

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica



TESIS DOCTORAL

Desarrollo y caracterización de formulaciones de acción antioxidante a partir de extractos de *Sambucus ebulus* L

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Sara Safi Hakmi

Directores

Damián Córdoba Díaz
Olga María Palomino Ruiz-Poveda
Manuel Córdoba Díaz

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica



TESIS DOCTORAL

**Desarrollo y caracterización de
formulaciones de acción antioxidante a
partir de extractos de *Sambucus ebulus* L.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Sara Safi Hakmi

Directores

**Damián Córdoba Díaz
Olga María Palomino Ruiz-Poveda
Manuel Córdoba Díaz**

Madrid, 2017

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar deseo expresar mi agradecimiento a la Dra. D. Emilia Barcia Hernández, como Directora del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica.

Asimismo, quiero manifestar mi gratitud a mis directores de tesis los profesores Dr. D. Damián Córdoba Díaz, Dr. D. Manuel Córdoba Díaz y Dra. Dña. Olga María Palomino Ruiz-Poveda por sus consejos, orientaciones en la dirección de esta Tesis y por guiarme en el mundo de la investigación.

También querría agradecer a la Dra. Dña. María de Cortes Sánchez Mata por su ayuda y colaboración.

A todos los profesores, compañeros y personal del laboratorio su ayuda y amistad en especial a Laura, Manal y Verónica.

No me olvido de Anais y Carlos por su amabilidad y ayuda cuando la necesité y por supuesto del resto de compañeros que forman parte de los departamentos ya que cada uno puso su granito de arena en mí o en mi tesis.

Pero sin duda, es a mi familia, mis padres, mis hermanas y mi hijo por ser mi apoyo incondicional. A vosotros en especial os dedico esta Tesis porque habéis vivido lo bueno y lo malo de este proyecto. Porque siempre estaréis a mi lado, os quiero.



©Ángel S. Crespo 2012

<http://guadarramistas.com/wp-content/uploads/2014/07/Semillas-de-Sambucus-ebulus.jpg>

FRUTO DE ESTA TESIS HAN SIDO:

Publicaciones:

S. Safi, M. Córdoba-Díaz, Damián Córdoba-Díaz, Pilar Jiménez López, Tomás Girbés Juan y O. M. Palomino. “*Cuantificación de flavonoides y fenoles totales en extractos de plantas*”. PHARMATECH, N°22 (2016). Pags 72-78

P. Jiménez, V. Descalzo, T. Girbés, S.Safi, M. Córdoba -Díaz, D. Córdoba- Díaz. “*Antioxidantes de origen vegetal y efecto sobre el envejecimiento*”. PHARMATECH, N°27 (2017). Pags 82-89

S. Safi, M. Córdoba-Díaz, Damián Córdoba-Díaz, Pilar Jiménez López, Tomás Girbés Juan y O. M. Palomino. “*Pharmaceutical development of antioxidant formulations for topical use*”. International Journal of Pharmaceutics. EN REALIZACIÓN

Congresos:

S. Safi, V. García, Damián Córdoba-Díaz. “Determinación de la actividad antioxidante y antirradicalaria de las distintas partes de *Sambucus ebulus L*”. IX JORNADA SOBRE TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA, BIOFARMACIA Y FARMACOCINÉTICA, Facultad de Farmacia, Madrid, España 2015. (Poster).

S. Safi, V. García, L. Lavín, M. Córdoba-Díaz, Damián Córdoba-Díaz, O. M. Palomino. “Encapsulación de Extractos Vegetales”. X JORNADA SOBRE TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA, BIOFARMACIA Y FARMACOCINÉTICA, Facultad de Farmacia, Madrid, España 2016. (Poster).

S. Safi, V. García, L. Lavín, M. Córdoba-Díaz, Damián Córdoba-Díaz, O. M. Palomino. “Extracción y determinación de la actividad antioxidante de distintas plantas”. XI JORNADAS complutenses, X COGRESO NACIONAL DE INVESTIGACION EN CIENCIAS DE LA SALUD, XV CONGRESO DE CIENCIAS VETERINARIAS Y BIOMÉDICAS., Facultad de Farmacia, Madrid, España 2016. (Poster).

S. Safi, V. García, L. Lavín, M. Córdoba-Díaz, Damián Córdoba-Díaz. “Micropartículas como sistemas de liberación controlada de fármacos para el tratamientos de colitis ulcerosa”. XI JORNADAS complutenses, X COGRESO NACIONAL DE INVESTIGACION EN CIENCIAS DE LA SALUD, XV CONGRESO DE CIENCIAS VETERINARIAS Y BIOMÉDICAS., Facultad de Farmacia, Madrid, España 2016. (Poster).

• **INDICE GENERAL**

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	3
ABSTRACT	9
1. INTRODUCCIÓN	16
1.1. IMPORTANCIA DE LAS SUSTANCIAS ANTIOXIDANTES.....	21
1.1.1. ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO (EROs).....	23
1.1.2. FUENTES DE RADICALES LIBRES.....	24
1.1.3. TIPOS DE EROs.....	25
1.1.4. DAÑO OXIDATIVO A LAS BIOMOLÉCULAS.....	28
1.1.5. SISTEMAS PROTECTORES FRENTE AL DAÑO OXIDATIVO.....	30
1.1.5.1. Sistemas antioxidantes enzimáticos.....	31
1.1.5.2. Sistemas antioxidantes no enzimáticos.....	35
1.1.6. ENFERMEDADES, PROCESOS DEGENERATIVOS Y ESTRÉS OXIDATIVO.....	42
1.2. VÍA TÓPICA DE ADMINISTRACIÓN DE MEDICAMENTOS.....	46
1.2.1. EFECTO DE LOS RL A NIVEL CUTÁNEO.....	49
1.3. DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE VEGETAL: <i>Sambucus ebulus</i> L.	55
1.3.1. MORFOLOGÍA Y CARACTERIZACIÓN BOTÁNICA.....	55
1.3.2. PRINCIPALES COMPONENTES OBTENIDOS MEDIANTE EXTRACCIÓN: COMPUESTOS FENÓLICOS ANTIOXIDANTES.....	60
1.3.3. ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA.....	66
1.3.3.1. Actividad antiinflamatoria.....	66
1.3.3.2. Actividad analgésica.....	66
1.3.3.3. Actividad antimicrobiana y antiséptica.....	67
1.3.3.4. Actividad antiemética.....	67
1.3.3.5. Actividad antiulcerosa.....	68

1.3.3.6. Actividad antitumoral	68
1.3.3.7. Actividad contra <i>Helicobacter pylori</i>	69
1.3.3.8. Actividad antiparasitaria	69
1.3.3.9. Tratamientos dermatológicos	70
1.3.3.10. Efecto metabólico	71
1.3.4. TOXICIDAD	72
1.3.5. PROTEÍNAS INACTIVADORAS DE RIBOSOMAS	73
1.3.5.1. RILs (Lectinas antirribosómicas) de <i>Sambucus ebulus</i>	75
1.3.5.2. Lectinas no antirribosómicas	78
1.3.5.3. Inmunotoxinas de ebulina.....	79
1.3.5.4. Conjugados de ebulina con transferrina contra células tumorales	80
2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL	81
3 MATERIALES Y MÉTODOS	83
3.1. OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	88
3.1.1 RECOLECCIÓN DE LA ESPECIE VEGETAL Y TRATAMIENTOS PREVIOS	88
3.1.2 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y SELECCIÓN DE FRACCIONES DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EXENTAS DE RIPS TÓXICAS.....	90
3.1.2.1. Optimización del proceso de extracción.....	90
3.1.2.2. Análisis fitoquímico a de los extractos:.....	92
3.1.2.3. Liofilización	93
3.1.3. MICROENCAPSULACIÓN DE EXTRACTOS EN BASE QUITOSANO	94
3.1.3.1 Quitosano: características, propiedades y aplicaciones.....	94
3.1.3.2. Micropartículas en base quitosano	96
3.2. MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN DE EXTRACTOS.....	104
3.2.1. DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES	104
3.2.2. CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	106

3.2.2.1. Método CUPRAC.....	106
3.2.2.2. Método de Folin-Ciocalteu.....	107
3.2.2.3. Método de DPPH.....	110
3.2.2.4. Método de ORAC.....	111
3.2.3. CARACTERIZACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR Y LA CAPACIDAD PROTECTORA EN CULTIVOS CELULARES.....	115
3.2.3.1. Líneas celulares.....	115
3.2.3.2. Inductor de estrés oxidativo.....	115
3.2.3.3. Cultivos celulares.....	115
3.2.3.4. Recuento de células viables in vitro.....	118
3.2.3.5. Determinación de la viabilidad celular mediante la técnica del MTT.....	120
3.2.4. CARACTERIZACIÓN CROMATOGRÁFICA MEDIANTE HPLC.....	122
3.3. ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FORMULACIONES SEMISÓLIDAS.....	127
3.3.1. DISEÑO Y ELABORACIÓN DE FORMULACIONES TÓPICAS: ASPECTOS GENERALES.....	127
3.3.2. ELABORACIÓN DE LAS FORMULACIONES.....	132
3.3.3. CARACTERIZACIÓN REOLÓGICA DE LAS FORMULACIONES.....	134
3.3.3.1. Estudios de extensibilidad.....	134
3.3.3.2. Estudios de viscosidad.....	135
3.3.4. ESTUDIOS DE DIFUSIÓN A TRAVÉS DE MEMBRANA.....	141
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	160
4.1. OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL Y OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN.....	160
4.1.1. DESECACIÓN.....	160
4.1.2. OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN.....	160
4.1.3. LIOFILIZACIÓN.....	161
4.2. CARACTERIZACIÓN DE EXTRACTOS.....	162

4.2.1. CONTENIDO EN FLAVONOIDES TOTALES	162
4.2.2. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO CUPRAC	162
4.2.3. CONTENIDO TOTAL EN COMPUESTOS FENÓLICOS: MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEAU	164
4.2.4. ENSAYO DE CAPACIDAD ANTIRRADICALARIA: METODO DPPH	166
4.2.5. ENSAYO DE CAPACIDAD DE CAPTACIÓN DE RADICALES LIBRES: MÉTODO ORAC	168
4.2.6. ANALISIS COMPARATIVO DE RESULTADOS	169
4.3. ESTUDIOS DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA	171
4.3.1. ESTUDIOS DE VIABILIDAD CELULAR.....	171
4.3.2. DETERMINACIÓN DEL EFECTO PROTECTOR FRENTE A DAÑO CELULAR INDUCIDO	173
4.4. ESTUDIOS DE CARACTERIZACIÓN CROMATOGRÁFICA	175
4.5. OBTENCIÓN DE MICROPARTÍCULAS	178
4.5.1. OBTENCIÓN DE LAS MICROPARTÍCULAS.....	178
4.5.2. ESTUDIOS DE LIBERACIÓN IN VITRO	180
4.6. ESTUDIOS DE DIFUSIÓN DEL EXTRACTO SELECCIONADO (HM).....	181
4.6.1. DIFUSIÓN DE EXTRACTO ACUOSO DE (HM) A TRAVÉS DE MEMBRANA HIDRÓFILA.....	181
4.6.2. DIFUSIÓN DE EXTRACTO ACUOSO DE (HM) A TRAVÉS DE MEMBRANA LIPÓFILA (PDMS)	184
4.6.3. DIFUSIÓN DE EXTRACTO LIOFILIZADO DE (HM) A TRAVÉS DE MEMBRANA HIDRÓFILA	185
4.6.4. DIFUSIÓN DE EXTRACTO LIOFILIZADO DE HOJAS MADURAS DE S. EBULUS A TRAVÉS DE MEMBRANA LIPÓFILA (PDMS)	187
4.6.5. ANÁLISIS COMPARATIVO DE RESULTADOS	188
4.7. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE GELES DE USO TÓPICO.....	191
4.7.1. GEL DE CARBOPOL 980 AL 1% A PARTIR DE EXTRACTO ACUOSO.....	191
4.7.1.1. Caracterización reológica mediante extensometría	191
4.7.1.2. Caracterización reológica mediante viscosimetría	193

4.7.1.3. Estudio de liberación de polifenoles por membrana hidrófila.....	194
4.7.2. GEL DE CARBOPOL 980 AL 1,5% A PARTIR DE EXTRACTO ACUOSO	197
4.7.2.1. Caracterización reológica mediante extensometría	197
4.7.2.2. Caracterización reológica mediante viscosimetría	199
4.7.2.3. Estudio de liberación de polifenoles por membrana hidrófila.....	201
4.7.3. GEL DE CARBOPOL 980 AL 1% A PARTIR DE EXTRACTO LIOFILIZADO	203
4.7.3.1. Caracterización reológica mediante extensimetría	203
4.7.3.2. Caracterización reológica mediante viscosimetría	205
4.7.3.3. Estudio de liberación de polifenoles por membrana hidrófila.....	206
4.7.4. GEL DE CARBOPOL 980 AL 1,5% A PARTIR DE EXTRACTO LIOFILIZADO	209
4.7.4.1. Caracterización reológica mediante extensometría	209
4.7.4.2. Caracterización reológica mediante viscosimetría	211
4.7.4.3. Estudio de liberación de polifenoles por membrana hidrófila.....	212
4.7.5. ANÁLISIS COMPARATIVO DE RESULTADOS	216
4.7.5.1. Caracterización reológica	216
4.7.5.2. Estudios de liberación de polifenoles	218
5. CONCLUSIONES.....	220
6. BIBLIOGRAFÍA.....	223
ANEXO I: INDICE DE TABLAS	258
ANEXO II: INDICE DE FIGURAS.....	259

ABREVIATURAS

AAPH	2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro
AUC	Área bajo la curva
BSA	Albúmina sérica bovina
CA	Capacidad antioxidante.
CS	Quitosano
CUPRAC	Reducción del ion cobre actividad antioxidante
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EE	Eficacia de encapsulación
EROs	Especies reactivas de oxígeno
FBS	Suero fetal bovino
FC	Folin Ciocalteu
FCN	factor de crecimiento neuronal
FM	Frutos maduros
FV	Frutos verdes
EAG	Equivalentes de ácido gálico
HV	Hojas verdes
HM	Hojas maduras
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
MTT	Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-ilo]-2,5-difeniltetrazol

ORAC	Capacidad de absorción del radical oxígeno
PBS	Tampón fosfato salino
PDMS	Polidimetilsiloxano
RIL	lectina inactivadora de ribosomas (ribosome inactivating lectin)
RIP	proteína inactivadora de ribosomas (ribosome inactivating protein)
RLs	Radicales libres
SGF	fluido gástrico simulado (del inglés —simulated gastric fluid)
TROLOX	Ácido-6-Hydroxi-2, 5,7, 8-tetrametilcromano-2-carboxílico
U373 MG	Células tumorales benignas de astrocitoma humano

RESUMEN

DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE FORMULACIONES DE ACCIÓN ANTIOXIDANTE A PARTIR DE EXTRACTOS DE SAMBUCUS EBULUS L.

- RESUMEN

INTRODUCCIÓN

Los productos naturales, tanto directamente como en forma de preparados o extractos, suponen una fuente ilimitada de nuevos principios activos de aplicación en terapéutica dada su alta diversidad química y variedad de acciones. Constituyen así una de las bases para el desarrollo de nuevos fármacos.

Las reacciones de óxido-reducción son procesos químicos esenciales en los sistemas biológicos para la formación de productos necesarios en los procesos metabólicos celulares. Estas reacciones conllevan la transferencia de electrones y pueden generar compuestos que actúan como radicales libres (RL), entre los que se encuentran las especies reactivas de oxígeno (EROs). En un entorno celular sano, los sistemas antioxidantes existentes son capaces de mantener el equilibrio entre la formación y la destrucción de estos RL. Sin embargo, cuando la producción de RL supera a su neutralización o destrucción, tienen lugar una serie de reacciones conocidas como estrés oxidativo. La piel es el órgano más expuesto de manera directa al daño oxidativo por radicales libres (RL) produciendo inflamación, eccema, cáncer, inmunosupresión o sequedad cutánea, entre otros. Actualmente existen ensayos clínicos que proporcionan evidencia del beneficio de los antioxidantes al ser aplicados de manera tópica. A consecuencia de esto, el desarrollo de productos farmacéuticos que incluyen este tipo de sustancias activas ha crecido de modo acelerado en los últimos años.

Sambucus ebulus L. es una especie muy abundante en la Península Ibérica y de fácil cultivo, rica en flavonoides, esteroides, taninos, glucósidos o derivados del ácido cafeico. Los glucósidos cianogénéticos más abundantes aislados de esta especie son la S-sambunigrina (S-O- β -DGlucopyranosil-mandelonitrilo), la R-prunasina, la R-holocalina y la S-zierina. Entre los flavonoides destacar la quercetina-3-O-lamaribiosido, isorhamnetina-3-O-lamaribiosido, quercetina-3-O-rutinosido (rutina), isorhamnetina-3-O-rutinosido (narcisina) y la isorhamnetina-3-O-glucosido. También contiene triterpenos

pentacíclicos como el β -sitosterol y diferentes ácidos como el ursólico, oleanólico y maslínico. Los frutos representan una buena fuente de aminas heterocíclicas, catequinas, epicatequinas y flavonoides y son las únicas en contener antocianos.

Diversas partes de la planta han sido ampliamente utilizada como alimento o en medicina tradicional fundamentalmente por sus propiedades analgésicas, antiinflamatorias y anti pruriginosas. Los frutos son de especial importancia debido a su alto valor antioxidante y a la presencia de antocianos en cantidades considerables. Sin embargo, esta especie al igual que otras del mismo género, posee una serie de lectinas inactivadoras de ribosomas (RIL), con capacidad de inhibir la biosíntesis de proteínas denominadas genéricamente ebulinas que le confieren una marcada toxicidad.

OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo experimental y bibliográfico se centra en el desarrollo de formulaciones farmacéuticas tópicas a partir de extractos de *S. ebulus* para su uso en patologías cutáneas que cursen con un componente oxidativo.

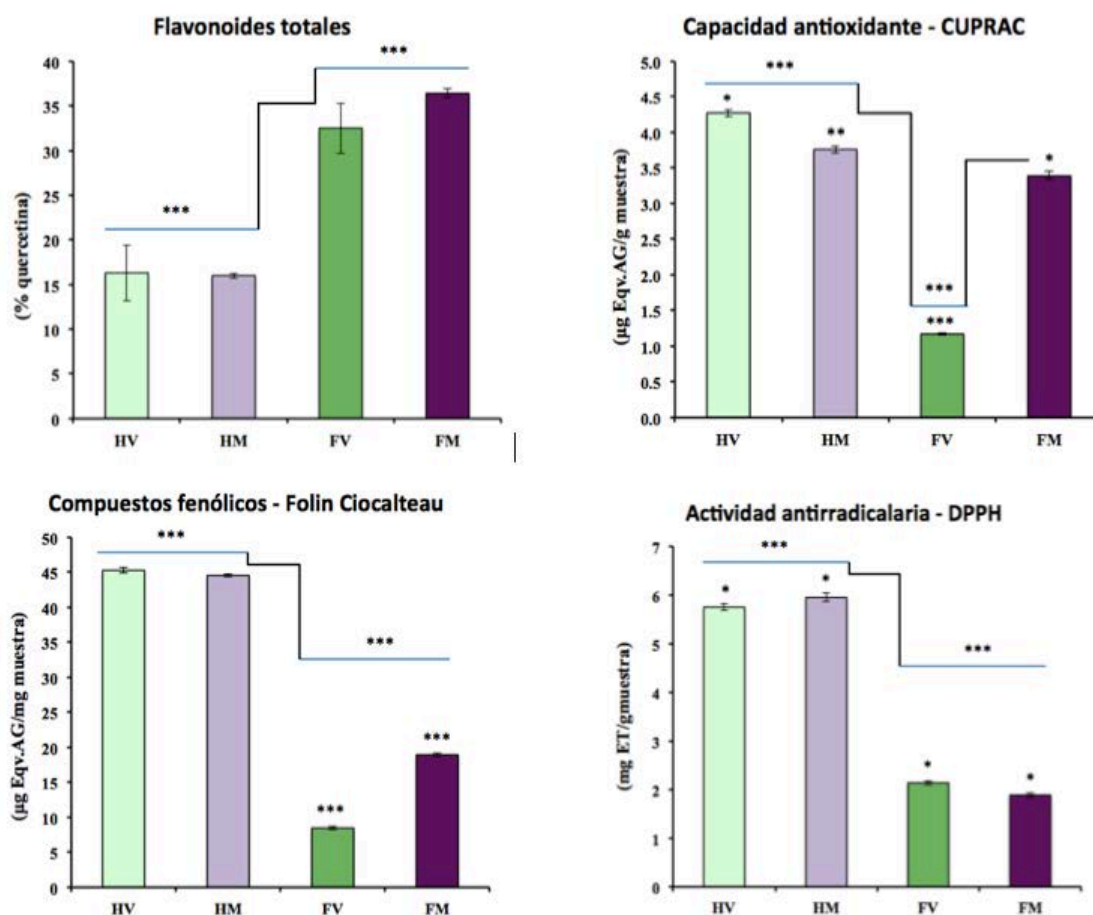
Para la consecución de este objetivo, el planteamiento experimental se divide en cuatro etapas:

1. Optimización de los métodos de extracción y fraccionamiento a partir de hojas o frutos de *S. ebulus* en distinto estado de maduración.
2. Caracterización de los extractos en relación al contenido en flavonoides totales, capacidad antioxidante, actividad biológica y caracterización cromatográfica.
3. Elección de la forma farmacéutica de uso tópico adecuada a la composición y características de liberación del extracto seleccionado y elaboración de las distintas variantes de formulación.
4. Caracterización farmacotécnica de las formulaciones obtenidas: estudios de caracterización reológica y de difusión de compuestos fenólicos

RESULTADOS y CONCLUSIONES

La determinación de la riqueza en flavonoides totales en distintas muestras de *S. ebulus* L. muestra que los frutos maduros son los más ricos en este tipo de compuestos. El examen cromatográfico por HPLC pone de manifiesto la presencia de quercetina como principal componente de este tipo.

El estudio de la actividad antioxidante in vitro de los extractos obtenidos de los distintos extractos muestra una capacidad antioxidante elevada para las hojas verdes, seguida de frutos maduros y hojas maduras y finalmente, frutos verdes. La capacidad antioxidante observada no está relacionada directamente con el contenido en flavonoides totales de la correspondiente muestra. El estudio de la actividad antirradicalaria in vitro demuestra que las hojas presentan mayor capacidad captadora de radicales libres que los frutos, independientemente de su estado fenológico.



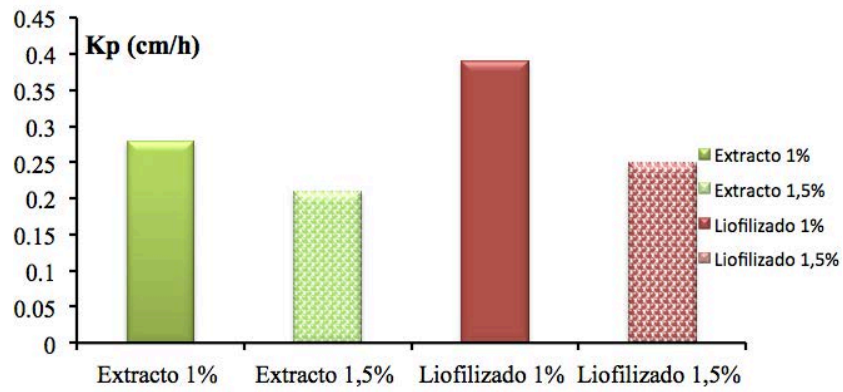
Los extractos de frutos maduros de *S. ebulus* L. no afectan a la viabilidad celular en ninguna de las concentraciones ensayadas. Por su parte, los extractos de hojas maduras ejercen una toxicidad concentración dependiente. Así a la máxima concentración evaluada, el extracto ejerce una toxicidad comparable al control negativo, el Tritón X-100.

Los frutos maduros ejercen en cultivos celulares, un efecto protector moderado frente al agente inductor de radicales libres, peróxido de hidrógeno. Dado que las hojas maduras ejercen un mayor efecto protector y teniendo en cuenta el resto de propiedades evaluadas, se selecciona dicho extracto como el más indicado para su formulación posterior.

