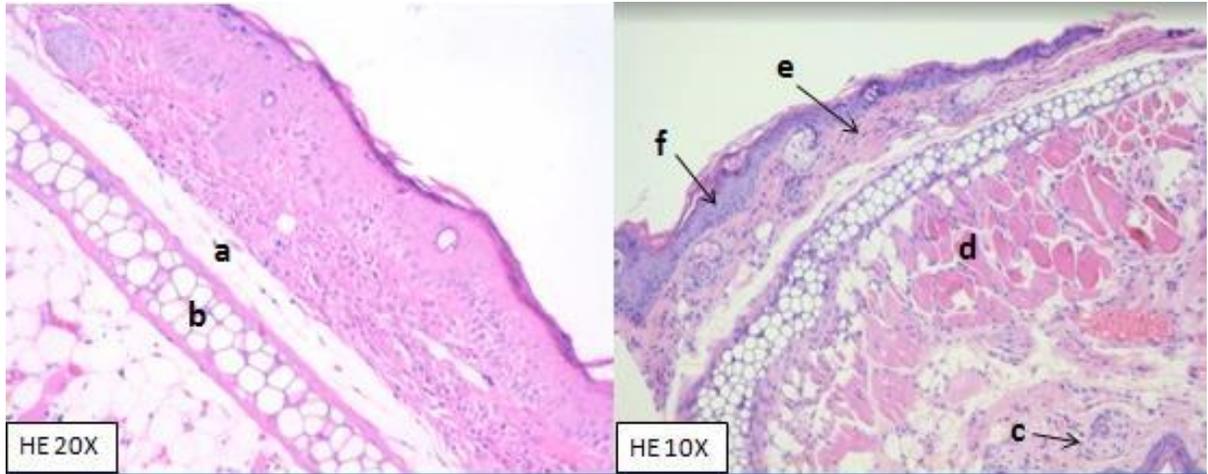


FIGURA 38. Análisis histológico de oreja de ratón del testigo sano teñido con HE en 20x y 10x, visto en un microscopio Olympus BX51. a) Tejido laxo, b) Cartílago elástico, c) Folículo piloso, d) Músculo estriado, e) Dermis y f) Epidermis. Obsérvese que el epitelio se muestra una morfología regular al igual que las demás estructuras celulares que conforman el tejido auricular.

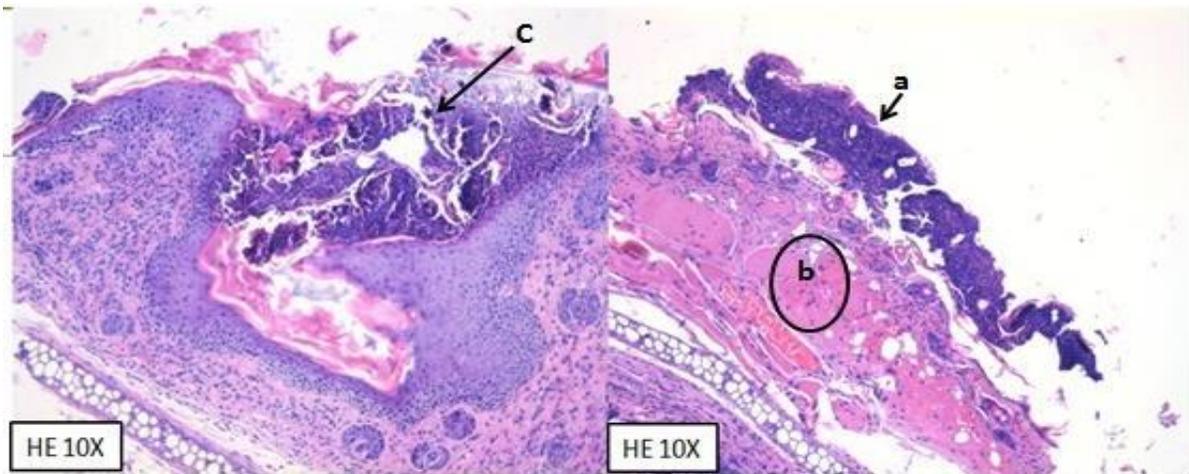


FIGURA 39. Análisis histológico de oreja de ratón del grupo al que únicamente se le aplicó el inductor de inflamación (TPA) con HE en 10x, respectivamente visto en un microscopio Olympus BX51. c) Pérdida en la continuidad de la epidermis (úlceras), así como denso infiltrado inflamatorio rodeando a ésta, a) efecto de quemadura química de los tejidos, b) Coagulación del colágeno y en la luz de los vasos sanguíneos. Se observa cambios reactivos en dermis y capa muscular.

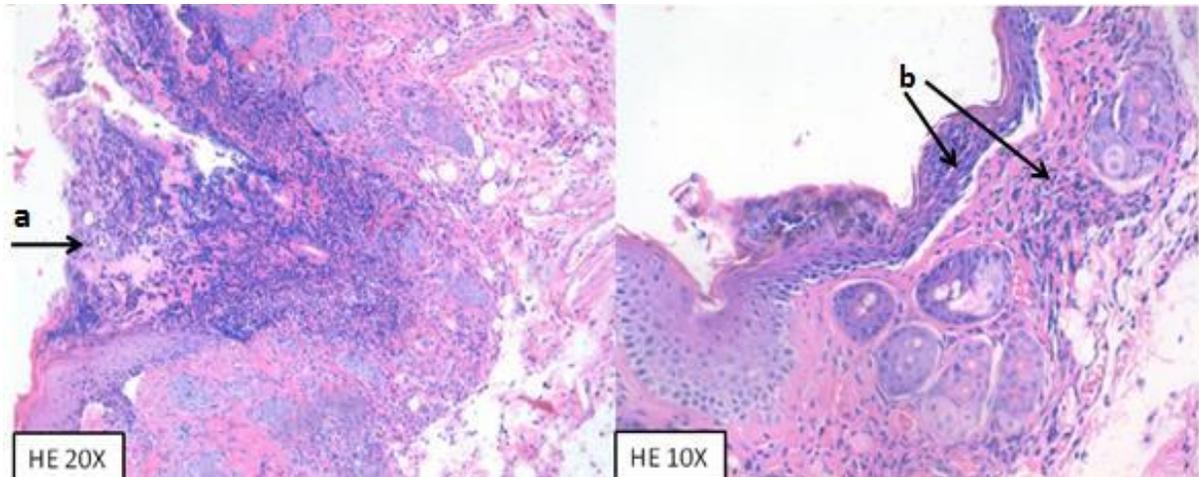


FIGURA 40. Análisis histológico de oreja de ratón del grupo tratado con ácido betulínico libre con HE en 20x y 10x, visto en microscopio Olympus BX5. a) Pérdida en la continuidad de la epidermis con tejido de granulación y abundante polimorfo nuclear. b) Infiltrado inflamatorio constituido por polimorfos nucleares.

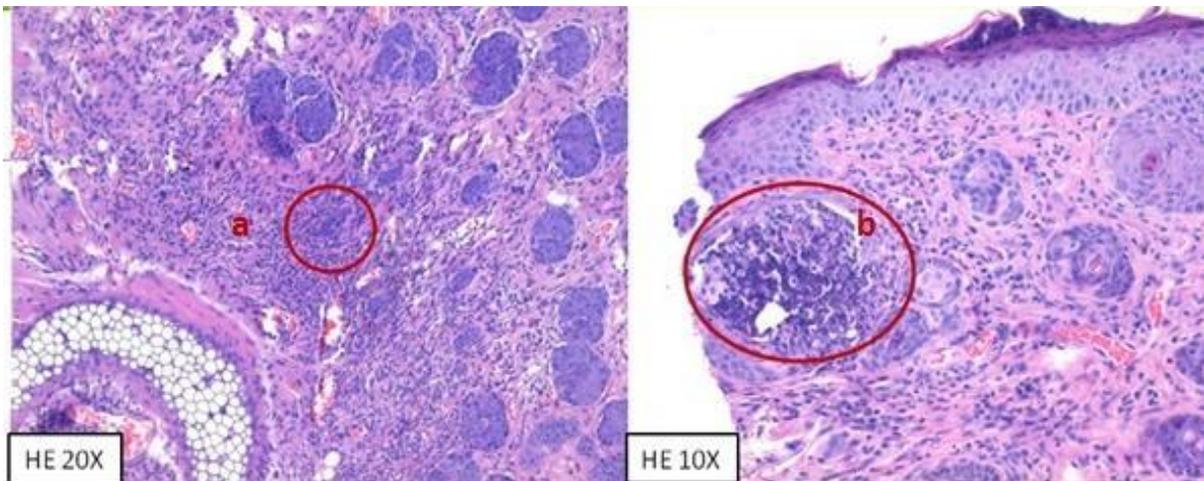


FIGURA 41. Análisis histológico de oreja de ratón del grupo tratado con hidrogeles de ácido betulínico teñido con HE en 20x y 10x, visto en microscopio Olympus BX51. a) Denso infiltrado inflamatorio agudo en los tejidos blandos (tejido adiposo y músculo estriado), b) Absceso con destrucción de la unidad pilo-sebácea.

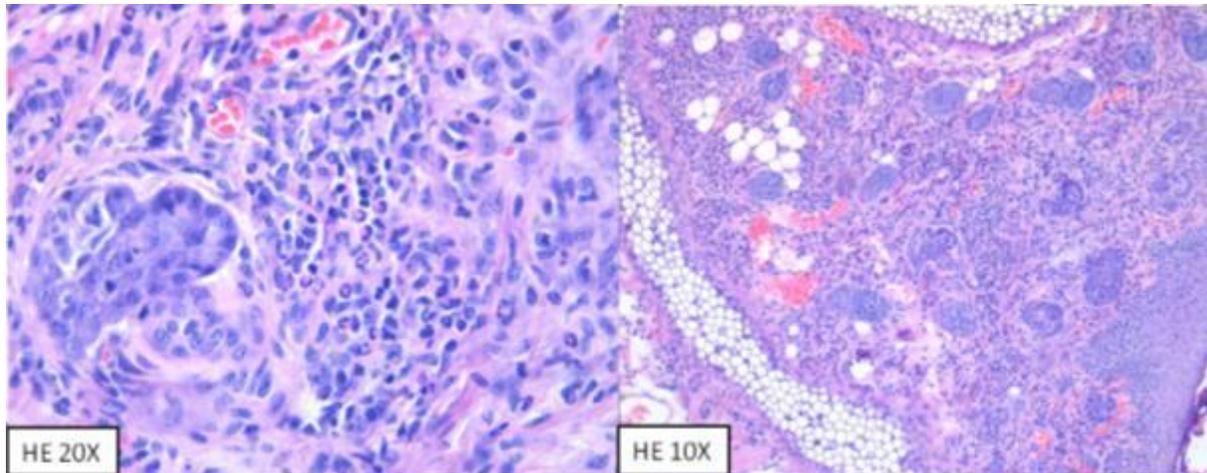


FIGURA 42. Análisis histológico de oreja de ratón teñido con HE en 20x y 10x, del grupo tratado con organogeles de ácido betulínico visto en microscopio Olympus BX51. Detalle del infiltrado inflamatorio constituido por neutrófilos, linfocitos y macrófagos; observe el denso infiltrado agudo crónico en el estroma sub epitelial.

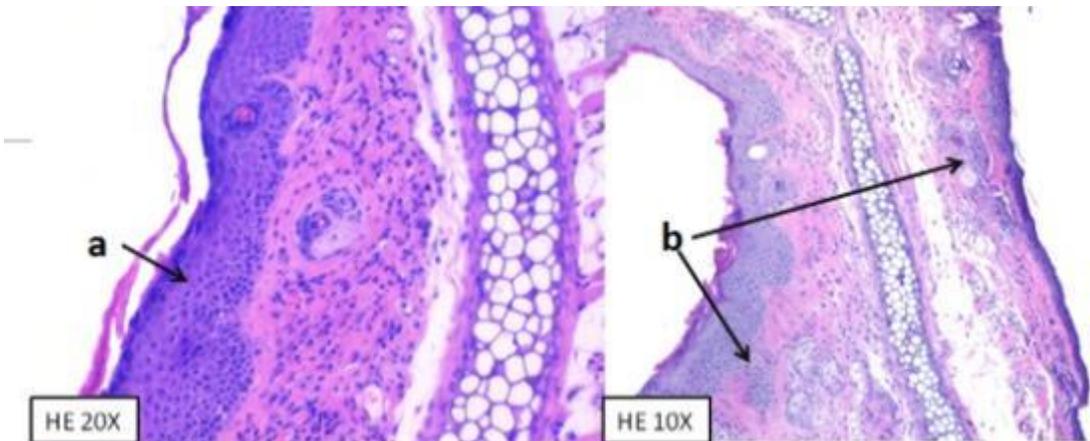


FIGURA 43. Análisis histológico de oreja de ratón teñido con HE en 20x y 10x, del grupo tratado con nanogeles acarreadores de ácido betulínico visto en microscopio Olympus BX51. a) Infiltrado inflamatorio moderado en focos b) ligero infiltrado tipo agudo localizado en la dermis. Nótese que no existen daños en ninguna capa del epitelio, la cual se presenta con una estructura celular adecuada.