Los compuestos fenólicos de extracto de hoja madura difunden en las condiciones ensayadas en un porcentaje muy superior a través de la membrana hidrófila en comparación con la membrana lipófila. La baja difusión al medio receptor de compuestos fenólicos a través de la membrana lipófila (< 2%), es un resultado prometedor en el diseño de formulaciones de acción tópica, al reducirse el aclaramiento sistémico y acumularse los componentes activos en tejido diana. No obstante, este efecto debe ser corroborado en estudios *ex vivo*.

Comparando las propiedades de los geles elaborados a partir de extracto crudo de hoja madura con cantidades crecientes de polímero gelificante, se observa un marcado incremento de la viscosidad y una disminución significativa del índice de extensibilidad. En ambos casos se observa un comportamiento pseudoplástico con índices de comportamiento de flujo inferiores a 1, y un ligero grado de tixotropía, indicando una ruptura parcial reversible según el modelo de Ostwald-de Waele. Estos efectos se observan igualmente en los geles obtenidos a partir de extracto liofilizado.

Aumentos de consistencia de unas cinco veces provocados por un incremento en la proporción de gelificante, no suponen un efecto significativo de retención de los principios activos antioxidantes estudiados en la estructura del gel, con coeficientes de permeación ligeramente más bajos con la fórmula con mayor proporción de carbómero cuando se evalúan formulaciones con extracto crudo. Sin embargo, en formulaciones elaboradas con extracto liofilizado reconstituido, la velocidad de cesión disminuye drásticamente. Este hecho puede ser debido a las características del extracto liofilizado y en el retardo que supone en la recuperación de sus características originales durante el proceso de reconstitución y gelificación.



A partir de los estudios realizados, se ha optimizado una formulación en gel de uso tópico con prometedoras aplicaciones antioxidantes, con unas características farmacotécnicas adecuadas en cuanto a sus propiedades reológicas y de cesión de compuestos de acción antirradicalaria, a partir de un extracto vegetal de hojas maduras de *Sambucus ebulus* L.

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND EVALUATION OF SOME ANTIOXIDANT FORMULATIONS BASED ON SAMBULUS EBULUS L. EXTRACTS

• **ABSTRACT**

INTRODUCTION

Natural products are an unlimited source of new active substances to be applied in therapeutics due to their complex chemical composition which allows a wide variety of biological activities. They become one of the main bases for the development of new drugs.

Reduction-oxidation (redox) reactions are chemical processes within cellular metabolism which are essential for cell survival and development. These reactions are based in the transference of electrons between molecules and may generate different metabolites which act as free radicals; among them, oxygen-reactive species (ROS) are one of the most abundant. In healthy conditions, antioxidant mechanisms within cells are capable of maintaining the balance between the generation and neutralization or destruction of free radicals. Nonetheless, when an imbalance occurs, free radicals levels increase and a series of oxidative reactions known as oxidative stress, take place.

The skin is the organ with the highest exposition to oxidative damage and this fact is shown as the development of different skin alterations such as inflammation, eczema, skin dryness, immunosuppression reactions or cancer, among others. Nowadays, several studies prove the beneficial effect of antioxidant agents when applied topically. Thus, the development of new pharmaceutical products with this kind of active substances is continuously increasing.

Sambucus ebulus L. is a plant widely growing in the Iberian peninsula. Its chemical composition includes flavonoids (quercetin-3-O-laminaribioside, isorhamnetin-3-O-laminaribioside, quercetin-3-O-rutinoside (rutin), isorhamnetin-3-O-rutinoside (narcisin) and isorhamnetin-3-O-glucoside, among others), steroids, tannins and derivatives of caffeic acid. Cyanogenetic glucosides such as S-sambunigrin (S-O- β -DGlucopyranosil-mandelonitrile), R-prunasin, R-holocalin and S-zierin are also abundant. Pentacyclic

triterpenes such as β -sitosterol and ursolic, oleanoic and maslinic acids have also been identified. Fruits contain anthocyanins, together with heterocyclic amines, catechins, epicatechins and flavonoids. This composition leads fruits to a high antioxidant potential.

Different parts of the plant have been used as food or in folk medicines for itching and pain relief or as anti-inflammatory remedy. Nonetheless, this specie also contains several compounds, mainly lectins, with ribosome-activating activity. Lectins are able to inhibit some protein synthesis (generically known as ebulins), this conferring a marked toxicity to the plant.

OBJECTIVES

The general objective of this experimental and bibliographic work is the development of pharmaceutical formulations for topical use from *S. ebulus*, to be applied in skin disorders related to oxidative damage.

Thus, experimental design is taken in four different steps:

1. Optimization of extraction and fractionation processes from leaves and fruits from *S. ebulus* in different phenological stage.
2. Characterization of the extracts in relation to: total flavonoids content, antioxidant ability, biological activity and chromatographic profile.
3. Election of the most adequate pharmaceutical preparation for topical use, according the composition and release-characteristics of the selected extract, with the development of different formulation variations.
4. Pharmacotechnical characterization of the developed formulations: rheological studies and diffusion studies with phenolic compounds.

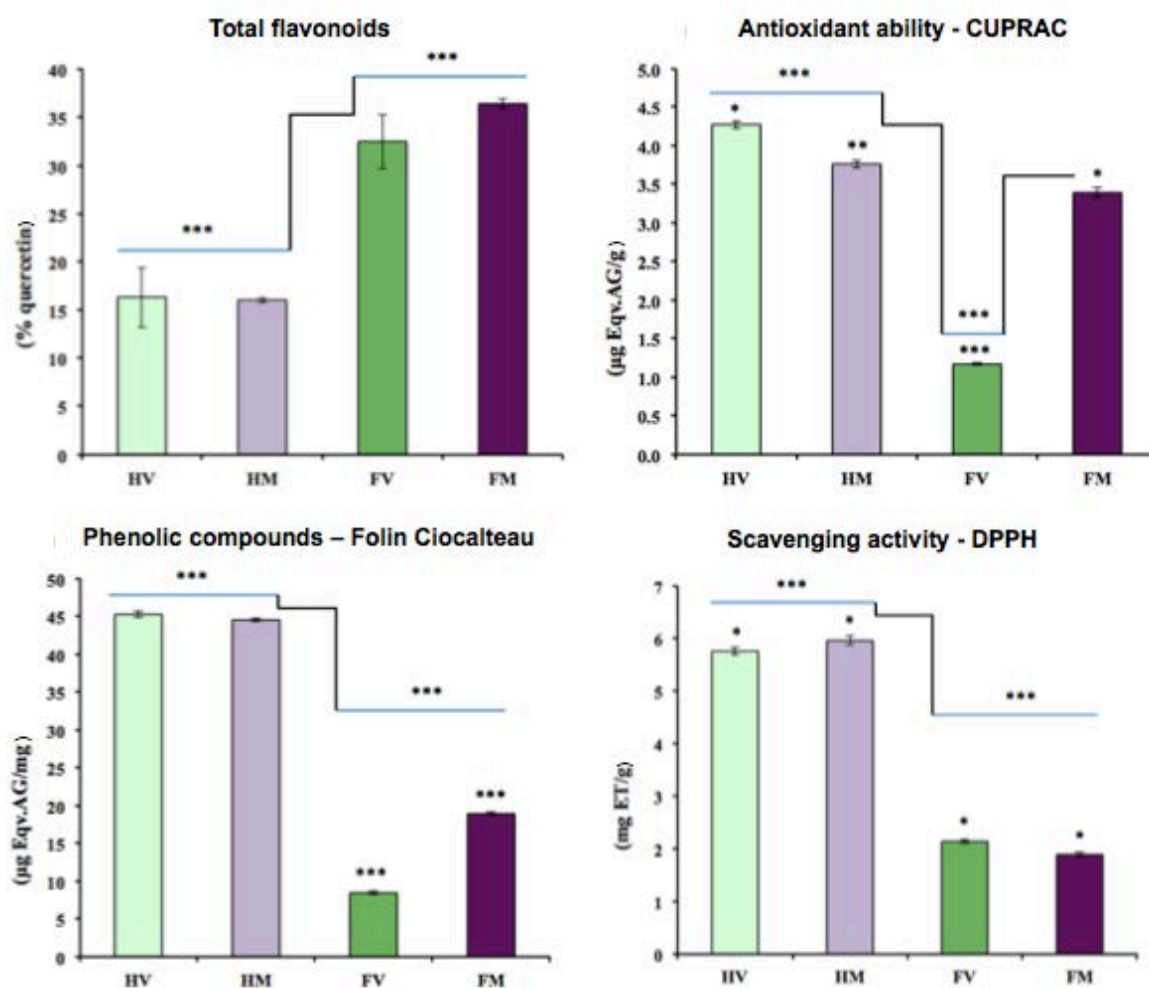
RESULTS AND CONCLUSIONS

The phytochemical study of different parts of *S. ebulus* L. shows that ripe fruits are the richest in total flavonoids. Chemical profile by HPLC shows quercetin as the main component.

The preliminary study of the antioxidant activity of the different extracts by *in vitro* models shows high antioxidant ability for leaves before ripeness, followed by ripe fruits and leaves and finally, fruits before ripeness.

The obtained antioxidant ability is not directly related to the total flavonoids content in every sample.

The study of the scavenging activity *in vitro* reveals leaves as more active than fruits, independently of the phenological stage.



Ripe fruits from *S. ebulus* L. do not affect cell viability at any of the assayed concentrations. Meanwhile, ripe leaves show a dose-dependent toxicity; the highest assayed concentration showed a similar toxicity to the negative control, Triton X-100.

Ripe fruits exert a moderate protective effect in cell culture against the H₂O₂ injury.

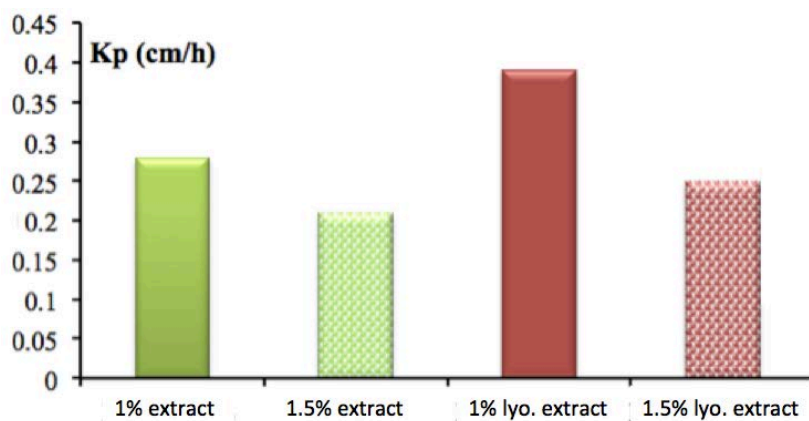
Taking in account the previous results and the protective effect exerted by the different extracts, ripe leaves are considered the most adequate to be selected to assay pharmaceutical formulations.

In the assayed conditions, phenolic compounds from the ripe leaves extract diffuse in a higher percentage through hydrophilic membrane than through lipophilic membranes.

The low diffusion through lipophilic membranes (< 2%) towards the receptor media is a promising result for the development of topically-acting formulations, as systemic clearance is decreased and active substances are accumulated on the desired tissue. Nonetheless, these results should be confirmed by *in vivo* studies.

When comparing the properties of those gels made from the extract of ripe leave with increasing concentrations of gelling polymer, a marked increase in viscosity is obtained, with a significant decrease in the extensibility index. A pseudoplastic behavior is shown in both cases, with flow-behaviour indexes below 1 and a slight degree of thixotropy, this indicating a partial –reversible break, according to Ostwald-de Waele model. These effects are also obtained with gels obtained from lyophilized extracts. Estos efectos se observan igualmente en los geles obtenidos a partir de extracto liofilizado.

A five-fold increase of consistency due to the increase in gelling polymer proportion do not imply a significant effect in the retention of the antioxidant compounds within the study; permeation coefficients are slightly lower for the formulation with the highest carbomer proportion when evaluating preparations from crude extract. Nonetheless, for those formulations obtained from the lyophilized and reconstituted extract, de cession speed dramatically decreases. These results may be due to the extract characteristics, which imply a delay in the recovering of original features during reconstitution and gel process.



In the frame of the following results, a gel formulation for topical use has been developed with promising antioxidant ability, with proper pharmacotechnical characteristics in relation to rheological properties and scavenging activity compounds release, from vegetal extracts from *Sambucus ebulus* L. ripe leaves.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Los productos naturales, tanto directamente como en forma de preparados o extractos, suponen una fuente ilimitada de nuevos principios activos de aplicación en terapéutica dada su alta diversidad química y variedad de acciones. Constituyen así una de las bases para el desarrollo de nuevos fármacos. En la actualidad, la investigación sobre moléculas y compuestos naturales se centra principalmente en especies vegetales, por tratarse de una fuente accesible que permite además una selección previa en base a la información etnofarmacológica disponible.

Además se debe tener en cuenta que un gran porcentaje de la población mundial no tiene acceso a aquellos medicamentos sintéticos por su lugar de producción y su elevado coste. Las plantas medicinales constituyen el método más antiguo utilizado por la Humanidad para tratar la enfermedad. Por esta razón y basadas en diferentes modelos culturales y teóricos, han sido empleadas por todos los sistemas tradicionales de medicina: Ayurveda, medicina tradicional china, tibetana, africana o amazónica. En los países más desarrollados, el empleo de la fitoterapia decayó en la segunda mitad del siglo XX, volviendo a experimentar un resurgir durante las últimas décadas. En los países menos desarrollados, el empleo de las plantas medicinales en terapéutica nunca ha cesado, representando muy frecuentemente el único arsenal terapéutico disponible por dos factores principales: el conocimiento sobre su uso por razones históricas y culturales y la imposibilidad de acceso a medicamentos de síntesis, más caros y de distribución más restringida (WHO, 2007).

En la Unión Europea se comercializan más de 1300 plantas medicinales, de las cuales el 90% se obtiene a partir de recolección silvestre. Hasta el 80% de la población de los países en vías de desarrollo depende totalmente de las plantas medicinales para su sanidad primaria (Chen y cols., 2016).

Por todo ello, el interés en el estudio de plantas medicinales para el tratamiento y prevención de diversas patologías continúa en aumento, debido a la creciente demanda de medicamentos a base de plantas, productos naturales y metabolitos secundarios de plantas medicinales. Todo lo anteriormente expuesto justifica este campo de investigación como uno de los prioritarios a nivel mundial.

La especie *Sambucus ebulus* L. (Adaxaceae), comúnmente conocida como saúco enano o yezgo, es una especie espontánea en la Península Ibérica, que se distribuye también en otras zonas del área mediterránea, extendiéndose por gran parte de Italia, Grecia, Malta, así como en Turquía en sus dos partes europea y asiática. Aunque *S. ebulus* es una especie a la que se le atribuye gran toxicidad asociada a su contenido en lectinas, fundamentalmente la ebulina (Girbés y cols., 1993a; Girbés y cols., 2004; Ferreras y cols., 2011), en medicina tradicional, las hojas se utilizan vía tópica para aliviar el dolor reumático, tratar abscesos, heridas, edemas de distintas enfermedades de naturaleza inflamatoria (Yesilada y cols., 2014). Las raíces y los tallos se administran a los pacientes para el tratamiento de picaduras de abeja, eccema de contacto por ortiga, la artritis y el dolor de garganta (Saeede Saravi y cols., 2009a). Los frutos son de especial importancia debido a su alto valor antioxidante y a la presencia de antocianos en cantidades considerables.

La investigación farmacológica realizada hasta el momento ha demostrado que *S. ebulus* ejerce actividad anti-inflamatoria, antimicrobiana, analgésica, anti-nociceptiva, antitumoral, anti-angiogénicas y antioxidante, en general. Entre los compuestos químicos responsables de dichas actividades se han identificado polifenoles como la quercetina-3-O-glucósido, isorhamnetina-3-O-glucósido, cianidín-3-glucósido y el ácido ursólico (Ding y cols., 2006, Süntar y cols., 2010, Schwaiger y cols., 2011 y Yesilada y cols., 2014). (Tasinov y cols., 2013; Ivanova y Cols., 2014; Salehzadeh, 2014; Yesilada y cols., 2014; Rahimi-Esboei y cols., 2013; Schwaiger, 2011; Shokrzadeh y Saeedi, 2010).

Las reacciones de óxido-reducción son procesos químicos esenciales en los sistemas biológicos para la formación de productos necesarios en los procesos metabólicos celulares. Estas reacciones conllevan la transferencia de electrones y pueden generar compuestos que actúan como radicales libres (RL), entre los que se encuentran las especies reactivas de oxígeno (EROs). En un entorno celular sano, los sistemas antioxidantes existentes son capaces de mantener el equilibrio entre la formación y la destrucción de estos RL. Sin embargo, cuando la producción de RL supera a su neutralización o destrucción, tienen lugar una serie de reacciones conocidas como *estrés oxidativo*. En caso de mantenerse durante un tiempo prolongado, esta situación altera diferentes moléculas y procesos biológicos y puede provocar enfermedad o muerte celular (Salinas y González, 2004; Rodríguez y cols., 2006).

El oxígeno es la principal molécula generadora de radicales libres. Al entrar al organismo interviene en una serie de reacciones de óxido-reducción complejas, en las que se producen algunas especies derivadas de éste que son reactivas y se convierten en los radicales libres que llamamos EROs (especies reactivas del oxígeno) (Dabrowska, 2009).

Varios son los factores que contribuyen al desarrollo del estrés oxidativo, entre ellos el propio envejecimiento, la disminución de la respuesta inmune, la contaminación, las radiaciones o el aumento de la concentración de EROs (Gandhi y Abramov, 2012). Este último factor se produce por un desequilibrio redox intracelular debido a una formación excesiva de EROs (como por ejemplo, radical hidroxilo, anión superóxido o peróxido de hidrógeno), unido a un déficit en los mecanismos de defensa antioxidante endógenos que contrarrestan la acción degenerativa (Ghosh y cols., 2011).

El daño oxidativo origina efectos perjudiciales en el organismo a distintos niveles, que pueden llegar a ser irreversibles (Gilgun-Sherki y cols., 2001). En las proteínas se produce la pérdida de su funcionalidad; en los lípidos, mediante la peroxidación lipídica, se pierde la integridad de las membranas celulares; los ácidos nucleicos se modifican afectando a la función metabólica celular, así mismo se observa una afectación a las enzimas antioxidantes que puede desencadenar incluso en la muerte celular (Halliwell, 2006; Grimm y cols., 2011). Todo eso se traduce en varias enfermedades como la diabetes, insuficiencia renal crónica, aterosclerosis, derrame cerebral, artritis, enfermedades inflamatorias crónicas, cáncer, párkinson, Alzheimer y otras enfermedades degenerativas (Lini y cols., 2011).

De entre todas la enfermedades mencionadas anteriormente y los órganos afectados, la piel es probablemente el órgano más expuesto de manera directa al daño oxidativo por radicales libres (RL). Las radiaciones ultravioleta constituyen el principal factor generador de estrés oxidativo a este nivel. Sus consecuencias son múltiples: fenómenos inflamatorios, eccemas, cáncer, inmunosupresión, sequedad cutánea, telangiectasias y trastornos pigmentarios como la hiper e hipopigmentación, envejecimiento acelerado, daños celulares y estructurales, entre otros. (Halliwell, 2007; Álvarez, 1995).

Dentro de las posibles alternativas, los compuestos antioxidantes exógenos poseen capacidad de eliminar el exceso de EROs o evitar la generación de las mismas. Esto hace que las células sean más resistentes al ataque oxidativo, ejerciendo un efecto protector

mediante la modulación del sistema antioxidante endógeno (Dumont y Beal., 2011; Fariál y cols., 2007; Sheikh y cols., 2012).

Actualmente existen ensayos clínicos que proporcionan evidencia del beneficio de los antioxidantes al ser aplicados de manera tópica. A consecuencia de esto, el desarrollo de productos farmacéuticos que incluyen este tipo de sustancias activas ha crecido de modo acelerado en los últimos años, principalmente como complemento en la terapia contra el envejecimiento cutáneo (Chen, 2012; Palombo, 2007).

La aplicación de *S. ebulus* vía tópica ha sido descrita por diversos autores. En este sentido Schwaiger y cols., 2011 han utilizado extractos con efecto analgésico para varios tipos de dolencias. Por su parte Jabbari y cols., 2016 desarrollaron un gel a base de extracto de hojas de *S. ebulus* que demostró ser más eficaz en tratamiento de pacientes con osteoartritis (OA) que un gel de diclofenaco al 1%.

Por ello, cada vez es mayor la demanda de productos naturales y sobretodo antioxidantes, ya sea en la alimentación, para evitar o controlar enfermedades y en aplicaciones cosméticas, y todo lo relacionado con salud, bienestar y juventud (Dabrowska, 2009).

1.1. IMPORTANCIA DE LAS SUSTANCIAS ANTIOXIDANTES

Los seres vivos necesitamos oxígeno (O₂) para la producción de energía. Sin embargo, el exceso de O₂ en las células es nocivo debido a la formación de especies reactivas generadas durante la oxidación. En bioquímica se considera oxidación a todo proceso en el que ocurre pérdida de electrones, captación de oxígeno o una cesión de hidrógeno y reducción a aquel otro en el cual se captan electrones o se pierden átomos de oxígeno. (González-Mangado, 2001).

Todo proceso de oxidación va siempre acompañado de otro de reducción. Son reacciones de óxido-reducción o reacciones redox entre pares conjugados. (Guerra, 2001). En la naturaleza casi todo es oxidado por el oxígeno; las grasas se vuelven rancias, la goma pierde elasticidad, el papel amarillea, etc. Además estas reacciones de óxido-reducción son muy importantes en bioquímica, puesto que los seres vivos obtienen la mayor parte de su energía libre a partir de ellas: en la fotosíntesis la energía solar impulsa la reducción del CO₂ y la oxidación del H₂O formando carbohidratos y O₂ y en el metabolismo aeróbico, realizado por los eucariotas y muchos procariotas, tiene lugar un proceso inverso a la fotosíntesis, que permite almacenar la energía libre producida en la oxidación de los carbohidratos y de otros compuestos orgánicos, en forma de ATP (Sies, 2013).

Pero este oxígeno que es imprescindible para la vida, puede ser también una potencial fuente de daño celular a través de una producción incontrolada de radicales libres de oxígeno (RLO¹) que dañan las macromoléculas (lípidos, proteínas, hidratos de carbono y ácidos nucleicos) y alteran los procesos celulares (funcionalidad de las membranas, producción de enzimas, respiración celular, inducción génica, etc.) (Schieber y Chandel, 2014).

¹ Se define radical libre como aquella *especie química independiente y muy reactiva que presenta uno o más electrones desapareados en su orbital más externo de valencia*, lo cual la hace altamente reactiva, presentando de este modo una inestabilidad energética y una vida media corta (Jones, 2008). Se generan en múltiples reacciones redox, y tienden a estabilizarse reaccionando rápidamente su electrón desapareado con otro átomo de una molécula adyacente mediante reacciones redox. Participan en numerosos procesos biológicos del metabolismo celular (Fang y cols., 2002).

Un exceso de RL (moléculas o porciones de ellas, que presentan al menos un electrón desapareado en su orbital más externo y son extraordinariamente inestables y reactivos) rompe el equilibrio produciendo el llamado estrés oxidativo. El término *estrés oxidativo* (Fig 1.1.) se refiere a la situación de desequilibrio entre la generación de especies reactivas (radicales libres y otras especies reactivas principalmente de oxígeno y nitrógeno) y la capacidad de los sistemas de defensa antioxidante del organismo, a favor de los prooxidantes (Mayne, 2003). Los RL se producen durante las reacciones metabólicas, mientras las células del organismo transforman los alimentos en energía especialmente en situaciones de hiperoxia, ejercicio intenso e isquemia y también por exposición a determinados agentes externos como las radiaciones ionizantes o luz ultravioleta, contaminación ambiental, el tabaco, etc. (Rahal, 2014).