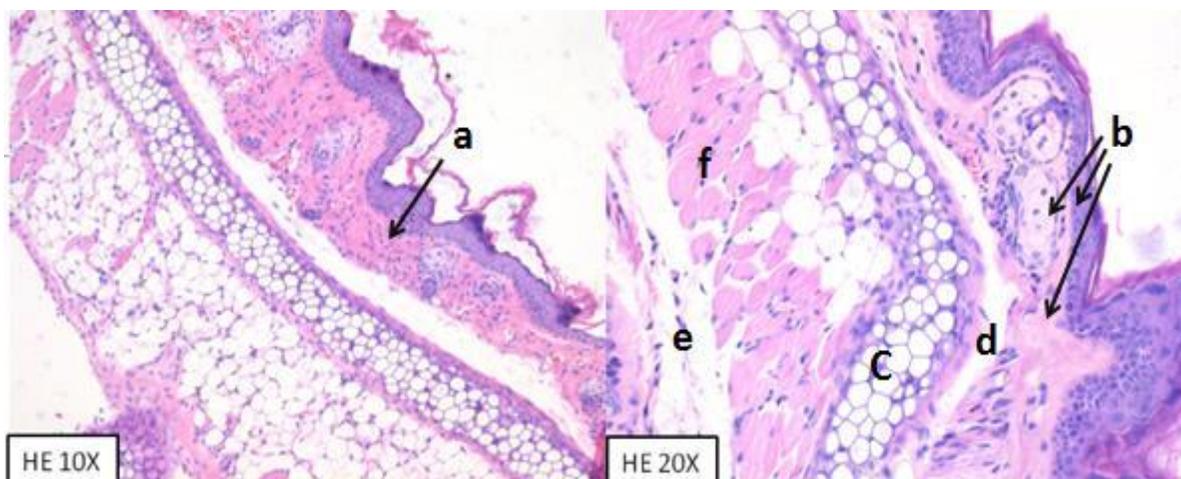


FIGURA 44. Análisis histológico de oreja de ratón del grupo tratado con el fármaco de referencia teñido con HE en 10x y 20x, respectivamente visto en microscopio Olympus BX51. Ligeró infiltrado inflamatorio, se observa: a) dermis y b) epidermis con anexos, c) cartílago, d) estroma laxo, e) escaso tejido adiposo, f) capa de musculo estriado.

Se aprecia, por lo tanto, que la actividad antiinflamatoria del nanogel acarreador de ácido betulínico es mayor que el ácido betulínico libre, activando diversos mecanismos ya documentados que involucran la activación de mediadores antiinflamatorios.

Los efectos farmacológicos del ácido betulínico han sido revisados, incluyendo sus propiedades antiinflamatorias (Yogeeswari y Sriram, 2005). Este triterpeno ha demostrado, en diversos estudios previos su capacidad para inhibir significativamente los edemas agudos inducidos por carragenina y serotonina en pata de ratón, y por propiolato de etilfenilo (EPP) y TPA en oreja de ratón, además, el efecto antiinflamatorio es modificado por la presencia de cicloheximida y actinomicina D, pero no por progesterona, lo que indica un mecanismo de acción en el cual la síntesis de proteínas está implicada, pero no el receptor glucocorticoide (Recio *et al.*, 1994). El ácido betulínico tampoco posee efecto sobre la inflamación subcrónica inducida tras administraciones repetidas de TPA en oreja de ratón, aunque si modificó la infiltración leucocitaria (Máñez *et al.*, 1997). Estos resultados indican que el ácido betulínico es efectivo en los procesos inflamatorios en los cuales está implicada la enzima PKC, y la producción de radicales libres, pero no aquellos que implican inflamación neurogénica ni metabolismo del ácido araquidónico por la vía lipoxigenasa (Huguet *et*

al., 2000. Sin embargo, un estudio realizado por Tseng y Liu (2005) demostraron que el ácido betulínico es capaz de interaccionar con diversas PLA₂, como la de páncreas de bovino o veneno de *Naja nigrocollis*, lo que implica directamente a este triterpeno con el metabolismo del ácido araquidónico, si bien lo hace a nivel de su liberación mediada por la enzima PLA₂, pero no por el metabolismo LOX (Yueqin, 2007).

Ciurlea *et al.* (2010) realizaron un estudio donde evaluaron el efecto de aplicaciones tópicas (ungüento) y sistémicas (nanoemulsiones) de ácido betulínico sobre la actividad del ácido betulínico contra cáncer de piel. La conclusión principal es que es efectiva tanto en nevos experimentales tópicos como en melanoma metastásico en etapas tempranas. Se realizaron pruebas al inicio y durante la inducción del melanoma y se observó, midiendo eritema y melanina (los cuales a niveles altos están relacionados con la inflamación), que el AB mostraba niveles más bajos de estos parámetros en los estadios iniciales de esta patología (Ciurlea *et al.*, 2010).

8. CONCLUSIONES

- En todas las formulaciones de NG AB se obtuvo que G' fue mayor en un orden de magnitud que G'' , comprobando que los sistemas tienen mayor elasticidad que viscosidad (propiedad característica de los geles), demostraron que a mayor concentración de reticulante (carbopol 940) se obtuvo una mayor elasticidad y que el tiempo de activación del reticulante incrementó valores de G' .
- En los NG AB, se lograron apreciar estructuras nanométricas en forma de esferas y agregados.
- Los hidrogeles mostraron una RLV más extensa en comparación con los nanogeles, evidenciando que son dependientes de la deformación hasta un 28% de deformación (mientras los NG hasta 7%), lo que se significa que los NG tienden a ser no solo más elásticos, sino que también son considerados como geles débiles comparados con los hidrogeles (efecto de la PC y glicerol).
- Reológicamente los OG AB demostraron que al aumentar la concentración del gelificante incrementaba la elasticidad de los sistemas.
- Calorimétricamente se sugiere que el ácido betulínico puede actuar como gelificante en la fase oleosa empleada y que para todas las formulaciones de los OG AB, mostraron estabilidad térmica hasta 70°C, y, además, se confirmó en todos los sistemas de organogeles propiedad de termo reversibilidad.
- Los nanogeles y los organogeles de ácido betulínico inhiben el edema (52 y 42%, respectivamente), sin mostrar efectos adversos, como el fármaco de referencia (30% de defunciones).
- Histológicamente, los grupos de los vehículos evaluados (organogeles y nanogeles) no mostraron daños graves (infiltrado inflamatorio severo, úlceas,