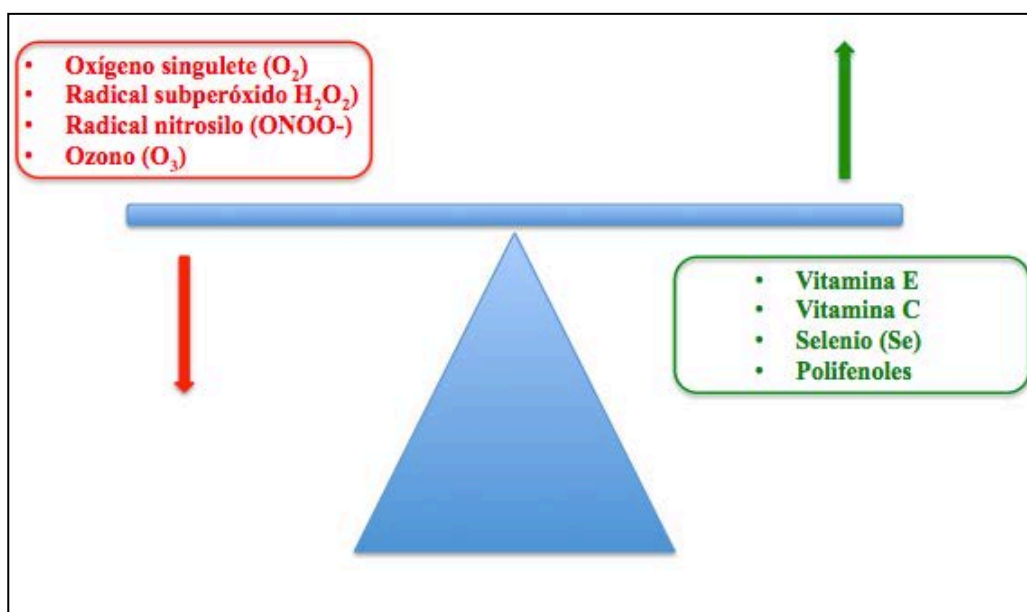


Figura 1.1. Concepto de estrés oxidativo (Girbes, 2014)

De los RL inorgánicos los más importantes son el oxígeno molecular O_2 , el radical anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (HO^-) y su precursor inmediato el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). De los secundarios u orgánicos, el radical peróxido (ROO^-), el hidroperóxido orgánico (ROOH) y los lípidos peroxidados (Poljsak, 2011; Halliwell, 2007). Todo ello forma parte de los denominados RL de oxígeno. En el otro lado de la balanza –que debe mantenerse en equilibrio– están los antioxidantes, sustancias que inhiben o retardan la oxidación de sustratos susceptibles a las especies reactivas del oxígeno y de ciertas especies oxidantes, independientemente de su mecanismo.

A nivel celular se encuentran sistemas antioxidantes no enzimáticos y enzimáticos capaces de metabolizar los RL generados en los procesos redox celulares: la catalasa (CAT) de los peroxisomas, la glutatión peroxidasa (GPx) y la superóxido dismutasa (SOD). Los llamados captadores de RL (*radical scavengers*) son especies químicas cuya posibilidad antioxidante reside en su capacidad para destruir directamente los RL (el glutatión, la vitamina C o ácido ascórbico, la vitamina E o alfa tocoferol y los compuestos polifenólicos son los principales). Las proteasas celulares son las encargadas de la eliminación de las proteínas alteradas oxidativamente, que son a su vez fuente generadora de más RLO y finalmente los llamados antioxidantes terciarios se encargan de reparar las biomoléculas dañadas por los RLO (Carocho y Ferreira, 2013).

1.1.1. ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO (EROs)

Las especies reactivas de oxígeno son moléculas derivadas del oxígeno molecular y que se producen en las células aerobias por reacciones redox. Este término incluye **radicales libres** y **especies no radicalarias** que son oxidantes o se convierten fácilmente en radicales libres, como por ejemplo ONOO⁻, ¹O₂ o H₂O₂ (Halliwell y Whiteman, 2004). Estas últimas por sí mismas no son reactivas, pero en presencia de metales de transición, como hierro o cobre, u otros radicales, generan radicales libres altamente reactivos, a través de distintos mecanismos de señalización celular (Valko y cols., 2006).

En condiciones fisiológicas los EROs se encuentran presentes a bajas concentraciones sin causar daño oxidativo en el organismo y manteniendo el estado redox, gracias a los mecanismos de defensa antioxidantes naturales celulares (las enzimas antioxidantes, entre ellos). Presentan un importante papel como elementos de regulación, como segundos mensajeros actuando en cascadas de señalización en numerosos tipos de comunicación y señalización intracelular, en la transducción de señales, expresión de genes, en proliferación y diferenciación celular, ayudando así a mantener la homeostasis a nivel celular, la síntesis de ADN, las modificaciones proteicas, la activación enzimática o la apoptosis. Sin embargo, a altas concentraciones algunas especies pueden interaccionar con macromoléculas biológicas generando reacciones en cadena por desequilibrio redox que pueden causar la muerte celular. Este estado permanente de estrés oxidativo ha sido relacionado con diversas enfermedades (Ceriello y cols., 2004; Valko y cols., 2006).

1.1.2. FUENTES DE RADICALES LIBRES

Fuentes endógenas: La formación de las RLOs a nivel celular ocurre por dos vías, enzimática y no enzimática. En las reacciones enzimáticas se incluyen la cadena de respiración y el sistema del citocromo P₄₅₀; entre las reacciones no enzimáticas se encuentran reacciones de oxígeno con los compuestos orgánicos y el proceso de respiración aeróbico a nivel mitocondrial (Pham-Huy y cols., 2008). Las reacciones de oxidación-reducción (redox) implican la transferencia de electrones entre dos compuestos y son reacciones comunes y vitales para algunas de las funciones biológicas básicas como respuesta al estrés, desarrollo, fotosíntesis y respiración (Zhang y cols., 2016).

Las mitocondrias son los orgánulos más importantes y esenciales para la producción y conservación de energía a nivel celular: a partir de glucosa y O₂, generan ATP mediante la fosforilación oxidativa (Rego y Oliveira, 2003). En la cadena respiratoria mitocondriales hay 4 complejos; complejo I a IV incluyendo NADH deshidrogenasa, succinato deshidrogenasa, coenzima Q-citocromo C reductasa y citocromo C oxidasa, respectivamente. Los complejos mitocondriales I y III son los principales productores de radicales libres mitocondriales conocidos, durante la respiración mitocondrial la cadena respiratoria se considera como la primera fuente del mayor parte de los radicales libres en las células (Du y Yan, 2010).

El O₂ se reduce en 4 etapas, en cada una de las cuales se transfiere un electrón. Sin embargo, el transporte electrónico mitocondrial es imperfecto y la reducción monoelectrónica del oxígeno genera O₂⁻. La dismutación espontánea y enzimática del O₂⁻ da lugar a la formación de H₂O₂, y tanto el O₂⁻ como el H₂O₂, pueden generar radicales hidroxilo a través de reacciones de Fenton catalizadas por metales de transición. De este modo, se estima que en condiciones fisiológicas normales, entre el 1 y el 3% del oxígeno consumido por el organismo no llega a formar agua y acaba generando radicales libres y EROs.

Fuentes exógenas: el humo de tabaco, la contaminación ambiental, los contaminantes ambientales, la radiación ultravioleta, el ozono, la metabolización de algunos fármacos o la actividad física intensa pueden contribuir a la producción de ROS, además de la dieta prooxidante o deficiente en antioxidantes (Beckman y Ames 1998; Carnevali y cols., 2003; Kregel y Zhang, 2007).

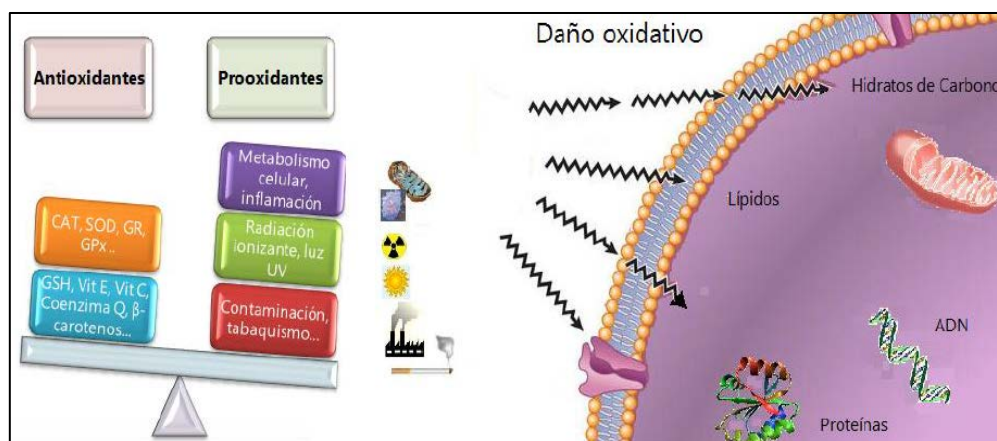


Figura 1.2. El desequilibrio entre antioxidantes y prooxidantes, a favor de estos últimos produce un daño oxidativo en las células que afecta al material genético celular, lípidos, proteínas, así como a los hidratos de carbono.

1.1.3. TIPOS DE EROs

Las principales EROs se recogen en la tabla 1.1.:

	Radical		No Radical
$\cdot\text{OH}$	Hidroxilo	H_2O_2	Peróxido de hidrógeno
$\text{O}_2\cdot$	Superóxido	$^1\text{O}_2$	Oxígeno singlete
$\text{ROO}\cdot$	Peroxilo	ROOH	Peróxidos orgánicos
$\text{NO}\cdot$	Óxido Nítrico	O_3	Ozono
$\text{HOO}\cdot$	Hidroperoxilo	HClO	Ácido hipocloroso
$\text{HO}_2\cdot$	Dióxido de hidrógeno	ONOO^-	Peroxinitrito

Tabla 1.1. Nomenclatura de las principales especies reactivas de oxígeno (EROs), radical y no radical.

- **Radical superóxido (O_2^-)**

Es el radical más abundante en el organismo a pH fisiológico. El anión superóxido es una especie poco reactiva, pero al generarse en gran cantidad inicia reacciones que producen otras ROS más reactivas y dañinas, como el radical hidroxilo. Es producto de diversas reacciones catalizadas por el oxígeno, al transferirse al mismo un electrón. El anión superóxido se dismuta rápidamente mediante la enzima superóxido dismutasa (SOD) produciendo peróxido de hidrógeno (Halliwell, 1991; Fujita y cols., 2009):



- **Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)**

No es un radical libre ya que sus electrones se encuentran apareados. Sin embargo, participa en numerosas reacciones que originan radicales libres. Las células consumen oxígeno constantemente y generan a su vez peróxidos, siendo el más abundante el peróxido de hidrógeno. Debido a su ausencia de carga difunde fácilmente a través de las membranas biológicas, tanto en medios hidrófobos como en medios acuosos, originando reacciones de oxidación y daño oxidativo celular, dando lugar a la muerte celular. Por tanto, se produce durante el metabolismo aeróbico celular por la reducción del O₂, así como por la acción de la enzima superóxido dismutasa en la transformación del anión superóxido. Se descompone fácilmente produciendo el radical hidroxilo, las EROS más reactiva (Deshpande y cols., 2002).

El déficit de glutatión reducido puede disminuir el aclaramiento del H₂O₂ y promover la formación de radicales. El H₂O₂ es hidrolizado por la enzima catalasa y por la glutatión peroxidasa, principalmente en los astrocitos; además, también puede reaccionar con el anión superóxido originando el radical hidroxilo (Haber y Weiss, 1934):



- **Radical hidroxilo (•OH)**

Es considerada la especie química derivada del oxígeno más tóxica y reactiva, a pesar de su corta vida media y de que no difunde. Se puede originar mediante la lisis de H₂O o H₂O₂ a través de radiaciones ionizantes, la reacción de Haber-Weiss indicada anteriormente o por reducción del H₂O₂ catalizada por iones metálicos (Cu⁺, Fe²⁺) a partir de H₂O₂ (Foresti y Motterlini, 1999). El proceso más importante es la reacción de Fenton en la que intervienen iones de metales de transición como el hierro (Fenton, 1894):



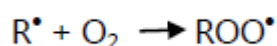
Por tanto, los metales de transición juegan un papel muy importante en el daño oxidativo producido a nivel celular, ya que, aunque ni el radical superóxido ni el peróxido de hidrógeno producen daño “*per se*”, en presencia de los metales de transición generan el radical hidroxilo, que sí tiene la reactividad suficiente para producir daños en las células y a sus macromoléculas (Halliwell, 1997; Nguyen y cols., 2008).

- **Oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$)**

El $^1\text{O}_2$ no es realmente un radical libre, pero al encontrarse en forma excitada reacciona muy fácilmente con otras moléculas y es una importante molécula de señalización intracelular. Se forma al reaccionar en las moléculas de oxígeno o mediante reacciones de oxidación o enzimáticas. Puede iniciar la reacción que da lugar a la peroxidación lipídica a partir de un ácido graso por su capacidad de sustraer H^+ (Halliwell y Gutteridge, 1990).

- **Radical peroxilo ($\text{ROO}\cdot$)**

Es uno de los radicales más abundantes formado a partir de hidroperóxidos orgánicos (ROOH) por pérdida de H ; posee una vida media relativamente larga. Se origina por la adición del oxígeno a un radical hidrocarbonado (Kanner y cols., 1987).

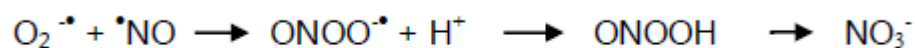


- **Óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$)**

Es un gas hidrosoluble y lipofílica, con una importante función en los sistemas biológicos al regular el flujo sanguíneo, como neurotransmisor, así como por su importante acción antiinflamatoria e inmunitaria. Se sintetiza a partir de la arginina mediante una reacción enzimática catalizada por el óxido nítrico sintasa. Sin embargo, en exceso el óxido nítrico es citotóxico (Moncada y Palmer, 1991; Halliwell y Gutteridge, 1997).

- **Anión peroxinitrito (ONOO^-)**

No es un radical, pero se trata de un potente intermediario oxidante altamente reactivo de grupos tioles, de la guanosina, fragmentando el ADN. Puede degradar los hidratos de carbono e iniciar la peroxidación lipídica. Se puede generar a partir del óxido nítrico al reaccionar con el anión superóxido (Miles y cols., 1996):



- **Dióxido de nitrógeno ($\text{NO}_2\cdot$)**

Es un radical libre producido principalmente mediante la oxidación del $\text{NO}\cdot$ atmosférico. Inicia de manera eficaz la peroxidación lipídica (Postlethwait y cols., 1995).

1.1.4. DAÑO OXIDATIVO A LAS BIOMOLÉCULAS

Si bien el oxígeno es una molécula vital para los organismos vivos, en el metabolismo aeróbico se originan especies reactivas de oxígeno que son responsables de modificaciones importantes en las principales macromoléculas biológicas, como son los ácidos nucleicos, los lípidos, las proteínas y los hidratos de carbono (Willcox y cols., 2004; Dalle-Donne y cols., 2006). Las EROs pueden reaccionar con estas biomoléculas, provocando daños acumulativos en las mismas e incluso la pérdida de su función. De este modo, se pone en riesgo la homeostasis, pudiendo incluso provocar la muerte de las células. La importancia de este ataque oxidativo depende de la intensidad del daño producido por las ROS y de la capacidad del organismo de reparar ese daño (Floyd y Hensley, 2003).

- **Daño oxidativo a ácidos nucleicos**

El daño oxidativo al material genético es el más importante a nivel celular al producirse daños en la información genética necesaria también para el resto de macromoléculas, además de ser el más difícil de corregir. Los ácidos nucleicos, en condiciones de estrés oxidativo, son susceptibles de sufrir modificaciones provocando la rotura de las cadenas de ADN y la oxidación de sus bases nitrogenadas. De esta manera se forman radicales peroxilo en presencia de especies reactivas de oxígeno por adición del mismo a las bases o los restos glicosídicos del ADN y se producen diversas mutaciones implicadas en distintas enfermedades o al cáncer (Beckman y Ames, 1998). El HO^{\bullet} y el H^{\bullet} son las principales EROs que reaccionan con las bases nitrogenadas del ADN, al oxidar tanto las bases púricas como las pirimidínicas y restos de desoxirribosa (Halliwell y Gutteridge, 1999). También se pueden formar puentes cruzados ADN-proteína (Cooke y cols., 2003; Trachootham y cols., 2008) al reaccionar los radicales NO^{\bullet} y ONOO^{\bullet} con las bases nitrogenadas del ADN. Cuando el H_2O_2 llega al núcleo, se produce la reacción de Fenton al reaccionar con el hierro y generar el radical hidroxilo (Valko y cols., 2004).

El ADN mitocondrial es más susceptible al daño oxidativo que el ADN del núcleo, tanto por su cercanía a la cadena transportadora de electrones como por su menor capacidad de reparación contra el daño oxidativo. Cuando el daño oxidativo es moderado, el ADN puede activar mecanismos de reparación. Sin embargo, si el daño oxidativo es grande, las modificaciones oxidativas pueden producir cambios funcionales permanentes del material genético, por mutaciones en su ADN (Kregel y Zhang, 2007; Rao, 2009).

- **Daño oxidativo a lípidos**

Los lípidos forman parte de los constituyentes esenciales de las membranas biológicas, junto con las proteínas. Los lípidos de membrana son moléculas normalmente anfipáticas, con regiones hidrocarbonadas hidrofóbicas, que presentan poca afinidad por el agua y regiones polares hidrofílicas. En las membranas, los lípidos más abundantes son los fosfolípidos, que regulan su fluidez y actúan como reserva metabólica. Estas membranas lipídicas de las células son muy susceptibles a la oxidación. Durante un ataque oxidativo, sus lípidos reaccionan con especies reactivas (OH, HOO, $^1\text{O}_2$) en una reacción en cadena llamada peroxidación lipídica (Trachootham y cols., 2008; Niki y cols., 2005; Niki, 2012). Las especies reactivas son capaces de extraer un átomo de hidrógeno de un ácido graso saturado generando un radical lipídico ($\text{R}\cdot$), que reacciona con O_2 originando un radical peroxilo ($\text{ROO}\cdot$). Esta descomposición puede ser acelerada por la exposición a radiación ultravioleta o por la presencia de iones metálicos como el hierro y el cobre, a través de la reacción de Fenton (Lee y cols., 2004). Estos sucesos provocan una desestructuración física con una pérdida de la fluidez de las membranas celulares, así como de sus funciones secretoras y los gradientes iónicos transmembrana, esenciales para el correcto funcionamiento de las membranas biológicas. Se genera una mayor permeabilidad celular y porosidad de la membrana así como una inactivación de sus receptores.

Dentro de las biomoléculas lipídicas, los ácidos grasos poliinsaturados son los más susceptibles a este ataque (Cross y cols., 1987). La peroxidación lipídica por tanto, altera las membranas biológicas mediante un proceso autocatalítico producido por EROs, en el que los ácidos grasos poliinsaturados forman hidroperóxidos lipídicos, gases hidrocarbonados y aldehídos tóxicos como el malondialdehído (MDA) que es un indicador del daño oxidativo a lípidos. Como consecuencia se aumenta la viscosidad de la membrana, de modo que disminuye su resistencia eléctrica (Dalle-Donne y cols., 2006).

- **Daño oxidativo a proteínas**

Las proteínas constituyen uno de los principales componentes de los sistemas biológicos. Presentan un importante papel en gran variedad de funciones celulares, como por ejemplo: mantienen la estructura de las membranas y del citoesqueleto, regulan la señalización y la catálisis de las reacciones metabólicas en sistemas de transporte celular de metabolitos, interactúan con receptores, y controlan el crecimiento y desarrollo del

organismo. Sin embargo, son susceptibles al ataque por especies reactivas, especialmente por el radical hidroxilo, debido a la presencia de cantidades significativas de aminoácidos sulfurados o aromáticos en su estructura (Frei, 1994).

La modificación oxidativa y degradación de las proteínas debido al ataque por especies reactivas de oxígeno origina alteraciones del funcionamiento biológico normal de la célula, produciendo daños oxidativos irreversibles en la regulación genética y metabólica, la transmisión de señales y la actividad enzimática (Dalle-Donne y cols., 2006). Esto puede conducir a la desnaturalización de la proteína y por tanto, a una pérdida o modificación de su función biológica mediante reacciones en cadena. Estos efectos se asocian con la aparición y desarrollo de diversas enfermedades degenerativas relacionadas con el envejecimiento (Devasagayam y cols., 2004, Dalle- Donne y cols., 2006; Belonogov y cols., 2009).

- **Daño oxidativo a hidratos de carbono**

Los hidratos de carbono se caracterizan por reaccionar fácilmente con los radicales hidroxilo, aunque en menor proporción que otras moléculas. Numerosos estudios demuestran que algunos polisacáridos actúan como agentes protectores frente al daño oxidativo producido en las células. De esta manera se considera que de forma general los monosacáridos y los disacáridos son resistentes a la acción de los radicales libres de oxígeno, mientras que los polisacáridos son despolimerizados por los mismos, produciendo pérdida de su función estructural (Monboisse y cols., 1988). Existe de este modo, una relación directa entre las EROs y el estrés oxidativo en enfermedades como la diabetes mellitus.

1.1.5. SISTEMAS PROTECTORES FRENTE AL DAÑO OXIDATIVO

En condiciones fisiológicas, los organismos mantienen un equilibrio entre la generación de EROs y su eliminación (prooxidante –antioxidante) mediante mecanismos de defensa antioxidantes celulares efectivos para contrarrestar la acción de las especies oxidantes (Thomas, 2000; Devasagayam y cols., 2004; Valko y cols., 2007). Para la defensa del organismo las células han tenido que evolucionar y desarrollar mecanismos para sobrevivir al estrés oxidativo, manteniendo el nivel de antioxidantes.

Los **antioxidantes**, enzimáticos y no enzimáticos, son sustancias que a bajas concentraciones (comparadas con las del sustrato oxidable) son capaces de retrasar o prevenir significativamente la oxidación de sustratos oxidables, protegiendo así al organismo frente al daño producido por el estrés oxidativo y reparando los daños producidos **Tabla 2** (Gutteridge y Halliwell, 1989).

ANTIOXIDANTES
<ul style="list-style-type: none"> • Prevenir la formación de EROs • Aumentar la resistencia al ataque de EROs • Eliminar EROs • Reparar el daño causado por EROs • Convierten los metabolitos reactivos en moléculas menos reactivas

Tabla 2. Principales funciones de los antioxidantes

El balance entre los agentes prooxidantes y antioxidantes determinará finalmente el estado redox, manteniendo un estado intracelular reducido o no dependiendo del resultado de dicho balance.

1.1.5.1. Sistemas antioxidantes enzimáticos

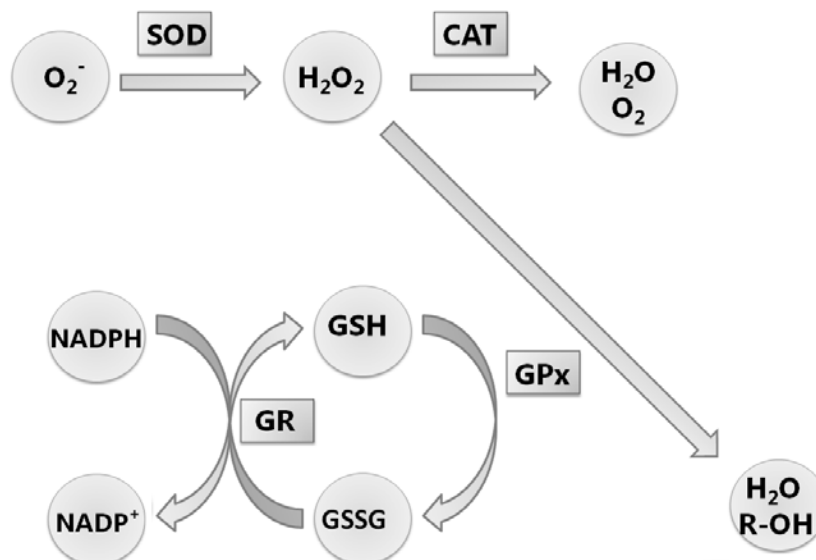
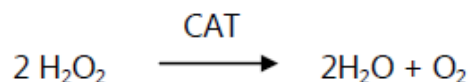


Figura 1.3. Sistemas antioxidantes enzimáticos. Catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx) son enzimas primarias de acción directa sobre ROS. Mientras glutatión reductasa (GR) es una enzima secundaria que produce GSH y NADPH, cofactores para el buen funcionamiento de las enzimas primarias.