quemaduras) causados por el TPA, a diferencia del grupo al que se le aplicó el AB libre y del grupo tratado únicamente con TPA los cuales mostraron histológicamente todos los daños mencionados previamente.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo Estupiñan, M. V. P. 2017. Caracterización físico-química de nanoemulsiones de fitoesteroles formuladas con emulsificantes modificados. Tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Veracruz. Veracruz, México.
- Alegria Rivadeneyra M. Evaluación de la bioactividad de nanoemulsiones O/W de ácido betulínico sobre el proceso de carcinogénesis en ratones transgénicos K14E6. Tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Veracruz.
- Alfonso, L., Santos, J., Calero, N., Carmen, M., y Muñoz, J. 2013. Caracterización reológica de una suspoemulsión comercial para uso agroquímico. *Afinidad*.pp: 54–59.
- Alvarez-Mitre, F. M., Morales-Rueda, J. A., Dibildox-Alvarado, E., Charó-Alonso, M. A., y Toro-Vazquez, J. F. 2012. Shearing as a variable to engineer the rheology of candelilla wax organogels. *Food Research International*. 49(1): 580–587. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.08.025>
- Arora, R., Aggarwal, G., Harikumar, S. L., y Kaur, K. 2014. Nanoemulsion based hydrogel for enhanced transdermal delivery of ketoprofen. *Advances in Pharmaceutics*. 1–12. <http://doi.org/10.1155/2014/468456>
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Omar, A. K. M. 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*. 117(4): 426–436. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- Barnes, H. A: 2000. A handbook of elementary rheology. The University of Wales Institute of Non-Newtonian Fluid Mechanics, Department of Mathematics,

University of Wales Aberystwyth, Penglais, Aberystwyth, Dyfed, Wales, SY23 3BZ pp: 81-100.

- Balasubramanian, R., Sughir, A., y Damodar, G. 2012. Oleogel: A promising base for transdermal formulations. *Asian Journal of Pharmaceutics*, 6: 1-9. <http://doi.org/10.4103/0973-8398.100118>
- Batlouni, M. 2009. Artículo de Revisión Antiinflamatorios No Esteroides: Efectos Cardiovasculares, Cerebrovasculares y Renales Artículo de Revisión. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. pp: 538–546.
- Bernard, P., Scior, T., Didier, B., Hibert, M., y Berthon, J. Y. 2001. Ethnopharmacology and bioinformatic combination for leads discovery: Application to phospholipase A2 inhibitors. *Phytochemistry*. 58(6): 865–874. [http://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00312-0](http://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00312-0)
- Bhatia, A., Singh, B., Raza, K., Wadhwa, S., y Katare, O. P. 2013. Tamoxifen-loaded lecithin organogel (LO) for topical application: Development, optimization and characterization. *International Journal of Pharmaceutics*. 444(1–2): 47–59. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.01.029>
- Bringmann, G., Saeb, W., Assi, L A., Francois, G., Sankara Narayanan, A. S., Peters, K., and Peters, E. M. 1997. Betulinic acid: isolation from *Triphyophyllum peltatum* and *Ancistrocladus heyneanus*, antimalarial activity, and crystal structure of the benzyl ester. *Planta Medica*. 63:255-257.
- Calixto, G., Yoshii, A. C., Rocha e Silva, H., Stringhetti Ferreira Cury, B., y Chorilli, M. 2015. Polyacrylic acid polymers hydrogels intended to topical drug delivery: preparation and characterization. *Pharmaceutical Development and Technology*. 20(4): 490–496. <http://doi.org/10.3109/10837450.2014.882941>
- Caló, E., y Khutoryanskiy, V. V. 2015. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *European Polymer Journal*. 65: 252–267. <http://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.11.024>
- Cavazos Garduño, A. 2013. Formación y caracterización de nanoemulsiones O/W de ácido betulínico elaboradas a partir de lecitina modificada con ácidos

- grasos omega-3. Tesis de Doctorado en Ciencias en Alimentos. Instituto Tecnológico de Veracruz. Veracruz, México.
- Chandramu, C., Manohar, R. D., Krupadanam, G. D., y Dashavantha, R. V. 2003. Isolation, Characterization and Biological Activity of Betulinic Acid and Ursolic Acid from *Vitex negundo L.*; *Phytotherapy Research*. 17: 129-134.
 - Chávez Zamudio, R. 2015. Biodisponibilidad de ácido betulínico y curcumina en nanoemulsiones estabilizadas con lisofosfatidilcolina en un modelo murino. Tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Veracruz. Veracruz, México.
 - Cichewicz, R. H., y Kouzi, S. A. 2004. Chemistry, Biological Activity, and Chemotherapeutic Potential of Betulinic Acid for the Prevention and Treatment of Cancer and HIV Infection. *Medicinal Research Reviews*,24(1), 90–114. <http://doi.org/10.1002/med.10053>
 - Ciurlea, S. A., Dehelean, C. A., Ionescu, D., Berko, S., Csanyi, E., Hadaruga, D. I., Ganta, S., y Amiji, M. M. 2010. A comparative study regarding melanoma activity of Betulinic acid on topical ointment vs. systemic nanoemulsion delivery systems. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*,16(4), 420–426.
 - Clemente Oteo, M. J. 2013. Synthesis, characterization and study of supramolecular gel materials based on glycoamphiphiles. Tesis de Doctorado. Universidad de Zaragoza
 - Co, E. D., y Marangoni, A. G. 2012. Organogels: An Alternative Edible Oil-Structuring Method. *Journal of the American Oil Chemists´ Society*. pp.749–780. <http://doi.org/10.1007/s11746-012-2049-3>
 - Cornell, M., Pillai, S., y Oresajo, C. 2010. Part 2: Delivery of Cosmetic Skin Actives Chapter 8: Percutaneous delivery of cosmetic actives to the skin. *Cosmetic.Dermatology: Products and Procedures*. pp. 62–70.
 - Dassanayake, L. S. K., Kodali, D. R., Ueno, S., y Sato, K. 2009. Physical properties of rice bran wax in bulk and organogels. *Journal of the American Oil*