La actividad antioxidante de las enzimas frente a los altos niveles de ROS se regula mediante mecanismos de defensa intracelulares. Estas enzimas (**Figura 4**) son las encargadas de neutralizar y disminuir los niveles intracelulares de ROS en el organismo transformándolas en moléculas menos dañinas, y de reparar el daño producido por las mismas, manteniendo el estado rédox y protegiendo al organismo frente a los agentes oxidantes (Halliwell, 2001; Pamplona y Constantini, 2011). Sin embargo, estas enzimas reparadoras no pueden eliminar todas las lesiones y por tanto éstas se van acumulando y aumentando según la edad avanza. Dentro de los sistemas de defensa enzimática destacan las siguientes:

- **Enzima catalasa (CAT)**

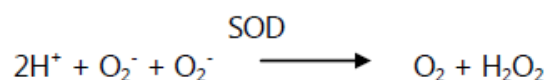
La catalasa es una enzima tetramérica presente en todos los organismos aerobios, que se localiza principalmente en el citoplasma, mitocondria, peroxisomas, así como en otros orgánulos celulares. Presenta cuatro subunidades proteicas de 60 kDa cada una, las cuales contiene un grupo hemo (ferro [Fe (III)]-protoporfirina) unido a su centro activo.



Es una enzima muy eficaz que protege a las células frente a situaciones de estrés oxidativo. Su función es la eliminación de hidroperóxidos como el peróxido de hidrógeno. No se satura por H_2O_2 y lo descompone en agua y una molécula de oxígeno (Aebi, 1984). Esta enzima puede ser inhibida por azida o cianuro (Chance y cols., 1979).

- **Enzima superóxido dismutasa (SOD)**

La enzima superóxido dismutasa es la primera línea de defensa del organismo frente al daño oxidativo originado por los radicales libres, especialmente contra el radical superóxido. Está formada por dos subunidades proteicas con un centro activo. Constituye el mayor agente productor de H_2O_2 a partir del O_2^- , catalizando la conversión de este anión a H_2O_2 y O_2 .

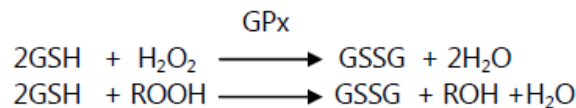


Se han publicado numerosos trabajos que demuestran la importancia de esta enzima como antioxidante (McCord, 2002; Fukai y cols., 2002; Zelko y cols., 2002; Fattman y cols., 2003).

○ **Enzima glutatión peroxidasa (GPx)**

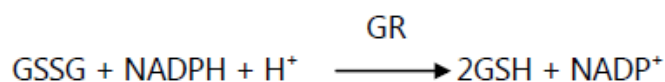
Esta enzima es considerada como el principal sistema de defensa antioxidante a bajos niveles de estrés oxidativo. Está formada por cuatro subunidades idénticas, cada una con un residuo de selenio-cisteína esencial para su actividad enzimática. Se localiza en el citosol y en la mitocondria.

Ejerce un papel importante en la detoxificación de hidroperóxidos como el peróxido de hidrógeno y los lipoperóxidos que se generan en las células (Chance y cols., 1979). Es la principal enzima antioxidante para la detoxificación de H₂O₂, ya que presenta mayor afinidad que CAT. Reacciona con los tejidos y otros hidroperóxidos orgánicos, catalizando su reducción mediante GSH, oxidándolo a GSSG (Halliwell y Gutteridge, 2007). De este modo protege a las células del daño producido por estrés oxidativo.



○ **Enzima glutatión reductasa (GR)**

Es una enzima homodimérica que presenta un importante papel en el metabolismo del GSH. Está formada por dos subunidades proteicas con flavina en su centro activo. Se encuentra predominantemente en el citosol, aunque presenta también cierta actividad en mitocondria. Protege a la célula contra los radicales libres y peróxidos, para lo que cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) mediante la nicotina adenina dinucleótido fosfato (NADPH), procedente de la ruta metabólica de la vía oxidativa de las pentosas fosfato (Powers y Lennon, 1999). Reduce los hidroperóxidos orgánicos tipo ROOH- y mantiene, junto con NADPH, el nivel de GSH elevado (Tandogan y Ulusu, 2006):



○ **Enzima hemo-oxigenasa (HO)**

La HO fue descubierta en 1968 cuando Tenhunen y colaboradores describieron el mecanismo de la reacción para el catabolismo del grupo hemo, siendo esta enzima la que cataliza la degradación oxidativa del mismo (Morse y Choi, 2005). Sin embargo, el sistema hemo-oxigenasa-biliverdina-reductasa (HO-BVR) se ha descrito recientemente como antioxidante. Existen diversas isoformas de HO, producto de distintos genes:

- HO-1 (32 kDa) es inducible por diversos estímulos de estrés celular como metales pesados, citoquinas, endotoxinas, shock térmico, grupo hemo, peróxido de hidrógeno, hiperoxia, e hipoxia. Además, es una enzima que ejerce funciones citoprotectoras previniendo el daño oxidativo (Minamino y cols., 2001; Shibahara y cols., 2003; Kaptureczak y cols., 2004; Kim y cols., 2004).
- HO-2 está expresada en forma constitutiva en la mayoría de los tejidos: cerebro, hígado, bazo y testículos (Maines, 2005).
- HO-3 es una isoforma constitutiva. Comparte un 90% de homología con HO-2 y fue detectada únicamente en cerebro de rata (Elbirt y Bonkovsky, 1999).

La HO-1 es una enzima microsomal primaria de acción indirecta, que cataliza la degradación del grupo hemo, formando hierro (Fe^{2+}), monóxido de carbono (CO) y biliverdina que posteriormente se convierte por la biliverdina reductasa (BVR) en bilirrubina, un potente antioxidante intracelular relacionado con el balance redox celular (Deshane y cols., 2005; Kim y cols., 2006; Abraham y Kappas, 2008) (**Figura. 1.4.**). La reacción requiere de O_2 y usa la enzima NADPH-citocromo P_{450} reductasa para transportar electrones desde el NADPH al complejo (Kikuchi y cols., 2005). La expresión de HO-1, en respuesta al grupo hemo o a estímulos que se producen en situaciones de estrés, ha estado asociada con un efecto citoprotector en varios modelos *in vitro* e *in vivo* (Ryter y cols., 2002) y es probable que represente un instrumento intermediario para la citoprotección activando otros procesos adaptativos (Ryter y cols., 2004; Farombi y Surh, 2006). Esto es debido a la capacidad de HO-1 de degradar el grupo hemo evitando así los efectos prooxidantes del mismo, protegiendo a las células frente a un aumento de EROs, y por tanto, contra el daño oxidativo (Maines y cols., 2001; Baranano y cols., 2002; Juang, 2004; Nie y cols., 2006; Wang y cols., 2007). Existen estudios en los que se observa que los

astrocitos inducen la expresión de esta enzima (Min y cols., 2006). Asimismo, se ha estudiado el efecto neuroprotector de la HO-1 frente a H₂O₂ (Kaizaki y cols., 2006).

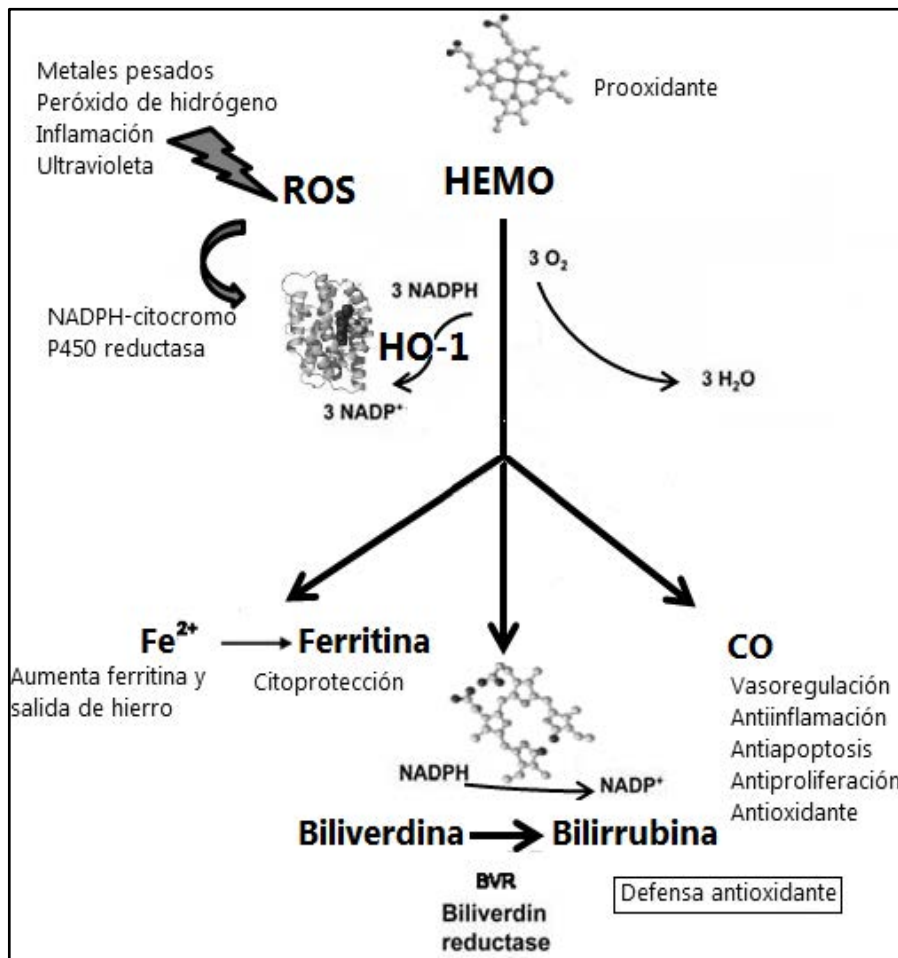


Figura 1.4. Interacción de la HO-1, en el sistema para la detoxificación de especies reactivas de oxígeno (Modificado de Clarck y Sharp, 2006).

1.1.5.2. Sistemas antioxidantes no enzimáticos

Los sistemas de defensa antioxidante no enzimáticos están constituidos por moléculas de bajo peso molecular con capacidad antioxidante. Existen dos tipos, los producidos endógenamente por el organismo y los aportados exógenamente (Tabla 1.3.).

ANTIOXODANTES NO ENZIMATICOS	
ENDOGENOS	EXOGENOS
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Glutación ▪ Coenzima Q 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Vitaminas: C y E ▪ Carotenoides ▪ Polifenoles

Tabla 1.3. Sistemas antioxidantes no enzimáticos.

Constituyen la primera línea de defensa frente a EROs, además de complementar la actividad de las enzimas antioxidantes. Son sistemas captadores de especies reactivas o captadoras, que enlentecen las reacciones de oxidación en cadena o atrapan a las EROs transformándolos en sustancias menos agresivas y reparando los daños producidos. Presenta, por tanto, una función protectora frente a las ROS (Wang y cols., 2006).

▪ **Sistema Glutación**

El glutatión (L- γ -glutamil-L-cisteinglicina) es el principal tiol no proteico celular y es considerado el principal antioxidante no enzimático endógeno de la célula (Masella y cols., 2005). Este tripéptido hidrosoluble está formado por los aminoácidos: ácido glutámico, glicina y cisteína, a través de los cuales se sintetiza en el citosol.

Presenta una importante función metabólica en las células, relacionada con su protección antioxidante frente al ataque oxidativo, debida a la capacidad reductora del grupo tiol de su cisteína, que interviene en reacciones redox, intercambiando electrones a través del azufre de la cisteína. El glutatión libre está presente principalmente en su forma reducida (GSH), la cual pasa a forma oxidada (GSSG) en situaciones de estrés oxidativo (**Figura 1.5**). Según su estado de óxido-reducción el glutatión se encuentra como:

- glutatión reducido (GSH), protege a la célula contra los radicales libres, gracias al grupo activo sulfhidrilo del residuo de cisteína, que actúa como donador de protones. Representa la primera barrera de protección frente al estrés oxidativo y regula la síntesis de proteínas y ADN. Presenta una función antioxidante importante al eliminar los peróxidos orgánicos y el peróxido de hidrógeno en reacción catalizada por GPx. Los cerebros deficientes de glutatión son más susceptibles al daño producido por la liberación de EROs (Sies, 1986; Takebe y cols., 2002).
- glutatión oxidado (GSSG) se produce cuando dos moléculas de GSH se oxidan, cediendo un electrón cada una y uniéndose por un puente disulfuro entre cisteínas.

Aunque la mitocondria es el sitio principal de producción de EROs, el GSH no puede ser sintetizado en este orgánulo. Se transporta desde el citosol, donde tiene lugar la síntesis, para minimizar los daños por oxidación, y mantener la integridad de la membrana. En condiciones de estrés oxidativo, el GSH capta EROs y se oxida a GSSG por una reacción catalizada por la GPx (Sies, 1986; Bains y Shaw, 1997; Morris y cols., 2008).

El GSSG formado es inmediatamente reducido a su vez a GSH por la GR con la ayuda del cofactor Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (NADPH), que es suministrado por la glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa. De esta forma, la concentración de GSSG a nivel celular se mantiene en niveles bajos (Schafer y Buettner, 2001; Olivero, 2011).

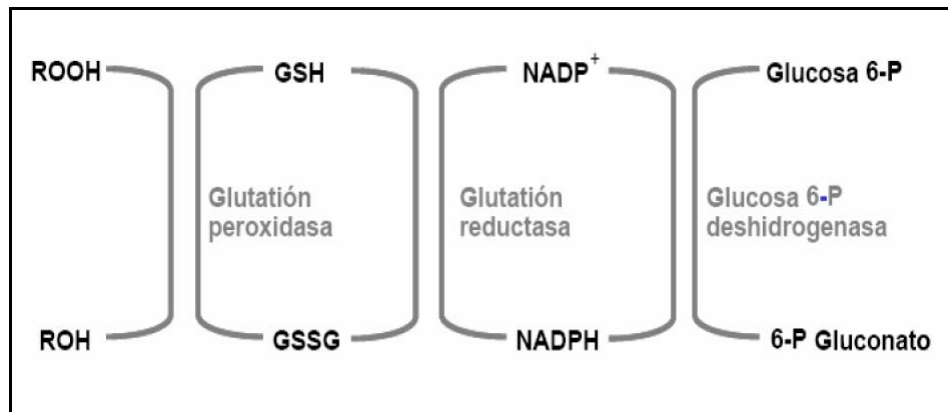


Figura 1.5. Síntesis de glutatión reducido y oxidado.

- **Bilirrubina**

Es un tetrapirrol lineal (unido a la albúmina) y producto final de la degradación del grupo hemo. Es un antioxidante liposoluble que capta los radicales peroxilo, inhibiendo la lipoperoxidación. Se oxida a biliverdina al captar radicales hidroperóxido que finalmente se reduce para dar la bilirrubina (Clark y Sharp, 2006; Abraham y Kappas, 2008).

- **Coenzima Q (ubiquinol)**

La coenzima Q es la forma predominante de ubiquinona, lípido de síntesis endógena en la cadena respiratoria mitocondrial. La forma reducida de la ubiquinona es el ubiquinol, que es un importante antioxidante intracelular, eficaz frente a EROs que también participa en la recuperación de la vitamina E.

- **Vitamina A**

También conocida como retinol es derivada del β -caroteno, con gran capacidad para captar EROs. Principalmente actúa a nivel de las membranas lipídicas (Biesalski y cols., 1996).

- **Ácido úrico**

Es el producto final del metabolismo de las purinas. La dieta es una importante fuente de ácido úrico, ya que la ingestión de purinas hace que éstas sean transformadas por la xantina oxidoreductasa en la mucosa intestinal a ácido úrico. Este actúa como un antioxidante y como quelante de metales de transición al captar el oxígeno singlete y los EROs (Howell y Wyngaarden, 1960). Por su unión al hierro o cobre, puede inhibir las reacciones de oxidación catalizadas por estos metales. Elimina eficazmente los derivados reactivos del oxígeno como el superóxido y el radical hidroxilo e intermediarios oxigenados del grupo hemo, ejerciendo una protección antioxidante (Nieto y cols., 2000).

- **Vitamina E (α -tocoferol)**

Es el principal antioxidante en membranas biológicas debido a su alta liposolubilidad, siendo su actividad muy significativa a nivel del SNC (Burton y cols., 1990). Se encuentra en las membranas celulares y en lipoproteínas plasmáticas protegiendo a los lípidos de la oxidación al unirse a los EROs y bloqueando la cadena de reacciones producidas en la peroxidación lipídica (Pryor, 2000). Además, capta radicales peróxido lipídicos produciendo hidroperóxidos lipídicos y radical tocoperóxido (Zadák y cols., 2009).

- **Vitamina C (ácido ascórbico)**

Este antioxidante hidrosoluble (Sies y cols., 2005) de bajo peso molecular se obtiene directamente de la dieta y es uno de los antioxidantes naturales más importantes, más efectivos y menos tóxicos. Se encuentra presente tanto a nivel intracelular como extracelular. Actúa sobre el anión superóxido, peróxido de hidrógeno, oxígeno singlete y radical hidroxilo. Se encarga de la regeneración de los tocoferoles (Zadák y cols., 2009).

- **Carotenos**

Los carotenos son pigmentos naturales con elevada actividad antioxidante y gran capacidad para dar lugar a reacciones de eliminación de $^1\text{O}_2$ debido a sus dobles enlaces conjugados. Protegen a las membranas contra el daño oxidativo al bloquear la cadena de reacciones de peroxidación. El β -caroteno puede actuar sinérgicamente con α -tocoferol inhibiendo la peroxidación lipídica provocada por los radicales libres (Young y Lowe, 2001).

▪ **Polifenoles**

Los compuestos fenólicos o polifenoles provienen del metabolismo secundario de las plantas. Químicamente son compuestos que tienen al menos un anillo aromático al que está unido a uno o más grupos hidroxilo. Existe una gran variedad de compuestos fenólicos, y se clasifican en:

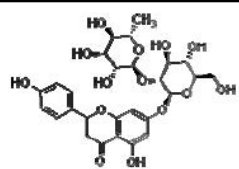
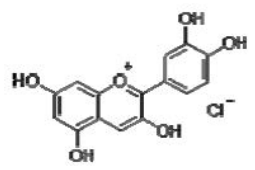
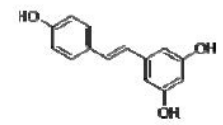
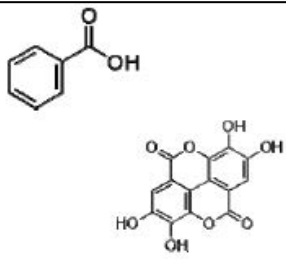
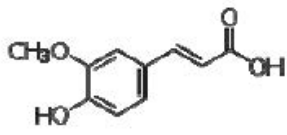
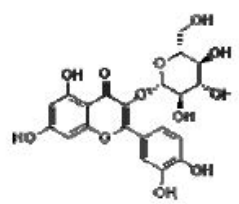
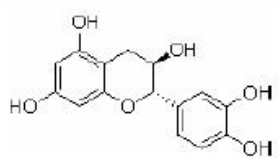
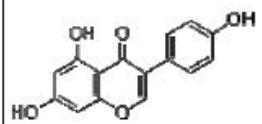
- flavonoideos, formados por dos anillos aromáticos unidos por un heterociclo oxigenado y que dependiendo del grado de hidrogenación y de la sustitución del heterociclo se clasifican en flavonoles, flavonas, isoflavonas, antocianos, proantocianidinas, flavanonas, etc. y se encuentran generalmente en forma de glicósidos.
- No flavonoideos, compuestos benzoicos y cinámicos, llamados comúnmente ácidos fenólicos, que contienen un anillo aromático con diferentes grupos funcionales, y que pueden estar formando ésteres con los ácidos orgánicos.

Otros compuestos de naturaleza polifenólica son estilbenos, taninos, ligninas y lignanos. Algunas de las propiedades de los productos de origen vegetal, como color, astringencia y aroma son debidas a la presencia de compuestos de este tipo.

Los flavonoides y los ácidos fenólicos son los que reciben mayor atención como agentes antioxidantes, debido fundamentalmente a su amplia presencia en un alto número de alimentos de gran consumo. La actividad antioxidante de los polifenoles se debe a su facilidad para reducir la producción de radicales libres, bien por inhibición de las enzimas que intervienen, bien por quelación con los metales de transición responsables de la generación de los radicales libres. Además, los flavonoides por su bajo potencial rédox, son capaces de reducir las especies de oxígeno reactivo (EROs), altamente oxidadas.

En general estos compuestos son antioxidantes multifuncionales y actúan por varios de los mecanismos mencionados. Los polifenoles de estructura flavónica, como flavonoles, flavonas, isoflavonas, antocianos, flavanonas, catequinas y proantocianidinas, son los antioxidantes más potentes presentes en los alimentos vegetales. Uno de los factores más importantes que determina la actividad antioxidante de los polifenoles es su grado de hidroxilación y la posición de los hidroxilos en la molécula. Los flavonoideos debido a su heterociclo oxigenado muestran mayor actividad que los no flavonoideos. A su vez la solubilidad y los efectos estéricos de cada molécula pueden verse afectados por el tipo de

estructura de dicha molécula, como es el caso de los derivados glicosilados y otros, lo que puede aumentar o disminuir la actividad antioxidante. Los compuestos flavonoideos se suelen encontrar en los vegetales en forma de glicósidos, pero la acción de enzimas o de algunos procesos puede liberar la correspondiente aglicona. La actividad de los ácidos fenólicos está también en función de los grupos hidroxilo del anillo aromático y de la unión de estos compuestos a ácidos orgánicos y/o a azúcares para formar ésteres.

FLAVANONAS	Naringenina Naringina Hesperetina Hesperidina Floridicina	
ANTOCIANIDINAS	Malvidina Cianidina Delfinidina Petunidina Glicósidos de antocianidinas	
ESTILVENOS	Resveratrol	
ÁCIDOS BENZOICOS	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico Ácido gálico Ácido protocatéquico Ácido vanílico Ácido siríngico Ácido elágico Ácido tánico Ácido gentísico	
ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS	Ácido clorogénico Ácido cafeico Ácido ferúlico Ácido sinápico Ácido <i>trans</i> -cinámico	
FLAVONOLES	Rutina Quercetina Miricetina Kaemferol Glicósidos de quercetina	
FLAVANOLES	Catequina Epicatequina Galocatequina Epicatequin galato Epigallocatequin galato Galocatequin galato	
ISOFLAVONAS	Daicina Genistina Daiceína Genisteína	

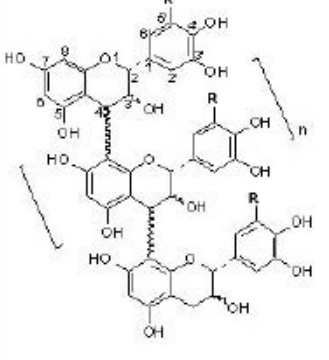
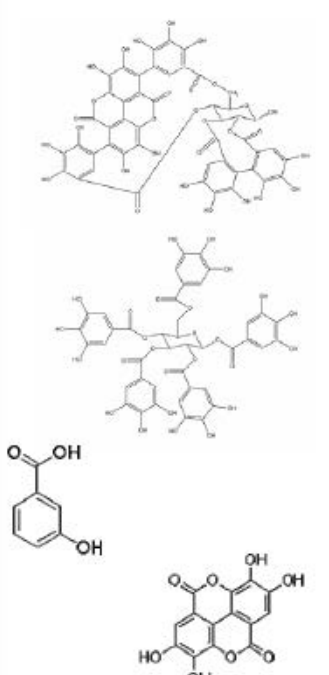
<p>PROANTOCIANIDINAS NO EXTRAÍBLES O TANINOS CONDENSADOS</p>	<p>Polímeros de catequina y epicatequina</p>	
<p>POLIFENOLES HIDROLIZABLES</p>	<p>Galotaninos Elagitaninos Ácidos benzoicos Ácidos hidroxicinámicos</p>	

Tabla 1.4. Estructura química de los principales compuestos fenólicos

En general, este tipo de antioxidantes vegetales han sido asociados con la disminución de la fotocarcinogénesis mediada por EROs (Afaq y Mukhtar, 2006). Durante los últimos años ha sido creciente el interés por el uso de los polifenoles, ya que por sus propiedades antioxidantes han demostrado efectos quimioprotectores contra el daño producido por RUV. Estudios han demostrado la eficacia de este tipo de compuestos en reducir la inflamación, el daño en el ADN y la inmunosupresión producida por la RUV. Los polifenoles presentan también una función de filtro solar ya que pueden absorber en forma completa el espectro de longitud de onda de la RUV-B y en forma parcial la de RUV-A. Dadas estas propiedades, se ha pensado que pueden ser usados como agentes de quimioprevención, entendiéndose este concepto como un medio para la protección contra el cáncer (Nichols y Katiyar, 2010).

1.1.6. ENFERMEDADES, PROCESOS DEGENERATIVOS Y ESTRÉS OXIDATIVO

Hay una multitud de enfermedades que se han relacionado con el estrés oxidativo y la generación de radicales libres al estar implicados en algunas de sus fases o secuencias bioquímicas. Por esto es aceptado entre la comunidad científica que el uso de diversas terapias antioxidantes, dietas y productos cosméticos ricos o enriquecidos con antioxidantes parecen prevenir o al menos disminuir el deterioro funcional orgánico originado por un exceso de estrés oxidativo (Csányi y Miller, 2014; Thanan y cols., 2014).

Son muchos los procesos patológicos implicados (Ballester, 1996), así como múltiples los descubrimientos llevados a cabo por diferentes grupos de investigación, por ello sólo es posible recoger unos breves comentarios de algunos de estos procesos patológicos más significativos:

1. *Envejecimiento*: es difícil diferenciar entre lo que son procesos propios del envejecimiento o procesos patológicos que se desarrollan preferentemente durante el envejecimiento. El envejecimiento y la muerte pueden ser el resultado de la activación de genes específicos en un momento determinado del ciclo celular (apoptosis). La teoría de los RLO del envejecimiento supone que éste resulta de la acumulación de lesiones orgánicas debidas a RLO (McCabe y cols., 1992). También se ha detectado una menor actividad proteolítica que en las células jóvenes, una disminución de las concentraciones de antioxidantes e inactivación de las enzimas detoxificadoras de RLO y una acumulación de proteínas oxidadas no degradadas (Rivett, 1986).

2. *Aterosclerosis*: la formación de la placa arteriosclerótica se inicia con la captación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) por los macrófagos que se transforman así en células espumosas. En determinadas condiciones oxidativas las lipoproteínas se fragmentan y se alteran determinados residuos de aminoácidos de la apoproteína de la LDL (Mitra y cols., 2011). Estas LDL oxidadas o productos liberados de ellas, van a tener mayor poder aterogénico ya que son captadas más rápidamente por los macrófagos, son citotóxicas para el endotelio y estimulan la producción de factores vasoactivos, de adhesión, trombóticos y de proliferación de células musculares lisas de la vasculatura, iniciando o extendiendo la lesión aterosclerótica (Galcerán y Martínez, 2000). Se ha demostrado una estrecha relación entre RLO y lipoproteínas de baja densidad (LDL) y se

sabe que su aumento tiene un conocido valor predictivo directo en la aparición de aterosclerosis. Muchos factores de riesgo de la aterosclerosis ampliamente identificados, como pueden ser la hipertensión, hipercolesterolemia y tabaquismo, pueden actuar induciendo un desequilibrio entre prooxidación y antioxidación (Salvayre y cols., 2016).

3. *Procesos cancerígenos*: el desarrollo tumoral es un proceso altamente complejo caracterizado por la presencia de necrosis celular del tejido sano, crecimiento incontrolado de las células cancerosas, neovascularización del área afectada para asegurar el aporte de oxígeno y nutrientes al tumor, entre otros muchos fenómenos. Se ha sugerido la implicación de los RL en diversos tipos de cáncer. Los RL estimulan el crecimiento de las células musculares lisas, lo que sugiere un papel del estrés oxidativo en la neovascularización tumoral o angiogénesis. Se han detectado niveles disminuidos de enzimas antioxidantes en diversos tipos de células tumorales así como alteraciones en el estado de los tioles celulares. La vitamina C y otros rastillos de los radicales tendrán efecto anticarcinógeno y será importante introducir estrategias antioxidantes para complementar tratamientos anticancerosos (Valko y cols., 2016).

4. *Catarata senil*: Los RL generados en el cristalino como consecuencia del constante bombardeo de radiaciones al que está sometido, producen entrecruzamiento, desnaturalización, degradación de sus proteínas y otros efectos, formándose gránulos microscópicos de composición compleja por aglomeración desordenada de moléculas, que crecen en tamaño y cantidad, produciendo inicialmente el efecto Tindall y finalmente la total opacificación del cristalino (Masuda y cols., 2017).

5. *Insuficiencia renal aguda (IRA) y crónica (IRC)*: el daño tubular por isquemia/reperfusión está al menos en parte, ocasionado por el aumento del estrés oxidativo de la IR. Los RLO producen la activación de la enzima xantinaoxidasa y de los neutrófilos, mecanismos importantes del daño renal por isquemia/reperfusión. El NO (óxido nítrico) parece aumentar en la fase isquémica y los RLO en la de reperfusión, por lo que el balance NO/RLO condicionará la magnitud del daño, así como los compuestos donantes de NO tendrán un potencial papel citoprotector frente a la acción de los RLO. En las nefritis por formación de inmunocomplejos, se estimula a los leucocitos polimorfonucleares y a los macrófagos a producir radicales aniones superóxido (Bryan, N. y Lancaster, 2017).

Los pacientes en hemodiálisis por IRC, tienen un aumento del estrés oxidativo, por una inadecuada eliminación de los RLO continuamente generados. El contacto entre la membrana dializadora y los componentes séricos y los polimorfonucleares, produce una activación del complemento, producción de citoquinas y de RLO. Esta situación lleva a la peroxidación lipídica, una desnaturalización de proteínas, daño de las células endoteliales, y a un continuo estrés oxidativo (Kisic y cols., 2016). En los pacientes trasplantados de riñón también hay evidencia de aumento de oxidación de LDL. Este hecho facilita la progresión de la aterosclerosis, contribuyendo al rechazo agudo y crónico vascular del órgano trasplantado (Beladi-Mousavi y cols., 2016). La nefrotoxicidad de algunos fármacos como la gentamicina (Vicente-Vicente y cols., 2016), daunorubicina y la ciclosporina (Raeisi y cols., 2017) y la de otros compuestos como el mercurio (Genchi y cols., 2017), parece mediado por un aumento del estrés oxidativo. De esta manera se ha demostrado que las profundas alteraciones en el sistema redox extracelular que ocurren en la IRC y en la hemodiálisis pueden ser una explicación adecuada para las complicaciones cardiovasculares de estos pacientes (Bennett y Ventura, 2017).

6. *Diabetes mellitus*: los altos niveles de glucosa característicos de la diabetes inducirían la glicosilación no enzimática de proteínas. Esta glicosilación no enzimática altera la estructura y la función de las proteínas. Es sabido que la autooxidación de azúcares genera especies de RLO. A concentraciones altas de glucosa, típicas de estados diabéticos, la producción de RLO se incrementa en presencia de metales de transición. Pero el aumento de estrés oxidativo descrito en los diabéticos, no está únicamente relacionado con la aceleración en la producción de RLO, sino también por la disminución de antioxidantes.

La vía del poliol es un posible mecanismo por el que la hiperglucemia puede alterar la función y la estructura de las células afectadas por las complicaciones diabéticas. La activación de la vía del poliol disminuiría el NADPH y los niveles de glutatión, aumentando de esta manera el estrés oxidativo (Lankin y Tikhaze, 2017).

7. *Hipertensión arterial (HTA)*: la HTA puede ser considerada como un conjunto de resultados sistémicos de las lesiones (vasculares, parenquimatosas, etc.) producidas por los RLO. En la HTA se ha encontrado aumento de la peroxidación de lípidos, tanto en plasma como en las membranas celulares, así como un aumento en la cantidad total de lípidos y una disminución de la capacidad antioxidante (Bennett y Ventura, 2017).

8. *Cirrosis, insuficiencia hepática y hepatopatía alcohólica*: Los mediadores vasoactivos han sido relacionados con distintas patologías que cursan con hipertensión portal aguda o hemorragia aguda por varices en periodos de descompensación hepática. Uno de estos mediadores puede ser el 8-iso-PGF2a, un producto de la peroxidación lipídica por los RLO, que ha demostrado elevar la presión portal en ratas cirróticas. Extrapolándolo a pacientes con cirrosis, la peroxidación lipídica secundaria al daño hepático por alcohol, sepsis u otras enfermedades hepáticas pueden producir un aumento agudo de la presión portal (a través del 8-iso-PGF2a y/u otros mediadores) tal y como se observa en el daño hepático agudo (Yang y cols., 2016). El daño hepático inducido por alcohol está relacionado, al menos en parte, a un estrés oxidativo causado por la producción de RLO y/o a un descenso de los antioxidantes (Muriel y Gordillo 2016).

9. *Otros*: desmielinización (Konat y Wiggins, 1985), distrofia muscular, artritis e inflamación (Rivett, 1986; Traband y Gay, 1992), colagenosis, dermatitis de contacto, displasia broncopulmonar, enfermedad de demencia senil, Alzheimer, enfermedad de Parkinson.

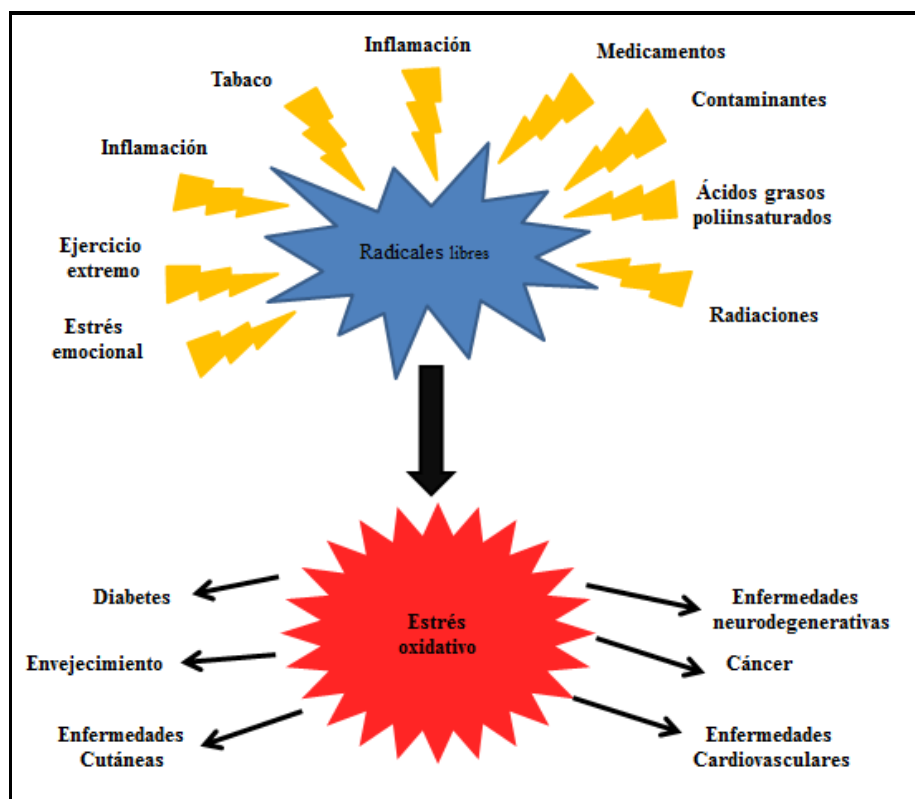


Figura 1.6. Esquema de la generación exógena de radicales libres y efectos adversos del estrés oxidativo en la patogénesis de enfermedades.

1.2. VÍA TÓPICA DE ADMINISTRACIÓN DE MEDICAMENTOS

De entre todos los órganos expuestos al daño de los RL, posiblemente la piel sea el órgano más expuesto de manera directa y el desequilibrio de su defensa antioxidante acelera el mecanismo de envejecimiento y predispone al cáncer cutáneo. (Serrano del Castillo y cols., 1991; Contreras y cols., 2004).

En 1950 Harman fue el primero en proponer la “Teoría del envejecimiento celular inducido por radicales libres” (Sies y cols., 1992). Desde entonces, el desarrollo de productos farmacéuticos que los contienen, principalmente enfocados hacia el tratamiento del envejecimiento cutáneo, ha tenido un crecimiento acelerado con un número considerable de estudios que proporcionan evidencia de sus beneficios, tales como capacidad fotoprotectora, cicatrizante y anticarcinogénica. Un aspecto específico de la farmacología dermatológica es la fácil accesibilidad de la piel tanto para diagnóstico como para el tratamiento. Los compuestos terapéuticos cutáneos presentan ventajas frente a otras vías de administración como: evitar el contacto agresivo con el medio gástrico (pH, enzimas), no presenta los inconvenientes de la administración por vía oral (vacío gástrico, motilidad intestinal, efecto de primer paso), permiten el uso de fármacos con margen terapéutico estrecho manteniendo niveles plasmáticos terapéuticos, minimizan los efectos secundarios relacionados con los niveles plasmáticos máximos y puede interrumpirse su administración de inmediato (Villarino y Landoni, 2006). Por otro lado el uso de esta vía de administración presenta algunos inconvenientes como puede ser producir irritación o sensibilización de la piel o no poder administrar dosis altas del fármaco.

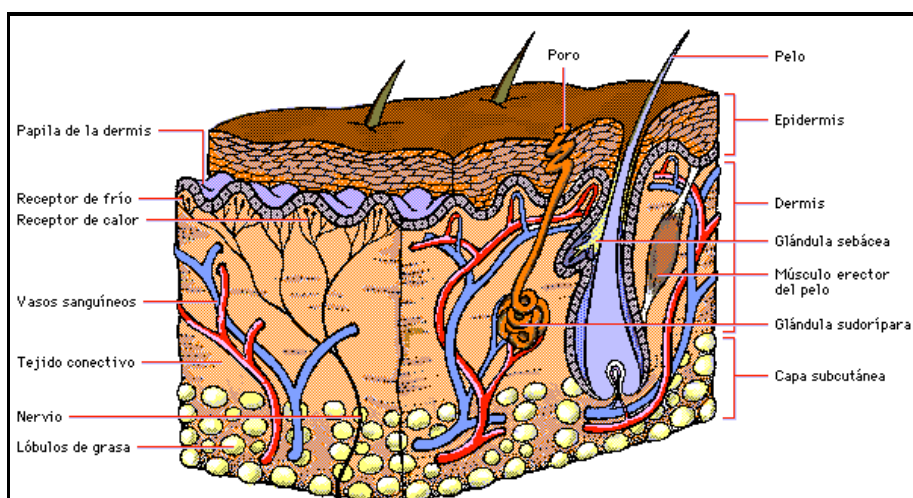


Figura 1.7. Estructura de la piel. (Figura extraída de Villarino y Landoni, 2006).

La piel es el órgano más extenso del organismo humano con aproximadamente 1,5 a 2m². Su función principal es la de proteger a los órganos internos del cuerpo al actuar como una barrera efectiva contra los efectos perjudiciales del ambiente y agentes xenobióticos. Además de su función protectora desempeña un papel importante en la regulación térmica, en la detección de estímulos exteriores y en la excreción de materiales de desecho y toxinas. Actualmente se sabe que la piel participa activamente en la síntesis, utilización y metabolismo de proteínas, lípidos y moléculas de señalización celular, además de ser parte integral de los sistemas inmune, nervioso y endócrino. Desde un punto de vista histológico, la piel posee por tres capas bien diferenciadas (Figura 1.7.), la epidermis (zona externa de células protectoras), dermis (vasos sanguíneos, linfáticos y terminaciones nerviosas) e hipodermis (tejido subcutáneo graso).

EPIDERMIS

Es la capa más externa de la piel, constituida por un epitelio delgado de un espesor aproximado de 15 µm, de células en continua renovación (los queratinocitos). No tiene vasos sanguíneos ni linfáticos, pero sí que hay muchas terminaciones nerviosas. La epidermis está formada por cinco estratos diferenciados: el córneo, el granuloso, el lucido, el espinoso y el basal. A su vez, estas cinco capas se pueden englobar en otra subdivisión: estrato córneo y epidermis viable.

- Estrato córneo: Constituye la barrera principal evitando la pérdida de agua y fluidos corporales, así como la entrada de agentes externos. Es la capa más delgada y superficial de la piel presentando un bajo grado de hidratación, donde los lípidos localizados en los espacios intercelulares desempeñan una papel muy importante en la resistencia que se ofrece a la penetración (Schaefer y cols., 1996a), (Schaefer, y cols., 1996b), (Wertz y cols., 1998), (Bouwstra y cols., 2003), (El Maghraby y cols., 2008).
- Epidermis viable: Subyacente al estrato córneo es la capa responsable de la formación de la barrera de la piel constituida por un epitelio estratificado (de dentro a afuera estrato basal, espinoso y granuloso), queratinizado y no vascularizado que descansa sobre la dermis.

Interpuesta entre la dermis y la epidermis se encuentra una membrana extracelular, denominada lámina basal, que mantiene la unión entre ellas, y cuya superficie ondulada, aumenta la superficie de contacto. Debido a la ausencia de una red vascular en la epidermis las células vivas de este epitelio reciben sus nutrientes desde los capilares dérmicos (situados en la parte alta de la dermis, junto a la epidermis) por difusión pasiva de sustancias a través de la membrana basal al fluido intersticial (Elias, 1989; Schaefer y cols., 1996a).

DERMIS

Se trata de la capa más voluminosa de la piel, Tiene un espesor de 3000 a 5000 μm , dependiendo de la parte del cuerpo. Condiciona la elasticidad y tensión de la piel por estar formada de tejido conectivo que incluye fibras de colágeno y elastina. Además, está muy vascularizado y provisto de una buena red de vasos linfáticos. Alberga glándulas sudoríparas y sebáceas, así como los folículos pilosos, y proporciona un buen soporte mecánico, compacto y flexible (Young y cols., 2000) (Fawcett y cols., 2002). Contiene numerosas células, incluyendo fibroblastos y macrófagos.

HIPODERMIS

Es la región más profunda de la piel y se encuentra constituida por una malla de células grasas (adipocitos) dispuestas en lóbulos. Dicha región presenta un importante papel en el almacenamiento de energía y metabolismo, así como, en el aislamiento del cuerpo del calor externo y el frío en su y protección contra los golpes (Baroni y cols., 2012).

ANEXOS CUTÁNEOS DE LA PIEL

Se originan en la dermis e hipodermis y perforan el estrato córneo constituyendo zonas de discontinuidad en la integridad del estrato córneo. Son responsables de varias funciones, en las que se incluyen un control térmico y una cubierta de protección en la piel (Schaefer y cols., 1996a).

- **Glándulas sudoríparas:** Están constituidas por una porción secretora, tubo muy contorneado sobre sí mismo, y un canal secretor. Este anexo cutáneo secreta una solución casi isotónica donde los electrolitos son reciclados activamente por la glándula dando lugar a la hipotonicidad del sudor. La evaporación de esta secreción en la superficie de la piel tiene un papel importante en la regulación de la temperatura (Poirier y cols., 1985), (Elias y cols., 1989), (Schaefer y cols., 1996a).
- **Glándulas sebáceas:** La mayoría se encuentran asociadas al folículo piloso, a nivel dérmico, a través de su corto canal secretor constituyendo la unidad pilosebácea. Esta glándula alveolar de tipo holocrino secreta sebo dentro del canal del folículo el cual fluye hacia la superficie como resultado de la lisis de los sebocitos dentro de las glándulas. Dicha secreción presenta una composición lipídica característica de cada especie que lubrican y protegen la piel. Las glándulas están involucradas en la regulación del pH de la superficie cutánea. (Poirier y cols., 1985), (Elias, J.J, 1989), (Schaefer y cols., 1996a), (Wertz y cols., 1998), (Lauer, A.C, 1999).
- **Folículos pilosos:** Están presentes en toda la superficie de la piel, excepto labios, palmas de las manos y planta del pie. Se forman a partir de una invaginación de la epidermis que llega hasta la hipodermis. Esta invaginación se ensancha en la parte más profunda formando una masa de células matrices que rodean una papila conectiva muy vascularizada. Las células proliferan hacia la superficie diferenciándose en el pelo.

1.2.1. EFECTO DE LOS RL A NIVEL CUTÁNEO

Las especies reactivas de oxígeno son los RL derivados de la cadena respiratoria, que a nivel cutáneo pueden provocar acumulación de lesión oxidativa en moléculas de vida larga como el colágeno y la elastina, despolimerizar los mucopolisacáridos de la matriz extracelular, favorecer la acumulación de materiales como la lipofucsina (“pigmento del envejecimiento”) y provocar fibrosis arteriolocapilar en los vasos que nutren la dermis.

Las RL más importantes son: radical anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical óxido nítrico (Lin y cols, 2003) (Shindo y cols., 1994), que están directamente relacionados con alteraciones y enfermedades cutáneas además del proceso de envejecimiento. Hoy en día podemos hablar de dos tipos de envejecimiento cutáneo:

- Envejecimiento cronológico: los mecanismos mediante los cuales las ERO regulan la muerte queratinocitaria en el envejecimiento cronológico son: interacción con las caspasas, inducción de la liberación de citocromo C de la mitocondria, fragmentación del ADN, y activación de la quinasa de proteínas activada por mitógenos (MAPKs). Todas son vías que participan en la activación de cascadas de señalización intracelular que pueden terminar por inducir apoptosis (Xiantao y cols., 1998).
- Fotoenvejecimiento y daño solar: el daño solar se produce por la exposición indiscriminada y sin protección a las radiaciones ultravioletas, las cuales tienen efectos agudos y crónicos sobre el tegumento cutáneo.

Las radiaciones ultravioletas provocan un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno o radicales libres en la piel humana, los que son responsables del estrés oxidativo y del daño a proteínas, lípidos y sobre todo al DNA celular, daño que de no poder ser reparado por un exceso de radicales, por una disminución de las defensas antioxidantes o por ambos, conduce a la carcinogénesis.

Respuestas cutáneas frente a la radiación ultravioleta:

- Agudas:
 - Eritema
 - Pigmentación
 - Engrosamiento cutáneo
- Crónicas:
 - Envejecimiento
 - Premalignidad
 - Malignidad

Sin duda, los efectos crónicos de las radiaciones ultravioletas son los más temidos y los de mayor importancia clínica.

Se ha postulado que al menos 50% del daño de la piel inducido por luz solar es atribuible a la formación de RL. La exposición a radiación ultravioleta (RUV) induce producción de cromóforos, moléculas que al absorber la luz (principalmente UVB pero también UVA) producen RL. Éstos, al superar los mecanismos AOs compensadores, promueven la peroxidación lipídica de las membranas celulares y la formación de “dímeros de timidina” (unión de dos timinas adyacentes) que distorsionan la estructura de la doble hélice e imposibilitan la correcta replicación y transcripción del material genético. De manera aguda habrá eritema solar y, si la lesión es crónica, fotoenvejecimiento.

En exposición sostenida y prolongada pueden presentarse mutaciones en los genes reguladores de la muerte celular programada, dando paso a precáncer (queratosis actínicas) y cáncer cutáneo. (Pinnell, 2003).

Apoyando lo anterior se ha observado que, al radiar fibroblastos humanos con luz ultravioleta A (RUVA), la actividad de algunos antioxidantes enzimáticos clave, como catalasa y SOD, disminuye o se interrumpe (Figura 1.8.) (Shindo y cols., 1997).