- Chemists' Society*. 86(12): 1163–1173. <http://doi.org/10.1007/s11746-009-1464->
- Dassanayake, L. S. K., Kodali, D. R., Ueno S. 2011. Formation of oleogels based on edible lipid materials. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 16: 432–439.
 - De Vargas, B. A., Bidone, J., Oliveira, L. K., Koester, L. S., Bassani, V. L., y Teixeira, H. F. 2012. Development of topical hydrogels containing genistein-loaded nanoemulsions. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 8(2): 330–336. <http://doi.org/10.1166/jbn.2012.1386>
 - Di Giuseppe, E., Corbi, F., Funicello, F., Massmeyer, A., Santimano, T. N., Rosenau, M., y Davaille, A. 2015. Characterization of Carbopol® hydrogel rheology for experimental tectonics and geodynamics. *Tectonophysics*. 642(1): 29–45. <http://doi.org/10.1016/j.tecto.2014.12.005>
 - Escalona, O. y Quintanar, D. 2014. Nanogeles poliméricos: una nueva alternativa para la administración de fármacos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 45 (3): 17–38.
 - Edelsztein, C. V. 2010. Síntesis orientada al diseño de organogelificantes esteroidales de bajo peso molecular. Tesis de Doctorado. Universidad de Buenos Aires Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Química Orgánica
 - Escuder, B., LLusar, M., y Miravet, J. F. 2006. Insight on the NMR study of supramolecular gels and its application to monitor molecular recognition on self-assembled fibers. *Journal of Organic Chemistry*. 71(20): 7747–7752. <http://doi.org/10.1021/jo0612731>
 - Espinosa, H., García E. 2017. Tecnologías de nano/microencapsulación de Compuestos Bioactivos. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

- Estrada Gómez, A. H., González Ruiz, N. K., y Medina, D. 2011. Actividad Antiinflamatoria de Productos Naturales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 10 (3):182-217
- Estroff, L. a, y Hamilton, A. D. 2004. Water Gelation by Small Organic Molecules Water Gelation by Small Organic Molecules. *Chemical Reviews*. 104 (3):1201–1218. <http://doi.org/10.1021/cr0302049>
- Ferrán, C.-L. 2014. Aine y riesgo cardiovascular: los menos posibles, a la menor dosis posible y durante el menor tiempo posible. *Revista Médica Clínica la Condes*. 25(5): 850-851. [http://doi.org/10.1016/S0716-8640\(14\)70116-6](http://doi.org/10.1016/S0716-8640(14)70116-6)
- Flory, P. J. 1974. Introductory Lecture. *Discuss of the Faraday Society*. (57): 7-18
- Formulacion, 2013. Turbiscan Lab High Performance Stability Analyser. Disponible online en <http://www.formulacion.com/stability-turbiscan-lab.html>. (Consultado el 13 de diciembre de 2016)
- García Barreno, P. 2008. Inflamación. *Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (Esp)*, 102 (1): 91-159,
- Gennaro R. A. 2003. Remington Farmacia. Editorial Médica Panamericana.
- Deepa Pathak, M. P. 2012. Novel drug targeting approach for diabetic retinopathy. Doctoral Thesis Of Philosophy In Pharmaceutical Sciences Jagadguru Sri Shivarathreeswara University. Mysore, India
- Gutiérrez, J. M., González, C., Maestro, A., Solè, I., Pey, C. M., y Nolla, J. 2008. Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 13 (1): 245–251. <http://doi.org/10.1016/j.cocis.2008.01.005>
- Gopal Bag, B., y Shankar Dash, S. 2011. First self-assembly study of betulinic acid, a renewable nano-sized, 6-6-6-6-5 pentacyclic monohydroxy triterpenic acid. *Nanoscale*. (3): 4564–4566. <http://doi.org/10.1039/c1nr10886g>
- Han, L.-J., Li, L., Zhao, L., Li, B., Liu, G.-Q., Liu, X.-Q., y Wang, X.-D. 2013. Rheological properties of organogels developed by sitosterol and lecithin. *Food*

- Research International*. 53(1): 42–48.
<http://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.03.039>
- Hughes, N. E., Marangoni, A. G., Wright, A. J., Rogers, M. a., y Rush, J. W. E. 2009. Potential food applications of edible oil organogels. *Trends in Food Science & Technology*. 20(10): 470–480.
<http://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.06.002>
 - Huguet, A., Recio, M. C., Máñez, S., Giner, R. M., Ríos J. L. 2000. Effect of triterpenoids on the inflammation induced by protein kinase C activators, neutronally acting irritants and other agents. *European Journal of Pharmacology*, 410: 69-81
 - Islam, M. T., Rodríguez-Hornedo, N., Ciotti, S., y Ackermann, C. 2004. Rheological characterization of topical carbomer gels neutralized to different pH. *Pharmaceutical Research*. 21(7): 1192–1199.
<http://doi.org/10.1023/B:PHAM.0000033006.11619.07>
 - Jibry, N., Heenan, R. K., y Murdan, S. 2004. Amphiphilogels for drug delivery: Formulation and characterization. *Pharmaceutical Research*. 21(10): 1852–1861. <http://doi.org/10.1023/B:PHAM.0000045239.22049.70>
 - Kabanov A, Vinogradov S. 2009. Nanogels as Pharmaceutical Carriers: Finite Networks of Infinite Capabilities. *Angewandte Chemie*. 48(30): 5418-5429.
 - Kashiwada, Y., Hashimoto, F., Cosentino, L. M., Chen, C.-H., Garrett, P. E., y Lee, K.-H. 1996. Betulinic Acid and Dihydrobetulinic Acid Derivatives as Potent Anti-HIV Agents. *Journal of Medicinal Chemistry*,39(5): 1016–1017.
<http://doi.org/10.1021/JM950922Q>
 - Kaur, D., y Singh, R. 2015. A Novel Approach: Transdermal Gel. *International Journal of Pharma Research & Review*. 4(10), 41–50
 - Kienzler, J., Gold, M., y Nollevaux, F. (2010). Systemic Bioavailability of Topical Diclofenac Sodium Gel 1 % Versus Oral Diclofenac Sodium in Healthy Volunteers. *Journal of Clinical Pharmacology*. 50 (1):50-61.
<http://doi.org/10.1177/0091270009336234>