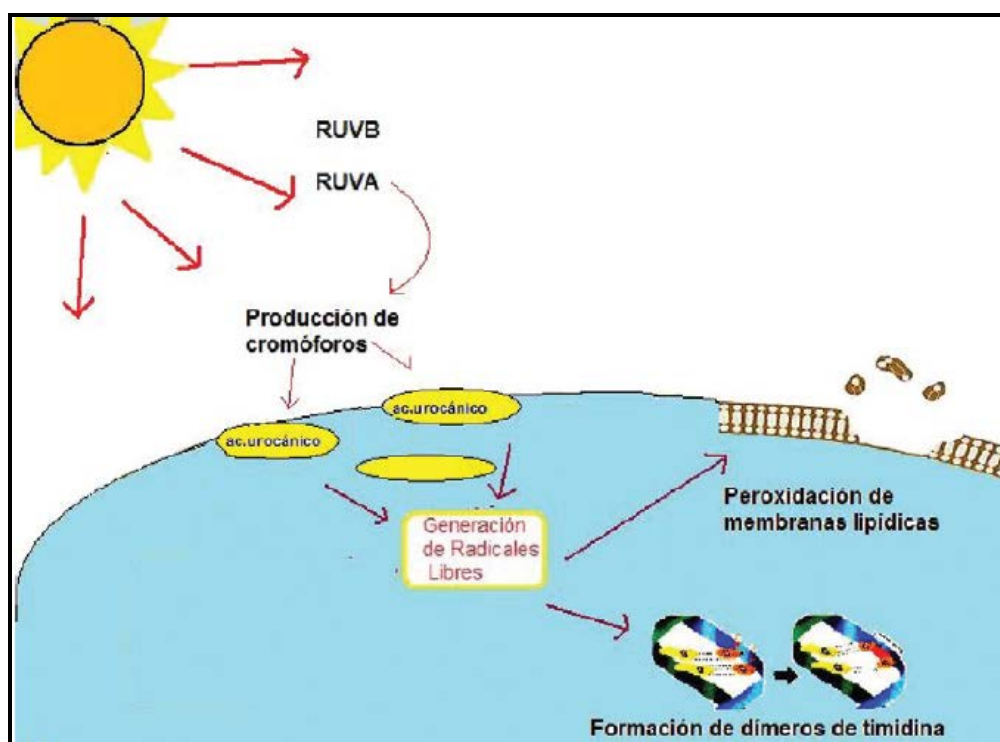


Figura 1.8. Mecanismos de fotoenvejecimiento

El fotoenvejecimiento cutáneo o dermatoheliosis constituye el primer paso hacia la premalignidad y la posterior malignidad. Los individuos presentan una piel francamente engrosada, con elastosis (arrugas gruesas y evidentes) de un tinte bronceado más o menos intenso y que se define claramente cuando comparamos áreas de piel expuestas al sol con áreas cubiertas por los vestidos habituales. Sobre esta piel dañada, aparecen lesiones premalignas y posteriormente lesiones malignas. La premalignidad se caracteriza por la aparición de lesiones debidas al daño solar del tipo de las queratosis actínicas, que en un periodo más o menos corto conducirían a la aparición de carcinomas cutáneos y la melanosis circunscrita de Dubreuilh que en un periodo similar conduciría a la aparición del melanoma maligno.

Existen otras lesiones premalignas, que si bien no son dependientes directas del daño solar crónico, si son influenciadas negativamente por la exposición a las radiaciones solares y deben ser mencionadas. Cicatrices secundarias a lupus vulgar, leishmaniasis, lupus vulgar o quemaduras, úlceras cutáneas de larga duración, las dermatitis ocupacionales y la atrofia senil de la piel evolucionan a carcinomas cutáneos tanto más rápido cuanto mayor sea el abuso de la exposición al sol.

La malignidad cutánea es sin duda, la más frecuente de todas. Se estima que entre el 40 y el 50% de toda la población habrá padecido al menos de un tipo de cáncer cutáneo al llegar a los 65 años. Se destacan, entre otras, el carcinoma basocelular, el carcinoma espinocelular y el melanoma maligno.

Sin duda, la prevención del daño solar y sus consecuencias en el ser humano sería muy fácil si los individuos no se expusieran a las radiaciones solares; sin embargo, eso sería como cambiar el mundo, por lo que los mecanismos de prevención deben ir encaminados a la educación sobre cómo exponerse al sol y las medidas terapéuticas necesarias para evitar el efecto dañino de las radiaciones ultravioletas, momento en el cual los antioxidantes entran a jugar un rol de vital importancia.

Existen otro tipos de enfermedades cutáneas relacionadas directamente con los radicales libres, como la psoriasis, la dermatitis de contacto y el vitíligo, que aun partiendo del hecho de la predisposición genética, y esto explica un tanto la asociación a otras enfermedades autoinmunes, en las cuales también existe una alta predisposición genética; estos individuos tendrían una hiperreactividad a los elementos neurotóxicos liberados en

estados de estrés o tensión emocional, hecho que desencadenaría el estrés oxidativo a nivel epidérmico con la acumulación de especies reactivas de oxígeno, inactivación de las defensas antioxidantes y vacuolización de los melanocitos. Éstos últimos serían reconocidos por los elementos inmunes autoreactivos con la consiguiente producción de anticuerpos, se produciría un proceso de mayor estrés oxidativo y de mayor producción de anticuerpos con la traducción clínica hacia las enfermedades cutáneas. Por todo ello, el estrés oxidativo constituye un eslabón importante en la génesis de la enfermedad y debe ser considerado como diana para el tratamiento de estas enfermedades cutáneas.

Los antioxidantes constituyen un grupo de sustancias especialmente indicados para el tratamiento terapéutico de estos trastornos derivados del estrés oxidativo. Los betacarotenos, la vitamina C y E y la coenzima Q 10 (CoQ10) han sido los antioxidantes que preferentemente se han utilizado en la prevención del daño producido por las radiaciones solares además de los compuestos fenólicos que también protegen eficazmente ya sea por ingestión directa a través de la alimentación o por aplicación tópica.

Se han publicado varios estudios y estadísticas que relacionan los RL con el envejecimiento y se ha citado en varios estudios científicos que la aplicación de antioxidantes vía tópica mejora la apariencia clínica de la piel foto dañada y aumenta la síntesis de fibras de elastina y colágeno (Humbert y cols., 2003; Burke y Pinnell, 2015). De forma tópica al 3% se ha encontrado restauración parcial de la estructura anatómica de la unión dermoepidérmica en piel joven, e incremento del número de vasos capilares que nutren la dermis papilar en mujeres postmenopáusicas. (Sauermann y cols., 2004).

Los antioxidantes derivados de diversas plantas (flavonoides y compuestos fenólicos de los que se han identificado más de 8000), han demostrado su eficacia en el tratamiento de enfermedades cutáneas, efecto ya observado por diversos autores desde los estudios ya clásicos de Shindo y cols., (1997).

Aplicadas tópicamente, las catequinas provenientes del extracto de té verde (epigallocatequina-3-galato) estimulan la proliferación de queratinocitos epidérmicos, inhiben la apoptosis inducida por UV y pueden frenar la proliferación de células neoplásicas. Las isoflavonas de soja genisteína y daidzeína, incrementan la expresión génica del colágeno (COL 1A2), inhiben la formación de cromóforos por exposición a RUV y también tienen efectos antineoplásicos (Pinnell, 2003).

Otros AOs de origen vegetal que han demostrado actividad antioxidante fotoprotectora, cicatrizante y anticarcinogénica son: el licopeno, la silimarina, los extractos de semilla de uva (*Vitis vinifera*), el picnogenol (extracto de *Pinus pinaster*) o la idebenona, entre otros, algunos aún en fase experimental. (Pinnell, 2003; Allemann y Baumann, 2008; Epstein, 2009), además del *Sambucus ebulus* que es nuestra planta de elección en el presente trabajo.

En este contexto, resulta esencial la búsqueda de compuestos antioxidantes que ejerzan una función protectora frente al estrés oxidativo y que puedan convertirse en herramientas terapéuticas válidas frente a estas enfermedades. La naturaleza representa una fuente importante de compuestos biológicamente activos, con una relevancia significativa para el tratamiento de diversas patologías.

1.3. DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE VEGETAL: *Sambucus ebulus L.*

Sambucus ebulus L., cuyo nombre común es yezgo, saúco enano, sabuco, saúco, saúco blanco, saúco menor, saúco pequeño o sauquillo, es una planta perenne nativa cuya clasificación botánica aparece descrita en la siguiente tabla.

Clasificación taxonómica	
Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
División	Magnoliófitas
Clase	Magnoliopsidas
Subclase	Asteridae
Orden	Dipsacales
Familia	Adoxaceae
Género	<i>Sambucus</i>
Especie	<i>Sambucus ebulus L.</i>

Tabla 1.5. Clasificación taxonómica de *Sambucus ebulus L.*

1.3.1. MORFOLOGÍA Y CARACTERIZACIÓN BOTÁNICA

- Descripción morfológica

Sambucus ebulus L. es un arbusto (Figura 1.9.) de 60 a 200 cm de altura, por lo general de tallos no ramificados y con un amplio rizoma. Las hojas son opuestas, pinnadas, de 15 a 30 cm de largo, con 5-9 cm de anchura y finamente dentadas y lobuladas. Los tallos terminan en un corimbo (inflorescencia en la que el eje es corto y los pedicelos de las flores son largos y salen a diferentes alturas del eje). Todas las flores del corimbo abren a un mismo nivel, el tamaño es de 10 - 15 cm de diámetro con numerosas flores blancas (a veces color rosa).



Figura 1.9. *Sambucus ebulus* L. a) tallo florífero; b) cáliz; c) flor; d) corola abierta y estambres; e) ramita fructífera; f) fruto.(Ruiz y Devesa, 2007).

El fruto es una pequeña baya de color negro brillante que tiene entre 5 - 6 mm de diámetro. Las flores de *S. ebulus* aparecen en julio y agosto, sus semillas maduran entre agosto y septiembre y desaparecen en invierno (Figura 1.10.).

La planta prefiere la luz media y los suelos arcillosos y ácidos pero también puede tolerar la contaminación atmosférica y el viento fuerte, pero no un ambiente marítimo.



Figura 1.10. Detalle de un macizo de plantas de yezgo de la riera del Alberche

- Distribución geográfica

El hábitat propio del saúco son las zonas de clima templado y húmedo, cercanos a los ríos con suelos frescos y húmedos, en hondonadas y sotos por ese motivo no es de extrañar que este ampliamente distribuido en la Península Ibérica.



Figura 1.11. Distribución de *S. ebulus* en la península Ibérica (Flora Ibérica)

Aunque el yezgo crece fundamentalmente en zonas con luz media y suelos arcillosos y ácidos, también puede tolerar la contaminación atmosférica y el viento fuerte, pero no un ambiente marítimo.

A nivel mundial se localiza principalmente en el sur y centro de Europa, el noroeste de África y el suroeste de Asia (especialmente en Turquía y en el norte de Irán) y en la Península Balcánica. El género *Sambucus* reúne más de cuarenta especies. Las principales especies son *S. ebulus*, *S. nigra*, *S. racemosa*, *S. mexicana*, *S. peruviana*, *S. palmensis* y *S. africana*, entre otras. (Pieri y Cols., 2009).



Figura 1.12. Distribución geográfica de *Sambucus ebulus*.

- **Etnofarmacología**

Los saúcos, sus frutos, hojas, corteza y rizomas se han recolectado y utilizado desde el Neolítico como alimento y medicina. Se han encontrado restos de saúco enano o yezgo (*Sambucus ebulus* L.) y de saúco negro (*Sambucus nigra* L.) en emplazamientos arqueológicos de unos 6.000 años en diversas áreas del arco mediterráneo, en particular en el sur de Francia y el norte de Italia (Martin y cols., 2008; Rottoli y Castiglioni, 2009). Pío Font-Quer en su libro “Plantas Medicinales. El Dioscorides renovado” hace una descripción detallada de la botánica, recolección, composición, virtudes y uso, e historia de ambos saúcos.

Diferentes estudios han descubierto evidencias de que 50.000 años aC, los seres humanos utilizaban las hojas de las plantas para dar sabor a las carnes. El análisis de los conjuntos arqueobotánicos recuperados en las excavaciones recientes en los Alpes del norte de Francia en "Le Chenet des Pierres" en Bozel (Savoie, Francia, 1.000 m sobre el

nivel del mar) han permitido conocer las plantas que se utilizaban probablemente como alimento en un contexto de montaña durante el Neolítico Medio (4500-3500 aC) (Martin y cols., 2008). El estudio revela la presencia de semillas de saúco negro (*Sambucus nigra*), de saúco rojo (*Sambucus racemosa*) y yezgo (*S. ebulus*) (Martin y cols., 2008; Rottoli y cols., 2009).

Hipócrates y Dioscórides describieron en sus tratados al saúco como una importante planta de uso medicinal. Los dacios y los romanos utilizaban sus remedios contra la hidropesía, la gota, las mordeduras de serpiente y como purgante. En Europa está documentado el uso del saúco como planta medicinal desde muy antiguo, en el siglo XII se escribió “The Physicians of the Myddavai”, tratado que recoge los conocimientos tradicionales sobre las curas y remedios que se preparaban a base de saúco en la zona de Gales desde del siglo VI.

En 1651 el doctor alemán Blockwich publicó “Anatomía Sambuca”, tratado escrito en latín en donde se recoge una serie de hasta setenta enfermedades que pueden ser tratadas con remedios preparados a base de saúco. Este tratado será posteriormente traducido al inglés y publicado en Londres en 1655. En esta misma época el doctor Culpe en Inglaterra hacía referencia al saúco como “la medicina del tórax de la medicina popular”.

Durante mucho tiempo, *S. ebulus* ha sido utilizado en medicina para el tratamiento de distintas enfermedades de naturaleza inflamatoria, por ejemplo, reumatismo, fiebre, infecciones, edemas o inflamaciones. En la antigua medicina oriental, sus hojas, rizomas (es un tallo subterráneo con varias yemas que crece de forma horizontal emitiendo raíces y brotes herbáceos de sus nudos) y raíces se administraron a los pacientes para el tratamiento de la picadura de abeja, urticaria, artritis o dolor de garganta (Saeede Saravi y cols., 2009a). Las hojas de *S. ebulus* se utilizan externamente para aliviar el dolor reumático, tratar abscesos, heridas, edemas, inflamaciones e internamente en el tratamiento del resfriado común y el dolor de estómago (Yesilada y cols., 2014).

Los estudios farmacológicos realizados con *S. ebulus* indican que posee actividades antiinflamatorias, antirreumatoides, antihemorroidales, y que posee efecto inhibidor contra *Helicobacter pylori*. Además, se han observado los efectos de esta planta en el tratamiento de quemaduras, heridas infecciosas, edemas, eccemas, y urticaria (Saeede Saravi y cols., 2009b; Ebrahimzadeh y cols., 2006, 2007; Tuzlaci y Tolón., 2000; Yesilada y cols., 1999;

Guarrera., 1999). En varios estudios realizados se llegaron a resultados prometedores sobre el potencial de cicatrización de heridas, la actividad anti-ulcerogénica y el efecto antiinflamatorio de los extractos de *Sambucus* junto con el aislamiento guiado por bioensayo de principios activos de sus hojas - quercetina-3-O-glucósido, isorhamnetina-3-O-glucósido Y ácido ursólico (Süntar y cols., 2010, Schwaiger y cols., 2011 y Yesilada y cols., 2014). Más recientemente, el estudio piloto con extracto acuoso de hojas de *S. ebulus* reveló que el tratamiento tópico con gel de *S. ebulus* puede ser útil para aliviar síntomas de pacientes con osteoartritis de rodilla (Jabbari y cols., 2016).

A pesar de su uso tradicional en alimentación o en medicina, *Sambucus ebulus* L. presenta una elevada toxicidad debido a la presencia lectinas con actividad antirribosómica (RILs o RIPs) como la ebulina l de hojas, la ebulina f de frutos y SEAI o la ebulina r1 y ebulina r2 en rizomas entre otras (Girbés y cols., 1993a; Girbés y cols., 2004; Ferreras y cols., 2011). Estas RILs desde un punto de vista estructural poseen dos cadenas, una enzimática con actividad RIP y otra cadena unidad por puente disulfuro con actividad lectina, que condiciona su toxicidad. El yezgo contiene también proteínas inactivadoras de ribosomas de una sola cadena denominadas ebulitinas (De Benito y cols., 1995). (Jiménez y Cols., 2013). Además incluye otras lectinas sin actividad antirribosómica denominadas de modo genérico SEL (*Sambucus Ebulus Lectin*). Así tenemos diferentes denominaciones de SEL muy similares en función del lugar de extracción como SELlm, SELld de hojas, SELfd de frutos y SEAI en rizomas.

1.3.2. PRINCIPALES COMPONENTES OBTENIDOS MEDIANTE EXTRACCIÓN: COMPUESTOS FENÓLICOS ANTIOXIDANTES

El *S. ebulus* es rico en flavonoides, esteroides, taninos, glucósidos, los derivados del ácido cafeico y lectinas presentes en hojas, frutos y rizomas (Saeedi Saravi y cols., 2009a; Ebrahimzadeh y cols., 2006, 2007; Ghannadi y Ghassemi- Dehkordi., 1997; De Benito y cols., 1995; Yesilada., 1995; Pribela y cols., 1992). Los glucósidos cianogénicos S-sambunigrina y R-prunasina, así como la R-holocalina y la S-zierina se han aislado de distintos órganos de *S. ebulus* y de los frutos se han aislado también S-sambunigrina (S-O- β -DGlucopyranosil-mandelonitrilo). Las hojas y tallos contienen también S-sambunigrina (Buhrmester y cols., 2000; Jensen y Nielsen, 1973).

Entre los flavonoides descritos recientemente están la quercetina-3-O-laminaribiosido, isorhamnetina-3-O-laminaribiosido, quercetina-3-O-rutinosido (rutina), isorhamnetina-3-O-rutinosido (narcisina) y la isorhamnetina-3-O-glucosido (Liu y cols., 2008, Manguro y cols., 2004, Park y cols., 2007). También contiene triterpenos pentacíclicos como el β -sitosterol y diferentes ácidos como el ursólico, oleanólico y maslínico (Zahmanov y Cols., 2015).

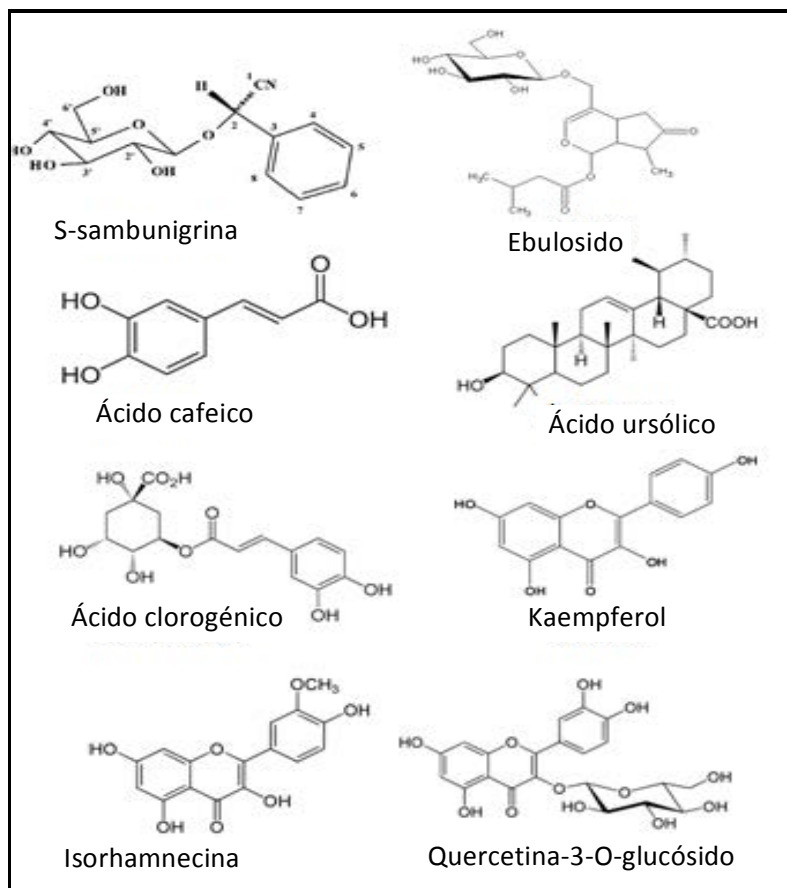


Figura 1.13. Principales estructuras químicas identificadas en *S. ebulus* L

Los esteroides predominantes son el campesterol, brassicasterol, y el estigmasterol, (Bubulica y cols., 2012), y de los principales compuestos fenólicos hallados fueron el ácido cafeoilquinico (CQA) y el ácido feruloilquinico (FQA) (Mikulic-Petkovsek y cols., 2015).

Los frutos representan una buena fuente de aminas heterocíclicas, catequinas, epicatequinas y flavonoides y son las únicas en contener antocianos. Por su parte las flores

contienen un 0,03 a 0,3% de un aceite esencial (aproximadamente el 0,01% de las bayas es aceite esencial) que contiene esencialmente ácidos grasos libres y un gran número de alcanos. También contienen al menos un 0,8% de flavonoides, además de ácido cafeico y sus derivados, incluyendo el ácido clorogénico y el ácido p-cumárico y el ácido químico, y un glucósido denominado ebulosido (Rhee y cols., 2009; Bonita y cols., 2007; Bouayed y cols., 2007; Medina y cols., 2007).

A. Compuestos fenólicos

Bajo la denominación de compuestos fenólicos de origen vegetal se engloban más de 10.000 compuestos. En cuanto a su papel biológico en las plantas, participan en sistemas de defensa ante herbívoros y patógenos; otros proveen de soporte mecánico a la planta; otros atraen insectos polinizadores o dispersores de frutos; algunos de ellos absorben la radiación ultravioleta, o actúan como agentes alelopáticos (agentes que reducen el crecimiento de plantas competidoras que estén cerca). La mayoría son clasificados como metabolitos secundarios de las plantas. En general son sintetizados por la ruta del ácido shikímico o la vía del ácido malónico (o por las dos, por ejemplo los flavonoides).

Los compuestos fenólicos son atrapadores de radicales libres. El mecanismo de reacción es el descrito en la figura 1.14.

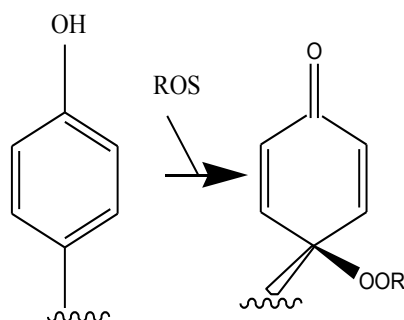


Figura 1.14. Mecanismo de reacción antioxidante de los compuestos fenólicos. Los compuesto fenólicos se oxidan por sustancias fuertemente oxidantes y por radicales libres generando quinonas.

En esta reacción el fenol se oxida a quinona y después a peróxido (-OOR). Cuando el peróxido se forma en una biomolécula, se pierde la función de dicha biomolécula y ello puede provocar daños serios en el funcionamiento de las células y los tejidos.

A. FENOLES SIMPLES

- i. Fenilpropanoides simples: tienen un esqueleto básico de fenilpropanoide (un anillo aromático unido a una cadena de 3 carbonos). Entre los más representativos se encuentran el ácido trans-cinámico o el ácido p-cumárico, y sus derivados como el ácido cafeico. Éste último es considerado un poderoso antitumoral y se encuentran presente en numerosos alimentos como el rábano, el apio o las naranjas.
- ii. Lactonas fenilpropanoides o ésteres cíclicos: se les denomina también cumarinas. Poseen un esqueleto fenilpropanoide pero el propano está ciclado. La cumarina simple más conocida es la umbeliferona. Originalmente la cumarina se aisló del haba de Tonka. Su rol en las plantas parece ser de defensa, dándole propiedades de rechazo a la alimentación, antimicrobiana, captadora de radiación UV e inhibidora de la germinación.
- iii. Derivados del ácido benzoico: el esqueleto es un anillo aromático unido a un carbono. Son formados a partir de fenilpropanoides. Ejemplos: la vainillina, el ácido salicílico. El ácido salicílico (o ácido 2-hidroxibenzoico) recibe su nombre de *Salix*, la denominación latina del sauce de cuya corteza fue aislado por primera vez.

B. FENOLES COMPLEJOS

Los fenoles complejos los podemos clasificar en lignanos y flavonoides. Los flavonoides se biosintetizan en todas las "plantas terrestres" o embriofitas, y también en algunas algas como la Charophyta si bien su composición y concentración es muy variable entre especies y en respuesta al ambiente. Las familias más importantes son los flavanoles, flavanonas, flavonas, flavonoles, isoflavonas y antocianos. La calidad y madurez de los frutos rojos o negros procedentes de diversos tipos de plantas se determina parcialmente por la intensidad de su color. Estas bayas deben su color a diferentes tipos de compuestos polifenólicos entre los que destacan desde un punto de vista cuantitativo los antocianos. Las antocianidinas son los constituyentes básicos de este tipo de compuestos y están formados por un anillo aromático unido a un anillo heterocíclico que contiene un oxígeno protonado unido a un tercer anillo aromático. Las diferencias entre las distintas antocianidinas caracterizadas, radican en el número de hidroxilos, la naturaleza, posición y número de restos azucarados unidos a esta estructura básica, así como del número de restos de ácidos alifáticos o aromáticos unidos a estos azúcares.

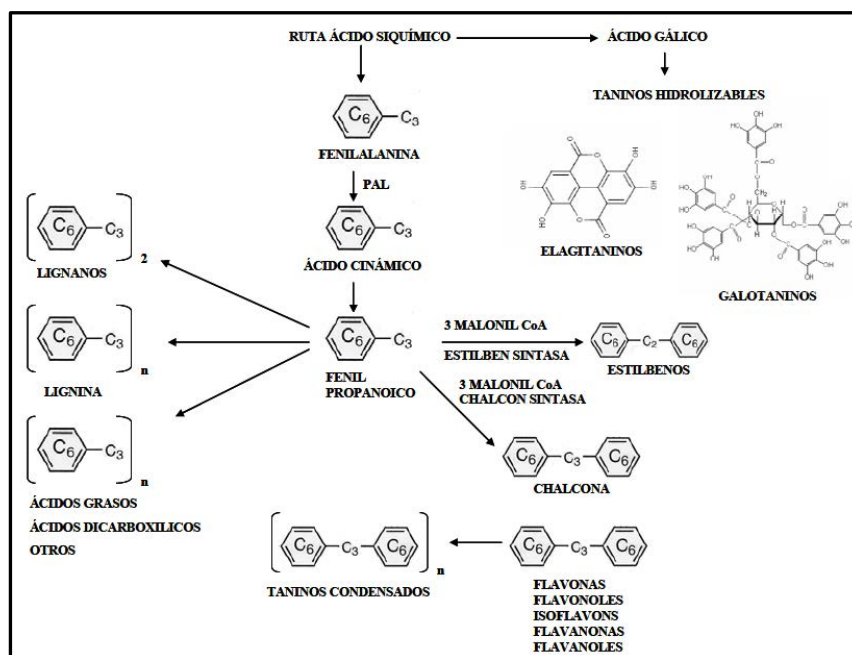


Figura 1.15. Flavonoides y estilbenos: formas de producción (Shahidi, y Nacz, 2004).

En los últimos años, diversos estudios han puesto de manifiesto que estos compuestos poseen propiedades farmacológicas muy interesantes relacionadas con diversas patologías cardiovasculares, inmunológicas, antiinflamatorias o anticancerígenas entre otras.

De entre las variedades europeas de saúcos, todas ellas ricas en compuestos fenólicos, el saúco negro (*Sambucus nigra* L.) ha sido la más estudiada. Los principales antocianos identificados en esta especie son la cianidina-3-sambubiosido, cianidina-3-glucosido, cianidina-3-sambu-biosido-5-glucosido, cianidina-3,5-diglucosido, cianidina-3-rutinosido, pelargonidina-3-glucosido y la pelargonidina-3-sambubiosido (Wu y cols., 2004; Kaack y cols., 2008). En la figura 1.16. se presentan las estructuras de los cianidin-glucósidos más representativos en esta especie.

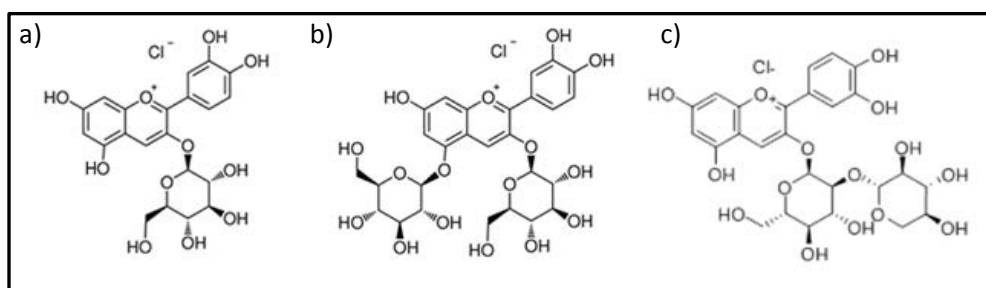


Figura 1.16. Estructura de clorhidratos de cianidín-glucósidos. a) cianidín-3-glucósido; b) cianidín-3,5-di-O-glucósido; c) cianidín-3-sambubiósido.

El cianidín-3-glucósido es el monoglucósido más importantes aislado en *S. nigra*, del que se han descrito sus propiedades antitumorales en modelo de ratón frente a células de carcinoma de pulmón humano en modelo de ratón inmunodeprimido (Ding y cols., 2006).

Los antocianos son estables a pH ácido, por lo que resisten el paso gástrico sin alterar su estructura antociánica. A pH cercano a la neutralidad el anillo antociánico se abre dando lugar a un compuesto denominado chalcona (Figura 1.17.).

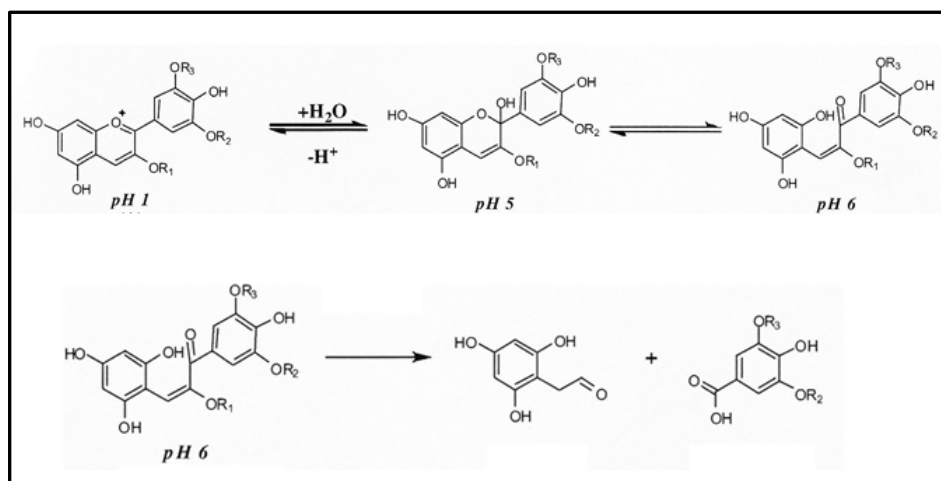


Figura 1.17. Degradación de cianidinas en función del pH.

Por otro lado, la degradación completa implica la apertura del anillo C para su conversión en chalcona, la deglicosilación y la apertura de los otros dos anillos A y B para rendir ácido protocatéuico, ácido para-hidroxibenzóico y floroglucinaldeído (Figura I5).

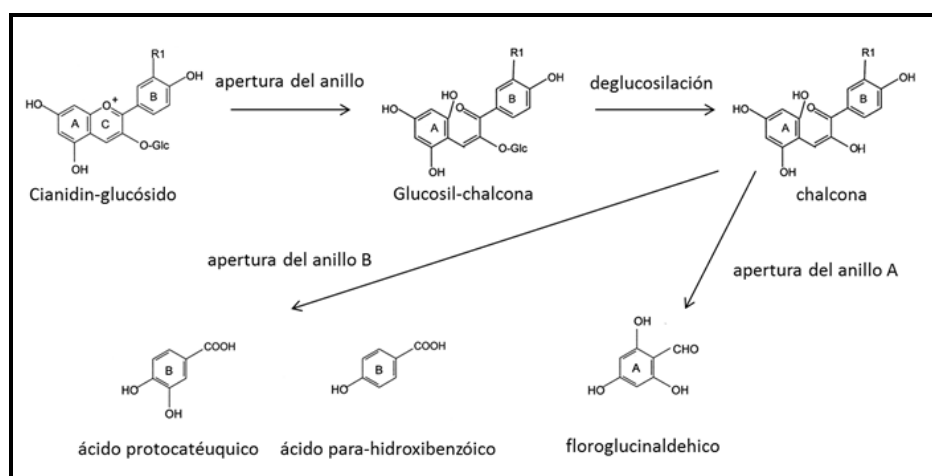


Figura 1.18. Degradación de los cianidín-glucósidos por apertura de los anillos A, B y C. Adaptado de (Sadilova y cols., 2007).

1.3.3. ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA

1.3.3.1. Actividad antiinflamatoria

Se investigó la actividad antiinflamatoria de los extractos en hexano de flores, hojas y raíces de *Sambucus ebulus* en ratones machos después de inducirles un edema por carragenano. Los extractos de flores y raíces produjeron una inhibición estadísticamente significativa y dependiente de la dosis en comparación con los grupos de control. Por el contrario, el extracto de hojas de hexano no mostró ninguna actividad hasta 600 mg / kg i.p (Ebrahimzadeh y cols., 2006; Saeedi Saravi y cols., 2009b). El mismo ensayo se repitió meses más tardes pero con extractos metanólicos y con la variación de incluir frutos maduros, donde estos además de las hojas demostraron tener más actividad antiinflamatoria que el resto de los extractos (Ebrahimzadeh y cols., 2007).

En el estudio llevado a cabo por Schwaiger y cols., 2011, se estudió la variación del efectos inhibitorios contra la expresión inducida por el TNF α de VCAM-1 al tratar a células endoteliales de venas umbilicales humanas (HUVECs) con extracto de hojas de *S. ebulus* utilizando el partenólido, una lactona sesquiterpénica altamente antiinflamatorio aislado fundamentalmente en especies de matricaria, como control positivo. En este mismo estudio se puso de manifiesto que el principal anti-inflamatorio presente en el extracto de hojas de *S. ebulus* era el ácido ursólico, el cual actúa principalmente contrarrestando la expresión inducida por el TNF α de VCAM-1 ($5,35 \pm 0,38\%$) y la inhibición de la expresión de ICAM-1 inducida por TNF α ($38,89 \pm 16,6\%$); este hallazgo sugiere un mecanismo adicional de la actividad antiinflamatoria del ácido ursólico.

1.3.3.2. Actividad analgésica

Varios ensayos y publicaciones ponen de manifiesto la eficacia y seguridad de la aplicación tópica del extractos de *Sambucus ebulus* en el tratamiento de varias dolencias: articulaciones, ligamentos, piel, espina dorsal y problemas reumáticos (Schwaiger y cols., 2011; Jabbari y cols., 2016).

En 1998 un equipo de investigación realizó un estudio para evaluar el efecto analgésico y anti-inflamatorio del extracto de rizomas del *Sambucus ebulus*. En ese estudio se utilizaron los modelos de dolor crónico (test de formalina) y agudo (test de estimulación

eléctrica de la cola) en ratas. Se asignó el salicilato sódico (SS) como control positivo. Los resultados no mostraron ningún efecto del SS sobre la latencia en test de estimulación de la cola, mientras que las ratas tratadas con el extracto de rizomas de *ebulus* aumentaron el tiempo de respuesta. En la prueba de formalina, la SS y el extracto de *ebulus* aliviaron la nocicepción de los animales en las segundas fases, mientras que en la primera, sólo el extracto produjo un efecto antinociceptivo, además se mostró un inicio de acción más rápido para *Sambucus ebulus* (Ahmadiani y cols., 1998). Un ensayo clínico piloto de doble ciego diseñado para evaluar la eficacia y la seguridad a corto plazo de un gel de extracto de hojas de *S. ebulus* al 1% de aplicación tópica, en pacientes con osteoartritis de rodilla (OA) en comparación con un gel de diclofenaco al 1%, ha puesto de manifiesto que en el método de evaluación del dolor medio, la puntuación total y la puntuación para el dolor de grupo, el gel de *S. ebulus* mostro valores significativamente más bajos en comparación con la formulación de referencia. Además, no se informó ningún efecto adverso grave (Jabbari y cols., 2016).

1.3.3.3. Actividad antimicrobiana y antiséptica

Al estudiar el efecto antimicrobiano de los extractos metanólicos de las partes aéreas liofilizadas de *Sambucus ebulus*, en 16 cepas aisladas de *S. aureus* resistentes a la meticilina usando el método de microdifusión de pozos de agar, se comprobó que todas ellas fueron sensibles al extracto de *Sambucus ebulus* (Salehzadeh y cols., 2014).

Por su parte Rodino y cols., 2015 evaluaron la actividad inhibidora del extracto de frutos de *ebulus* sobre el crecimiento de bacterias Gram (+) y Gram (-), *B. subtilis*, *E. faecalis*, *B. cereus*, *S. aureus*, *P. fluorescens*, *E. coli* y sobre el crecimiento micelial de algunos patógenos fúngicos como *B. cinerea*, *R. solani* y *P. infestans*. El extracto mostró actividad antimicrobiana contra la mayoría de las cepas ensayadas mostrando los mejores resultados contra *P. fluorescens* y *E. fecalis*.

1.3.3.4. Actividad antiemética

En 2015 Fathi y cols. demostraron el extracto de fruto maduro fue capaz de prevenir la emesis inducida por el sulfato de cobre, debido a su acción antiemética periférica y la capacidad de estimular la motilidad de la parte superior gastrointestinal acelerando el vaciamiento gástrico, un efecto similar a la metoclopramida.

1.3.3.5. Actividad antiulcerosa

En un estudio reciente se vio que el extracto metanólico de las hojas de *Sambucus ebulus* ejercía una actividad antiulcerogénica significativa contra el modelo de úlcera de esfuerzo inducida por inmovilización en ratas como modelo de bioensayo. En ese mismo ensayo dos flavonoides, la quercetina-3-O-monoglucosido y el isorhamnetin-3-O-monoglucosido fueron aislados y demostraron ser los principales responsables de la actividad antiulcerosa, por ello, se realizaron más estudios sobre el extracto activo utilizando diversos modelos de ensayo in vivo (ulcerogénesis inducida por etanol, serotonina y ligadura de píloro) en ratas, así como métodos bioquímicos para la evaluación del potencial antiulcerogénico demostrando en todos ellos su actividad antiulcerosa. (Yesilda y cols., 2014)

1.3.3.6. Actividad antitumoral

Varios son los estudios realizados para valorar la actividad antitumoral del *S. ebulus*, en uno de ellos se investigó la citotoxicidad del extracto de acetato de etilo de frutos maduros de *S. ebulus* (SEE) sobre líneas celulares de cáncer HepG2 y CT26. También se estudiaron los efectos protectores de las vitaminas C y E contra la citotoxicidad inducida por SEE en líneas celulares normales. La citotoxicidad de SEE en las células de cáncer (HepG2 y CT26) y células normales (fibroblastos de rata) se evaluó mediante el ensayo MTT. Se evaluó la CI50 de SEE en las líneas celulares. Además, se estudió la CI50 de SEE en líneas celulares normales con exposición a las vitaminas C, E y C + E. Los resultados concluyeron que SEE posee IC50 inferior en las líneas celulares de cáncer en comparación con las líneas celulares normales. Se manifestó una alta citotoxicidad que puede actuar como compuesto anticancerígeno. Además, la citotoxicidad de SEE en líneas celulares normales en presencia de vitaminas C + E, E y C disminuyó. Los resultados demostraron que el SEE es un agente citotóxico efectivo en las células del hígado y del cáncer de colon y sugiere que las vitaminas C y E pueden proteger a las células normales, cuando se usan SEE en la terapia del cáncer en el futuro (Saeedi Saravi y cols., 2013).

Otro ensayo describió las propiedades antitumorales del Cianidín-3-glucósido, uno de los monoglucósidos más importantes aislado de los frutos de *S. ebulus*, el estudio se hizo en modelo de ratón frente a células de carcinoma de pulmón humano en ratón inmunodeprimido (Ding y cols., 2006).

Varios equipos de investigación estudiaron la composición fitoquímica del *Sambucus ebulus* llegando a la conclusión de que los triterpenos pentacíclicos, presentes en las partes aéreas, poseen una fuerte actividad antineoplásica en células humanas de cáncer de colon HT-29 (ácido oleoico y maslínico; Juan y cols., 2008) y en células de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231 (ácido ursólico y oleanólico, Chakravartiet y cols., 2012).

En otro estudio se llevó a cabo la evaluación de los efectos citotóxicos y la IC₅₀ del extracto de acetato de etilo de frutos maduros en las líneas celulares, mostraron que el extracto de acetato de etilo de *Sambucus ebulus* posee un IC₅₀ inferior en las líneas celulares de cáncer en comparación con las líneas celulares normales. Por otra parte, el extracto posee una IC₅₀ superior en comparación con el etopósido en todas las líneas celulares normales y de cáncer, pero parece ser un buen compuesto citotóxico que puede introducirse como un compuesto anticanceroso (Shokrzadeh y cols., 2009).

1.3.3.7. Actividad contra *Helicobacter pylori*

Un equipo de investigación (Yesilada y cols., 1999) estudio la actividad de los extractos de cloroformo (CHCl₃) de las partes aéreas del *S. ebulus* frente a una cepa estándar y ocho aislamientos clínicos de *Helicobacter pylori* utilizando el método de dilución en agar. Los extractos inhibieron el 37% de las cepas de *H. pylori* a prueba (3 de 8) frente a la cepa estándar, con CMI = 31,2 mg/mL.

1.3.3.8. Actividad antiparasitaria

- a. Frente a Giardia: en este estudio se evaluó el efecto antiparasitario del extracto metanólico de los frutos maduros de *S. ebulus* al incubarlos con varios quistes aislados de muestras fecales de *G. lamblia* durante distintos tiempos y a distintas concentraciones. El extracto de *S. ebulus* a concentración 100 mg/mL durante 60 minutos tuvo la mayor actividad *anti-giardia* (78 ± 4%) (Rahimi-Esboei y cols., 2013).
- b. Frente a Hidatidosis: el mismo equipo de investigación descubrió la alta actividad in vitro de los extracto metanólico de los frutos maduros de *S. ebulus* al incubarlos con quistes hidatídicos aspirados asépticamente de hígados de ovejas, variando tiempo y concentración, y examinando la viabilidad mediante tinción con eosina al 0,1% (Gholami y cols., 2013)

1.3.3.9. Tratamientos dermatológico

- a. Cicatrizante: los datos experimentales obtenidos del estudio revelaron que el grupo de ratones, con modelo de incisión circular tratados con un ungüento de extracto metanólico de las hojas de *S. ebulus* a una concentración del 1%, mostraron una notable actividad de cicatrización de heridas. En ese mismo ensayo se aisló un derivado de flavonoide "quercetina 3-O-glucósido" que parece ser el responsable de dicha actividad (Süntar y cols., 2010). Otro estudio muy reciente valoró a 106 ratas wistar que se dividieron en 9 grupos incluyendo un control, eucerina, fenitoína, *Urtica dioica* (2%), *U. dioica* (5%), *Sambucus ebulus* (2%), *S. ebulus* (5%), combinación (2%), y combinación (5%). El grupo control permaneció sin tratar, los grupos eucerina y fenitoína fueron considerados como los controles negativo y positivo, respectivamente, y los grupos restantes recibieron diferentes concentraciones de los ungüentos. Se hicieron heridas de espesor total. El proceso de cicatrización de las heridas se investigó los días 7, 14 y 21 del experimento. Se analizaron varios factores, incluyendo el número de fibroblastos, la formación de nuevos vasos (angiogénesis), el grosor de los tejidos granulomatosos (GT) y el epitelio superpuesto. Todos los grupos de tratamiento mostraron evolución positiva con respecto a todos los factores estudiados. Sin embargo, los mejores resultados se observaron con los grupos *S. ebulus* (2%) y la combinación de 2% ($P < 0,05$) (Babaei y cols., 2017).
- b. Dermatitis *Paederus*: se realizó un ensayo clínico aleatorizado doble ciego, prospectivo, controlado con placebo, en 62 pacientes con síntomas clínicos de dermatitis debido a escarabajos *Paederus*. Los pacientes recibieron una solución tópica de Palemolina (5% de extracto de fruta de *S. ebulus* en etanol al 70%) o una solución tópica de etanol al 70% tres veces al día. Se prescribió un ungüento tópico de hidrocortisona para todos los pacientes. Palemolina fue estadísticamente más eficaz en el control de escozor, dolor, la inflamación, el secado de la herida, las infecciones y la aceleración de la cicatrización que el grupo de control ($p \leq 0,05$). Especialmente en el control de la inflamación, la Palemolina tuvo una eficacia más significativa ($p < 0,001$) que el grupo de control. Aproximadamente el 63,6% de los pacientes en el grupo de Palemolina fue curado durante las primeras 24 h (frente a 27,4% en los grupos de control). Los problemas relacionados con las lesiones en el 93,9% de los pacientes se

eliminaron completamente durante 48 horas después del inicio del tratamiento con Palemolina (frente a 65,4% en los grupos control) (Ebrahimzadeh y cols., 2014).

- c. Tratamiento del *Herpes simplex*: un equipo de investigación realizó un estudio del efecto de los extractos metanólicos de los frutos maduros sobre líneas celulares en el tratamiento herpes simple llegando a la conclusión de su efectividad debido a su capacidad antioxidante en concreto su perfil de flavonoides glicosilados. (Zahmanov y cols., 2015).
- d. Protección solar: en el estudio de (Ebrahimzadeh y cols., 2014), se evaluaron los efectos protectores de UV de 20 extractos de cuatro plantas medicinales comunes, entre ellas el *Sambucus ebulus* (partes aéreas). Se determinaron los contenidos de fenol y flavonoides y las actividades antioxidantes y se evaluó la correlación entre el SPF y estos contenidos. Se encontró una buena correlación entre el SPF y los contenidos fenólicos, pero no se encontraron correlaciones entre el SPF y los contenidos de flavonoides o la actividad antioxidante.

1.3.3.10.Efecto metabólico

Se estudió el efecto de la infusión de fruta madura de *Sambucus ebulus L.* (SE) sobre el peso corporal, la presión arterial, los niveles de glucosa, el perfil lipídico y los marcadores antioxidantes en voluntarios sanos respecto a su posible actividad protectora contra las enfermedades cardiovasculares y otras enfermedades relacionadas. El estudio que incluyó a 21 voluntarios sanos, con edades comprendidas entre 20 y 59 años, IMC $23,12 \pm 1,31$, que consumieron 200 mL de infusión de frutos maduros de SE / día durante un período de 30 días. Al final del estudio se estableció una disminución significativa de los triglicéridos (14,92%), colesterol total (15,04%) y LDL-C (24,67%). Además, la relación HDL-C / LDL-C aumentó en un 42,77%. También se estableció la capacidad antioxidante sérica mejorada y los niveles totales de tiol (Ivanova y cols., 2014).

Las raíces se usan en las dietas por sus propiedades laxantes y diuréticas. Las raíces también son un poderoso supresor del apetito.