- Kim, K. S., Lee, D. S., Kim, D. C., Yoon, C. S., Ko, W., Oh, H., y Kim, Y. C. 2016. Anti-inflammatory effects and mechanisms of action of coussaric and betulinic acids isolated from diospyros kaki in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Molecules*. 21(9): 1–13. <http://doi.org/10.3390/molecules21091206>
- Klang, V., Matsko, N. B., Valenta, C. y Hofer, F. 2012. Electron microscopy of nanoemulsions: An essential tool for characterisation and stability assessment. *Micron*. 43: 85-103. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2011.07.014>
- Kokkarachedu, V., Raghavendra, G. M., Jayaramudu, T., Yallapu, M. M., y Sadiku, R. 2017. A mini review on hydrogels classification and recent developments in miscellaneous applications. *Materials Science and Engineering: C*. <http://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.096>
- Kumar, R., y Katare, O. P. 2005. Lecithin organogels as a potential phospholipid-structured system for topical drug delivery: a review. *The American Association of Pharmaceutical Scientists*, 6(2): E298–E310. <http://doi.org/10.1208/pt060240>.
- Li, Y., Wang, T., y Liu, M. 2007. Ultrasound induced formation of organogel from a glutamic dendron. *Tetrahedron*. 63(31): 7468–7473. <http://doi.org/10.1016/j.tet.2007.02.070>
- Liu R. H. 2003. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals1–4. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 78(suppl):517S–20S.
- Lohan, S., Icken, N., Teutloff, C., Saeidpour, S., Bittl, R., Lademann, J., Fleigec, E., Haag, S. F. y Meinke, M. 2016. Investigation of cutaneous penetration properties of stearic acid loaded to dendritic core-multi-shell (CMS) nanocarriers. *International Journal of Pharmaceutics*, 501(1): 271–277. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.02.004>
- Lopez-Martínez, A., Charó-Alonso, M. A., Marangoni, A. G., & Toro-vazquez, J. F. 2015. Monoglyceride organogels developed in vegetable oil with and without

- ethylcellulose. *Food Research International*. 72: 37–46
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.03.019>
- Loyo Cruz, V. M. 2017. Caracterización fisicoquímica de nanoemulsiones de α -Tocoferol evaluadas en un sistema de digestión in vitro. Tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Veracruz. Veracruz, México.
 - Lupi, F. R., Gabriele, D., Greco, V., Baldino, N., Seta, L., y de Cindio, B. 2013. A rheological characterisation of an olive oil/fatty alcohols organogel. *Food Research International*. 51(2): 510–517.
<http://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.01.0>
 - Máñez, S., Recio, M. C., Giner R. M. Ríos, J.-L. 1997. Effect of selected triterpenoids on chronic dermal inflammation. *European Journal of Pharmacology*. 334 1997 103–105. [http://doi.org/10.1016/S0014-2999\(97\)01187-4](http://doi.org/10.1016/S0014-2999(97)01187-4)
 - Mallia, V. A., George, M., Blair, D. L., y Weiss, R. G. 2009. Robust organogels from nitrogen-containing derivatives of (R)-12-hydroxystearic acid as gelators: Comparisons with gels from stearic acid derivatives. *Langmuir*. 25(15): 8615–8625. <http://doi.org/10.1021/la8042439>
 - Martínez Martínez, M. T. 2016. Desarrollo y aplicaciones de hidrogeles para la administración y liberación modificada de fármacos. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia. Facultad de Farmacia
 - Maya, S., Sarmiento, B., Nair, A., Rejinold, N. S., Nair, S. V., y Jayakumar, R. 2013. Smart stimuli sensitive nanogels in cancer drug delivery and imaging: A review. *Current Pharmaceutical Design*. 19(41): 7203–7218.
<http://doi.org/10.2174/13816128194113121912414>
 - Melo, C. L., Queiroz, M. G. R., Arruda Filho, A. C. V, Rodrigues, A. M., De Sousa, D. F., Almeida, J. G. L., Pessoa, O. D. L., Silveira, E. R., Menezes, D. B., Melo, T. S., y Rao, A. V. S. 2009. Betulinic acid, a natural pentacyclic triterpenoid, prevents abdominal fat accumulation in mice fed a high-fat diet.

- Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57(19): 8776–8781.
<http://doi.org/10.1021/jf900768>
- Menger, F. M., y Caran, K. L. 2000. Anatomy of a Gel. Amino Acid Derivatives That Rigidify Water at Submillimolar Concentrations. *Journal of the American Chemical Society*. 122(47): 11679–11691.
 - McClements, D. J. 2009. Biopolymers in Food Emulsions. Modern Biopolymer Science (First Edition). <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-374195-0.00004-5>
 - McClements, D. J. 2011. Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. *Soft Matter*. 7(6): 2297. <http://doi.org/10.1039/c0sm00549e>
 - Mcgettigan, P., y Henry, D. 2006. Cardiovascular Risk and Inhibition of Cyclooxygenase. *Journal American Medical Association*. 296 (13)1–12. <http://doi.org/10.1001/jama.296.13.jrv60011>
 - Moghaddam, M. G., Ahmad, F. B. H., y Samzadeh-Kermani, A. 2012. Biological Activity of Betulinic Acid: A Review. *Pharmacology & Pharmacy*, 3(2): 119–123. <http://doi.org/10.4236/pp.2012.32018>
 - Momoh, M. A., y Esimone, C. O. 2012. Phospholipon 90H (P90H) -based PEGylated microscopic lipospheres delivery system for gentamicin: an antibiotic evaluation. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(11): 889–894. [http://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60248-2](http://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60248-2)
 - Mou, D., Chen, H., Du, D., Mao, C., Wan, J., Xu, H., y Yang, X. 2008. Hydrogel-thickened nanoemulsion system for topical delivery of lipophilic drugs. *International Journal of Pharmaceutics*. 353(1–2): 270–276. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.11.051>
 - Mujawar, N. K., Ghatage, S. L., y Yeligar, V. C. 2014. Organogel: Factors and Its Importance. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, 4(3), 758–773.
 - Murakawa, M., Yamaoka, K., Tanaka, Y., y Fukuda, Y. 2006. Involvement of tumor necrosis factor (TNF) - a in phorbol ester 12- O -tetradecanoylphorbol-13-

- acetate (TPA) -induced skin edema in mice. *Biochemical Pharmacology*. 71: 1331–1336. <http://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.01.005>
- Murdan, S., Gregoriadis, G., y Florence, A. T. 1999. Novel sorbitan monostearate organogels. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 88(6): 608–614. <http://doi.org/10.1021/js980342r>
 - Naé, H. N. y Reichert, W.W. 1992. Rheological properties of lightly crosslinked carboxy copolymers in aqueous solutions. *Rheologica Acta*. 31:351-360.
 - Nam, S. R., Lee, H. Y., y Hong, J. I. 2008. Self-assembled organogels based on two-component system. *Tetrahedron*. 64: 10531–10537. <http://doi.org/10.1016/j.tet.2008.08.089>
 - Ochoa Flores, A. A. (2013). Desarrollo de nanoemulsiones con fosfolípidos estructurados como sistemas acarreadores de curcumina. Tesis de Doctorado en Ciencias en Alimentos. Instituto Tecnológico de Veracruz. Veracruz, México
 - Paulsen S. B. 2010. *Highlights through the history of plant medicine*. Bioactive compounds in plants – benefits and risks for man and animals. Oslo, Noruega. pp.18-29.
 - Péntzes, T., Blazszso, G., Aigner, Z., Falkay, G., y Eros, I. 2005. Topical absorption of piroxicam from organogels - *In vitro* and *in vivo* correlations. *International Journal of Pharmaceutics*. 298(1): 47–54. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.03.013>
 - Pich, A., y Richtering, W. 2012. *Polymer Nanogels and Microgels*. *Polymer Science*. <http://doi.org/10.1016/B978-0-444-53349-4.00167-9>
 - Ramirez, A., Benítez, J. L., Rojas de Astudillo, L., y Rojas de Gáscue B. (2016). Materiales polimeros de tipo hidrogeles: revisión sobre su caracterización mediante FTIR, DSC, MEB, MET. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*,36(2): 108–130
 - Raut, S., Bhadoriya, S. S., Uplanchiwar, V., Mishra, V., Gahane, A., y Jain, S. K. 2012. Lecithin organogel: A unique micellar system for the delivery of

- bioactive agents in the treatment of skin aging. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2(1): 8–15. <http://doi.org/10.1016/j.apsb.2011.12.005>
- Raza, K., Kumar, M., Kumar, P., Malik, R., Sharma, G., Kaur, M., y Katare, O. P. 2014. Topical delivery of aceclofenac: Challenges and promises of novel drug delivery systems. *BioMed Research International*. <http://doi.org/10.1155/2014/406731>
 - Recio, M.C., Giner, R. M.', Máñez, S., Gueho, J., Julien, H. B., Hostettmann K., y Ríos, J.L. 1994. Investigations on the Steroidal Anti-Inflammatory Activity of Triterpenoids from *Diospyros leucomelas**. *Planta Medica*,61: 9-12
 - Reyes-Arellano, A. 2008. Geles moleculares y organogelantes. *Tip Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*. 11: 101–104.
 - Sagiri, S. S., Behera, B., Sudheep, T., y Pal, K. 2012. Effect of Composition on the Properties of Tween-80–Span-80-Based Organogels. *Designed Monomers & Polymers*. 15(3): 253–273. <http://doi.org/10.1163/156855511X615669>
 - Sagir, S. S., Behera, B., Rafanan, R. R., Bhattacharya, C., Pal, K., Banerjee, I., Rousseau, D. 2014. Organogels as Matrices for Controlled Drug Delivery: A Review on the Current State. *Soft Materials*. 12(1): 47–72. <http://doi.org/10.1080/1539445X.2012.756016>
 - Sami, A., Taru, M., Salme, K., y Jari, Y-K. 2006. Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 29(1): 1–13. <http://doi.org/10.1016/j.ejps.2006.04.006>
 - Sawada, N., Kataoka, K., Kondo, K., Arimochi, H., Fujino, H., Takahashi, Y., Miyoshi, T., Kuwahara, T., Monden, Y. y Ohnishi, Y. 2004. Betulinic acid augments the inhibitory effects of vincristine on growth and lung metastasis of B16F10 melanoma cells in mice. *British Journal of Cancer*. 90:1672 – 1678.
 - Schick, C. 2015. *Calorimetry. Module in Materials Science and Materials Engineering*. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.01340-0>

- Schick, C., Lexa D., y Leibowitz, L. 2016. Differential Scanning Calorimetry and Differential Thermal Analysis. *Characterization of Materials*. <http://doi.org/10.1002/0471266965.com030.pub2>
- Selzer, E., Pimentel, E., Wacheck, V., Schlegel, W., Pehamberger, H., Jansen, B., y Kodym, R. 2000. Effects of betulinic acid alone and in combination with irradiation in human melanoma cells. *The Journal of Investigative Dermatology*. 114(5): 935–940. <http://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2000.00972.x>
- Seno, K., Okuno, T., Nishi, K., Murakami, Y., Yamada, K., Nakamoto, S., Ono, T., 2001. Pyrrolidine inhibitors of human cytosolic phospholipase A2. Part 2: synthesis of potent and crystallized 4-tri-phenylmethylthio derivative 'pyrrophenone'. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 26: 587–590.
- Sinico, C., Manconi, M., Peppi, M., Lai, F., Valenti, D., y Fadda, A. M. 2005. Liposomes as carriers for dermal delivery of tretinoin: in vitro evaluation of drug permeation and vesicle – skin interaction. *Journal of Controlled Release*. 103: 123–136. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.11.020>
- Shchipunov, Y. A. 2001. Lecithin organogel A micellar system with unique properties. *Colloids and Surfaces*. 185: 541–554. [http://doi.org/10.1016/S0927-7757\(01\)00511-8](http://doi.org/10.1016/S0927-7757(01)00511-8)
- Shchipunov, Y. A, y Hoffmann, H. 1998. Growth, Branching, and Local Ordering of Lecithin Polymer-Like Micelles. *Langmuir*, 14(16): 6350–6360. <http://doi.org/10.1021/la980469w>
- Shen, C.-Y., Xu, P.-H., Shen, B., Min, H.-Y., Li, X.-R., Han, J., y Yuan, H.-L. 2014. Nanogel for dermal application of the triterpenoids isolated from *Ganoderma lucidum* (GLT) for frostbite treatment. *Drug Delivery*. 7544(2): 1–9. <http://doi.org/10.3109/10717544.2014.929756>
- Shi, R., Zhang, Q., Vriesekoop, F., Yuan, Q., y Liang, H. 2014. Preparation of Organogel with Tea Polyphenols Complex for Enhancing the Antioxidation Properties of Edible Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62(33): 8379-8384. <http://doi.org/10.1021/jf501512y>

- Stanley, P. L., Steiner, S., Havens, M., y Tramposch, K. M. 1991. Mouse skin inflammation induce by multiple topical application of 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Skin Pharmacology*, 4: 262-271.
- Steed, J. W. 2011. Supramolecular gel chemistry: developments over the last decade. *Chemical Communications*. 47(5): 1379–1383. <http://doi.org/10.1039/c0cc03293j>
- Steele, J. C. P., Warhurst, D. C., Kirby, G. C., y Simmonds, M. S. J. 1999. In Vitro and In Vivo Evaluation of Betulinic Acid as an Antimalarial. *Phytotherapy Research*, 13: 15–119.
- Steffe, J. F. 1996. Rheological Methods In Food Process Engineering (Second ed.). Dept. of Agricultural Engineering, Michigan State University.
- Tahara, Y., Mukai, S. A., Sawada, S. I., Sasaki, Y., y Akiyoshi, K. 2015. Nanocarrier-Integrated Microspheres: Nanogel Tectonic Engineering for Advanced Drug-Delivery Systems. *Advanced Materials*. 27(34): 5080–5088. <http://doi.org/10.1002/adma.201501557>
- Takafuji, M., Kira, Y., Tsuji, H., Sawada, S., Hachisako, H., y Ihara, H. 2007. Optically active polymer film tuned by a chirally self-assembled molecular organogel. *Tetrahedron*. 63(31): 7489–7494. <http://doi.org/10.1016/j.tet.2007.02.036>
- Tamargo S. B., Herrera, L., Bello Alarcón, A., Sierra, G., Cuéllar, A., y Humberto, G. R. 2011. Obtención de fosfolípidos a partir de la lecitina de soya (*Glicine max L*), para usos biomédicos. *Revista Cubana de Química*, XXIII. pp. 5–14.
- Tejada, F. 2010. Hepatotoxicidad por Fármacos. *Revista Clínica de Familia*, 3(3): 177-191.
- Terech, P., Rossat, C., y Volino, F. 2000. On the Measurement of Phase Transition Temperatures in Physical Molecular Organogels. *Journal of Colloid and Interface Science*. 227(2): 363–370. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1006/jcis.2000.6868>

- Thurnher, D., Turhani, D., Pelzmann, M., Wannemacher, B., Knerer, B., Formanek, M., Wacheck, V. Selzer, E. 2003. Betulinic acid: a new cytotoxic compound against malignant head and neck cancer cells. *Head & Neck* (25): 732-740. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1002/hed.10231>
- Todica, M., Pop, C. V, Udrescu, L., y Pop, M. 2010. Rheological Behavior of Some Aqueous Gels of Carbopol with Pharmaceutical Applications. *Chinese Physics Society*. 27(1): 18301. <http://doi.org/10.1088/0256-307X/27/1/01830>
- Toro-Vazquez, J. F., Morales-Rueda, J. A., Dibildox-Alvarado, E., Charó-Alonso, M., Alonzo-Macias, M., y González-Chávez, M. M. 2007. Thermal and Textural Properties of Organogels Developed by Candelilla Wax in Safflower Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 84(11): 989–1000. <http://doi.org/10.1007/s11746-007-1139-0>
- Toro-Vazquez, J. F., Mauricio-Pérez, R., González-Chávez, M. M., Sánchez-Becerril, M., Ornelas-Paz, J. D. J., y Pérez-Martínez, J. D. 2013. Physical properties of organogels and water in oil emulsions structured by mixtures of candelilla wax and monoglycerides. *Food Research International*. 54(2): 1360–1368. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.09.046>
- Tseng, H.C. Liu YC 2005. Immobilized betulinic acid column and its interactions with phospholipase A2 and snake venom proteins. *Journal of Separation Science*. 27: 1215-1220
- Upadhyay, K. K.y Tiwari, C. 2007. Sorbitan ester organogels for transdermal delivery of sumatriptan. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 33(6): 617–625. <http://doi.org/10.1080/036390407011992>
- Vikbjerg, A. F. 2006. Enzyme Catalyzed Production of Phospholipids with Modified Fatty Acid Profile. PhD Thesis. Technical University of Denmark (DTU)
- Villegas Domínguez, V. D. 2014. Estudio biofarmacéutico de flavanonas isoprenílicas antiinflamatorias libres y vehiculizadas en sistemas nanoestructurados para aplicación tópica. Tesis de Doctorado. Universidad de Barcelona

- Wiechers, J. W. 1989. The barrier function of the skin in relation to percutaneous absorption of drugs. *Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition*. 11(6): 185–98. <http://doi.org/10.1007/BF01959410>
- Yadav, H. K. S., Anwar, N., Halabi, A., y Alsalloum, G. A. 2017. Nanogels as Novel Drug Delivery Systems - A Review. *Insights in Pharma Research*. 1(1):105
- Yang, Y., Wang, S., Xu, H., Sun, C., Li, X., Zheng, J. 2008. Properties of topically applied organogels: Rheology and in vitro drug release. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 3(4): p. 175-183.
- Yogeewari, P. y Sriram, D. 2005. Betulinic acid and its derivatives: a review on their biological properties. *Current Medicinal Chemistry*, 12(6): 657–666. <http://doi.org/10.2174/0929867053202214>
- Young, L. M., Kheifets, J. B., Ballaron, S. J., y Young, J. M. 1989. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents and Actions*. *mura* 26 (3): 335-3341.
- Yuan, Y., Gao, Y., Mao L. 2008. Characterization and stability evaluation of β -carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization under various emulsifying conditions. *Food Research International*. 41(1): 61–68 41, 61–68. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.09.006>
- Yuan, Y.-Y., Du, J.-Z., Song, W.-J., Wang, F., Yang, X.-Z., Xiong, M.-H., y Wang, J. 2012. Biocompatible and functionalizable polyphosphate nanogel with a branched structure. *Journal of Materials Chemistry*. 22(18): 9322. <http://doi.org/10.1039/c2jm30663h>
- Yueqin, Z. 2007. Identificación y actividad farmacológica de principios de especies antiinflamatorias. Tesis de Doctorado Universidad de Valencia. Valencia España
- Zetzl, A. K., y Marangoni, A. G. 2012. Structured oils and fats (organogels) as food ingredient and nutraceutical delivery systems. *Encapsulation Technologies*

and Delivery Systems for Food Ingredients and Nutraceuticals.
<http://doi.org/http://dx.doi.org/login.ezproxy.library.ualberta.ca/10.1533/9780857095909.3.392>

- Zha, L., Banik, B., y Alexis, F. 2011. Stimulus responsive nanogels for drug delivery. *Soft Matter*. 7(13): 5908-5916. <http://doi.org/10.1039/c0sm01307b>