1.3.4. TOXICIDAD

El consumo directo de frutos verdes, corteza o brotes de hojas de saúco produce náuseas y vómitos cuya gravedad depende del grado de madurez de los frutos (Font-Quer, 1999). Los efectos pueden ser tan graves que incluso pueden provocar intoxicaciones gastrointestinales serias similares a las provocadas por la ingesta de frutos de *Ricinus communis* (Arteche y Uriarte, 1994), causada por la presencia de ricina, una proteína muy tóxica (Olsnes, 2004). La decocción de los frutos, la corteza o los brotes de hojas de saúco, elimina la toxicidad (Font-Quer, 1999). Este tipo de efectos hacen pensar que esta toxicidad está relacionada con sustancias termolábiles que son más abundantes en los frutos verdes y la corteza. Se piensa que pueden ser proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs) análogas a ricina, aunque no se descartan sustancias orgánicas con bajo peso molecular como las sustancias cianogénicas que pueden liberar ácido cianhídrico al hidrolizarse, aunque no sea suficiente para explicar la intoxicación por cianhídrico ni la baja concentración, ni los síntomas de intoxicación. Por otra parte dichos efectos tóxicos coinciden con los obtenidos por la acción de dos lectinas con actividad antirribosómica, nigrina y ebulina, al ser administradas por vía intravenosa a alta concentración a ratones (Vanaclócha y Cañigüeral., 2003).

El estudio de extractos en base metanol, n-hexano y de acetato de etilo de *S. ebulus* han demostrado efectos hepatotóxicos y nefrotóxicos en ratones, consistentes en apoptosis y necrosis de las células del parénquima hepático y la hipertrofia de las células de Kupffer (Ebrahimzadeh y cols., 2007). Por otro lado, la exposición al extracto de acetato de etilo da lugar a un importante aumento de la urea sérica (concentración en suero sanguíneo) y un aumento de los niveles de creatinina en ensayos con ratones (Saeede Saravi y Shokrzadeh., 2008, 2009 a, b).

1.3.5. PROTEÍNAS INACTIVADORAS DE RIBOSOMAS

Sambucus ebulus L. posee diferentes isoformas de ebulina, una RIP tipo 2 presente en hojas, frutos, rizomas y flores, que varían en cuanto a su masa molecular y actividad sobre ácidos nucleicos. A pesar del gran número de trabajos sobre esta familia de proteínas, su papel en el organismo es todavía desconocido. Diversos autores han sugerido que estas proteínas forman parte del sistema de defensa de la planta frente a depredadores como insectos (Peumans y Van Damme., 1995; Girbés y cols., 2004; Puri y cols., 2012; Stirpe, 2013), patógenos como virus (Girbés y cols., 1996) y hongos (Corrado y cols., 2005).

Las RIPs se pueden agrupar en dos grandes categorías en función de su estructura, las de tipo 1 y las de tipo 2. Las de tipo 1 están formadas por una única cadena polipeptídica con actividad inhibidora de la síntesis de proteínas a nivel ribosomal. Las de tipo 2 por su parte presentan dos cadenas polipeptídicas diferentes, una denominada cadena A que presenta actividad RIP y que es equivalente a la cadena única de las RIPs de tipo 1, y una segunda cadena denominada B con actividad lectina unidas por puentes disulfuro. Algunos autores sugieren que las RIPs de tipo 2 pueden también estar formadas por dímeros unidos por fuerzas no covalentes, donde cada dímero es una molécula de dos cadenas polipeptídicas, equivalente cada una a una RIP de tipo 2 (Girbés y col., 2004).

Las RIPs tipo 2 presentan una elevada afinidad por diversos receptores situados en la superficie de la membrana plasmática celular, lo que condiciona además su ruta de internalización y por ende su toxicidad (Figura 1.19.). Variaciones en unos pocos pares de bases de su cadena lectina pueden modificar drásticamente estos procesos. Por este motivo existen RIPs tipo 2 altamente tóxicas como ricina, abrina o volkensina y RIPs tipo 2 “no tóxicas” como las nigrinas o las ebulinas. La paradoja de estas lectinas es que si bien son mucho menos tóxicas que ricina tras su administración parenteral (1.000-5.000 veces menor en cultivos celulares), su actividad molecular a nivel ribosomal es muy similar. (Jimenez y cols., 2015).

Aunque las RIPs tipo 1 no serían capaces de internalizarse por dicho mecanismo de reconocimiento, diversos estudios han puesto de manifiesto que si que son capaces de alcanzar ribosomas, aunque habitualmente se las menos tóxicas que las de tipo 2 (Girbés y cols., 2004).

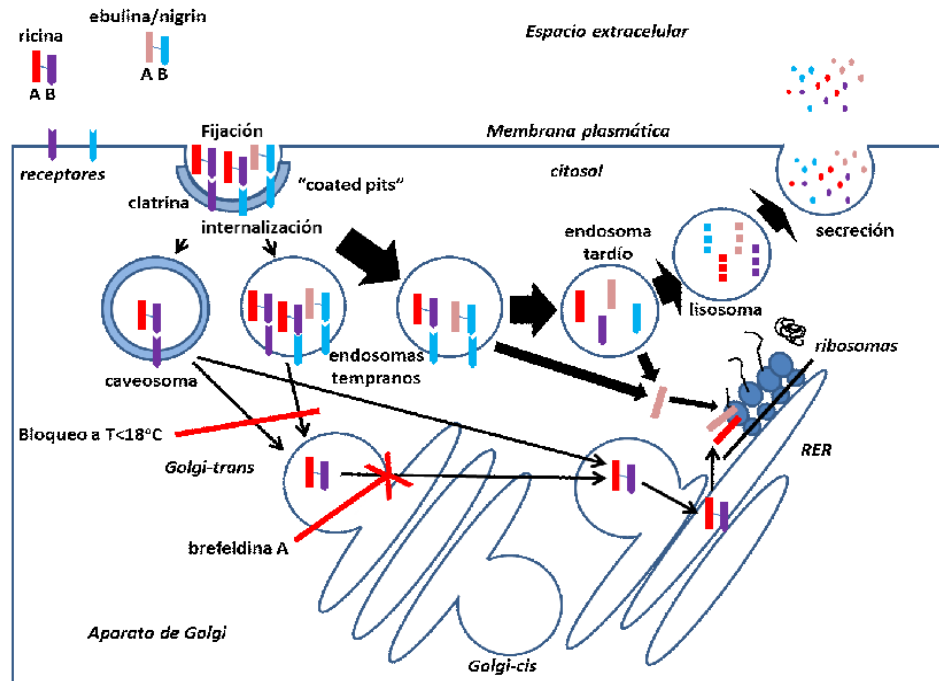


Figura 1.19. Rutas intracelulares seguidas por ebulina y ricina. (Jiménez y cols., 2012b).

La ruta seguida por las moléculas de ricina para alcanzar el citosol de las células se inicia con su internalización mediante receptores de membrana y su integración en compartimentos endosómicos sensibles al NH_4Cl , seguidamente pasa por compartimentos sensibles a la temperatura que se bloquean a 18°C y finalmente la ricina es translocada en el aparato de Golgi, este proceso es sensible a la breffeldina A que es una proteína que tiene un efecto desorganizador del aparato de Golgi (Battelli y cols., 1997). Solo unas pocas moléculas de ricina alcanzan el citosol a través del aparato de Golgi y son eficaces para inactivar los ribosomas, ya que la mayor parte de la ricina internalizada es degradada completamente en los lisosomas (Battelli y cols., 2005). Aunque los estudios de internalización de las RIPs de Sambucus se han realizado con nigrina b (Battelli y cols., 2005), dada la similitud de nigrina b y ebulina I se acepta que ambas, nigrina b y ebulina I, se internalizan aproximadamente de la misma manera. La ruta seguida por nigrina/ebulina es inicialmente la misma que la seguida por la ricina. Cuando ebulina se internaliza pasa por endosomas sensibles a NH_4Cl y continúa por lisosomas donde se degrada en su mayor parte. Finalmente no logra alcanzar el aparato de Golgi.

Desde los endosomas, las rutas de nigrina/ebulina y ricina son diferentes ya que los efectos antirribosómicos de nigrina/ebulina que se producen a altas concentraciones son independientes de la temperatura e insensibles a la brefeldina A. En el caso concreto de nigrina b se ha visto que prácticamente todas las moléculas de lectina son transportadas desde los endosomas hasta los lisosomas donde son completamente degradadas (Battelli y cols., 2005).

Con concentraciones 4 ó 5 veces superior a la ricina se llegan a acumular suficientes moléculas de nigrina/ebulina en los endosomas como para forzar su translocación espontánea desde los endosomas hasta el citosol. La diferencia entre las rutas intracelulares seguidas por nigrina/ebulina y ricina puede estar en que los receptores de unión de ambas proteínas sobre la membrana plasmática, sean diferentes (Pascal y cols., 2001; Muñoz y cols., 2001).

Por otra parte, la diferente toxicidad de la ricina y la ebulina podría tener relación con el hecho de que la toxicidad de la ricina contribuya a una actividad lipasa inherente a las subunidades A-B localizada en un sitio conformado por residuos pertenecientes a las dos subunidades (Morlon-Guyot y cols., 2003). Esta actividad ayudaría a que algunas moléculas de ricina pudieran alcanzar el retículo endoplasmático más fácilmente y finalmente el citosol. La ausencia de este sitio con actividad lipasa en sus moléculas podría ser la causa de la baja toxicidad de las lectinas antirribosómicas no tóxicas (Morlon-Guyot y cols., 2003). Esta ausencia de actividad lipasa obligaría a nigrina/ebulina a continuar la ruta degradativa lisosómica inevitablemente.

1.3.5.1. RILs (Lectinas antirribosómicas) de *Sambucus ebulus*

Proteína	Parte	Pm aparente cadena A	Pm aparente cadena B
SEA I	Rizomas	67.000	67.000
ebulina r1	Rizomas	26.000	30.000
ebulina r2	Rizomas	26.000	30.000
ebulina f	Frutos	26.000	30.000
ebulina l	Hojas	26.000	30.000

Tabla 1.6. RILs de *Sambucus ebulus* L. La letra hace referencia a la parte de la planta de la que han sido aisladas. SEA= Sambucus Ebulus Agglutinin

La ebulina I del *S.ebulus* y la nigrina b de *S. nigra* fueron las primeras lectinas antirribosómicas que se aislaron en la familia Sambucaceae (Girbés y cols., 1993a, b). Su IC₅₀ en lisados de reticulocitos de conejo es de 0,15 nM, valor muy cercano al de la ricina en las mismas condiciones (IC₅₀ de 0,1 nM) mientras que en células HeLa es 64,3 nM (unas 60.000 veces superior que la ricina). Ebulina I inhibe también otros sistemas acelulares de biosíntesis de proteínas derivados de tejidos de mamífero. Se han realizado diversos estudios sobre la estructura de los genes que codifican la ebulina I. En las figuras 1.20. y 1.21. se presentan las estructuras primarias deducidas de la secuencia de los genes ebulina I y ricina (Pascal y cols., 2000; Lord y cols., 1994).

		10	20	30	40	50	
1	EBULINA L	MR-VVKAAMLYLHIWVLAIYSVGIQG	-----	ID-----	YPSVSFNL	LAG	37
2	RICINA	MKPGGNTIVIMYAVATWLCFGSTSGWSFTLEDNNIFPRQYPIINFTTAG					50
		60	70	80	90	100	
1	EBULINA L	AKSTTYRDFLKNLRDRVATGTYEVNGLPVLRRSEVQVRNRFVLVRLTNY					87
2	RICINA	ATVQSYTNFIRAVRGRLLTGADVRHEIPVLPNRVGLPINQRFILVELSNH					100
		110	120	130	140	150	
1	EBULINA L	NGDVTVSAVDVTNLYLVAFSANGNSYFFK-DATELQK--SNLFLGTT-QH					133
2	RICINA	AELSVTLALDVTNAYVVGYRAGNSAYFFHPDNQEDAEAITHLFTDVQNR					150
		160	170	180	190	200	
1	EBULINA L	TLSTFGNYDNLETAAGTRRESIELGPNPLDGAI TSLWYDGG-----VA					176
2	RICINA	TFAFGGNYDRLEQLAGNLRENIELGNGP LEEAISALYYSTGGTQLPTLA					200
		210	220	230	240	250	
1	EBULINA L	RSLVLVIQMVPEAARFRYIEQEVRRSLQQLTSFTPNALMLSMENNWSMS					226
2	RICINA	RSFIICIQMISEAARFOYIEGEMRTRIRYNRRSAPDPSVITLENSWGR					250
		260	270	280	290	300	
1	EBULINA L	LEVQLSGDNVSPFSGTVQLQNYDHTPRLVDNFEELYKITGIAILLFRCVA					276
2	RICINA	TAIQES--NQGAFASPIQLQRRNGSKFSVYDVSILIP I--IALMVYRCAP					296
		310	320	330			
1	EBULINA L	TKTTHNAIRMPHVLVGEDNKFN					298
2	RICINA	PPSSQF-----					302

Figura 1.20. Estructura primaria de cadena A de ebulina I y ricina.

		10	20	30	40	50	
1	EBULINA 1	DGETCAIPAPFTRRIVGRDGLCVDVRNGYD TDGTPIQLWPCG--TQRNQQ	48				
2	RICINA	-ADVCMDEPIVIR-IVGRNGLCVDVRDGRFHNGNAIQLWPCRSNTDANQL	48				
		60	70	80	90	100	
1	EBULINA 1	WTFYNDKTIIRSMGKCMTANGLNSGSYIMITDCSTAAEDATKWEVLIDGSI	98				
2	RICINA	WTLKRDNTIIRSNKCLTTYGYSPGVYVMIYDCNTAATDATRWQIWDNGTI	98				
		110	120	130	140	150	
1	EBULINA 1	INPSSGLVMTAPSGASRTTLLLENNIHAASQGWTVSNDVQPIATLIVGYN	148				
2	RICINA	INPRSSLVLAATSGNSGTTLTVQTNIYAVSQGWLPTNNTQPFVTTIVGLY	148				
		160	170	180	190	200	
1	EBULINA 1	EMCLOANGENNNVWMECDVTSVQQQWALFDDRTIRVNNRGLCVTSNGY	198				
2	RICINA	GLCLOAN--SGQVWIEDCSSEKAEQQWALYADGSIRPQQNRDNCLTSDSN	196				
		210	220	230	240	250	
1	EBULINA 1	VSKDLIVIRKCOGLAT-QRWFNSDGSVVNLKSTRVMDVKESDVSLQEVI	247				
2	RICINA	IRETWVKILSCGPASSQRWMEKNDGTILNLYSGLVLDVRASDPSLRQII	246				
		260	270	280			
1	EBULINA 1	IFPATGNFNQQWRTOVPOI	266				
2	RICINA	LYPLHGDPNQIWLPLF---	262				

Figura 1.21. Estructura primaria de cadena B de ebulina I y ricina.

La isoforma ebulina f se aísla de frutos verdes de *S. ebulus*, aunque no se encuentra en los frutos maduros y es algo más activa sobre los ribosomas de lisados de reticulocito de conejo que la ebulina I y también más tóxica en células HeLa (Cítores y cols., 1996a). La baja toxicidad de la ebulina con respecto a ricina en células en cultivo podría deberse a las diferencias en sus cadenas B según se desprende de los estudios cinéticos y de transporte intracelular (Svinth y cols., 1998). La dosis de administración intraperitoneal de ebulina f a ratones es de 2-3 mg/kg de su peso corporal (Jiménez y cols., 2013a), mientras que para la ricina es de 8 µg/kg.

1.3.5.2. Lectinas no antirribosómicas

Se trata de lectinas homodiméricas (Tabla 1.7.) que resultan de la unión de dos cadenas polipeptídicas iguales unidas por un puente disulfuro. En el caso de las formas monoméricas, la cisteína que forma el puente disulfúrico no está presente y no permite formar los dímeros (Girbés y cols., 2008).

Proteína	Parte	Pm aparente
SEA II	Rizomas	33.500
SELfd	Frutos	68.000
SELlm	Hojas	34.000
SELld	Hojas	68.000

Tabla 1.7. Lectinas no RILs de *Sambucus ebulus* L. SEA= Sambucus Ebulus Aglutinin; SEL= Sambucus Ebulus Lectin; f= fruit; l= leaf; m= monomeric; d= dimeric

De las hojas maduras de *S. ebulus* se han aislado como ya se ha comentado dos lectinas, la ebulina I y la lectina dimérica relacionada denominada SELld (Girbés y cols., 1993b; Rojo y cols., 2003). La concentración de cada una de estas proteínas depende del estadio de desarrollo de las hojas, así la ebulina I que aparece en los brotes jóvenes y hojas maduras y progresivamente desaparece al pasar las hojas a estado senescente, por el contrario la SELld que inicialmente en los brotes y hojas jóvenes se encuentra en pequeñas concentraciones, al madurar las hojas aumenta su concentración hasta ser prácticamente la única lectina que se encuentra en las hojas senescentes (Rojo y cols., 2003).

Por otro lado, la ebulina f es una proteína inactivadora de ribosomas similar a ebulina I pero presente en los frutos de *S. ebulus* que tiene la capacidad de polimerizarse a diferencia de otras como la ebulina I de hojas que no lo hace, hecho este que sugiere una función de almacenamiento de proteína (Cítores y cols., 1996a).

1.3.5.3. Inmunotoxinas de ebulina

El desarrollo tumoral precisa del establecimiento de una red vascular atípica que aporte el oxígeno y nutrientes necesarios, mediante la liberación de diferentes mediadores proangiogénicos (Benítez y cols, 2005; Hanahan y Folkman, 1996; Folkman, 1995). El crecimiento de las células cancerosas en el tumor crea una presión positiva que impide la entrada de medicamentos. Esto hace que los tratamientos convencionales de quimioterapia reduzcan su eficacia y pierdan parte de su potencial terapéutico (Benítez y cols., 2005).

Uno de los avances en la terapia experimental contra los tumores consiste en la supresión de la formación de vasos del tumor (neovasculatura) con fármacos dirigidos contra proteínas presentes en la neovasculatura, como los receptores del TGF- β denominado CD105 o endoglina, con inmunoconjugados e inmunotoxinas (Muñoz y cols., 2013). Estos fármacos están constituidos por dos partes, una parte conductora (anticuerpo monoclonal frente a la proteína blanco o una lectina) y una parte efectora tóxica (RIPs, quimioterápicos, isótopos radioactivos) que una vez identificado el blanco celular lo destruye. Las proteínas de *S. ebulus* se han utilizado en la construcción de conjugados e inmunotoxinas (Benítez y cols., 2005; Cítores y cols., 2002).

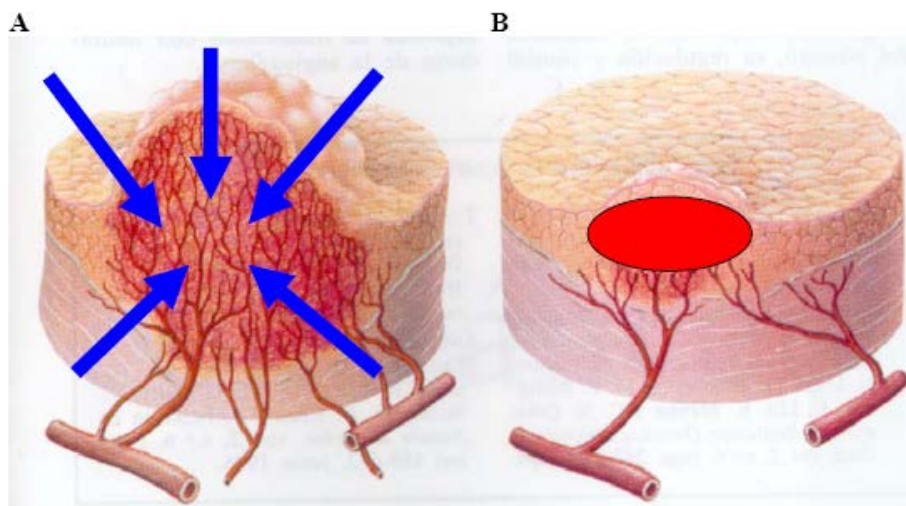


Figura 1.22. Ataque de la neovasculatura tumoral con inmunotoxinas. El tumor presenta una fina capa capilar que nutre la masa tumoral con oxígeno y nutrientes (A). Las inmunotoxinas contra la neovasculatura destruyen la red capilar y provocan el colapso del tumor (B). Girbés, 2009 (modificado de Folkman, 1996).

1.3.5.4. Conjugados de ebulina con transferrina contra células tumorales

Todas las células humanas expresan normalmente el receptor de transferrina (Cheng y cols., 2004). En contraste, las células malignas sobre expresan dicho receptor varias veces más que las células normales (Singh y cols., 2011). Por ello el receptor de transferrina se ha convertido en blanco de la terapia con fármacos diana de diverso tipo (Daniels y cols., 2012).

Las proteínas nigrina b de *S. nigra* y ebulina I de *S. ebulus* se han utilizado para la construcción de conjugados con transferrina humana que han demostrado ser activos frente a células cancerosas creando una ventana terapéutica que podría ser de utilidad en la terapia experimental del cáncer (Cítores y cols., 2002).

OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

Sambucus ebulus L. es una especie muy abundante y de fácil cultivo, con un alto potencial antioxidante por la gran cantidad de compuestos fenólicos que posee. Sin embargo, esta especie al igual que otras del mismo género, posee una serie de proteínas inactivadoras de ribosomas que le confieren una marcada toxicidad.

El objetivo general del presente trabajo experimental y bibliográfico se centra en el desarrollo de formulaciones farmacéuticas tópicas a partir de extractos de *S. ebulus* para su uso en patologías cutáneas que cursen con un componente oxidativo.

Para la consecución de este objetivo, el planteamiento experimental se divide en cuatro etapas:

1. Optimización de los métodos de extracción y fraccionamiento a partir de hojas o frutos de *S. ebulus* en distinto estado de maduración.
2. Caracterización de los extractos en relación al contenido en flavonoides totales, capacidad antioxidante, actividad biológica y caracterización cromatográfica.
3. Elección de la forma farmacéutica de uso tópico adecuada a la composición y características de liberación del extracto seleccionado y elaboración de las distintas variantes de formulación.
4. Caracterización farmacotécnica de las formulaciones obtenidas: estudios de caracterización reológica y de difusión de compuestos fenólicos

MATERIALES Y MÉTODOS

3 MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL DE LABORATORIO

Durante el desarrollo de este trabajo de Tesis Doctoral se utilizan los siguientes equipos de laboratorio:

Equipos.

- Agitador de tubos: BORTIMIXER 68
- Agitador magnético: AGIMATIC-N
- Agitador orbital “GFL 3005” (Burgwedel, Alemania)_ buscar nombre de físicas
- Balanza de precisión: Mettler Toledo AG104
- Balanza: Mettler AJ 100
- Balanza Mettler Pm 34 K Delta® Ranger
- Baño Ultrasonido: P-Selecta Ultrasons-H
- Centrífuga: Beckman Coulter, AVANTI®J-30I
- Centrífuga: EBA 12R
- Centrífuga Sorvall RT 6000 D
- Congelador -24°C: New Pol
- Cronómetro
- Equipo de agua Hellix. Millipore.
- Equipo de Liofilización Telstar Lyo Quest.
- Equipo pHmetro: pH-meter basic 20 + CRISON.
- Espectrofotómetro: Beckman DU-7
- Fluorímetro lector de microplacas FLUOstar Optima, (BMG Labtech, Alemania)
- Máquina de hielo triturado, Scotsman AF-80 (Scotsman, Italia)
- Molinillo Janke & Kunkel IKA Labor Technik A10
- Nevera: PHILIPS
- Pipetas automáticas: GILSON, PhysioCare Concept, BOECO (Germany) Transferpette® (BRAND W-Germany),
- Pipeteador automático:
- Pipeta Multicanal:
- Placa cc 100/20 Placa 96 por cc (Sarsdtedt, Alemania)

➤ Equipos y Material para los cultivos celulares:

Los cultivos celulares se deben realizar en condiciones de esterilidad en un lugar específico para cultivos. El material empleado en este trabajo es el siguiente:

- Autoclave, Trace Raypa Steam Sterilizer, Modelo STERICLAV-S (Raypa, España)
- Baño termostaticado, Modelo Unitronic 320 OR (Selecta Precistern, España)
- Cabina de flujo laminar vertical, Thermo Scientific. (MSC Advantage, España)
- Centrífuga Sorvall RT 6000 Du Pont Instruments (Giralt, EEUU)
- Congelador de -80°C, Modelo 902, Thermo electron corporation. (ULT Freezer, España)
- Eppendorf de 0,5; 1,5 y 2 ml (Sarsdtedt, Alemania)
- Refrigerador y congelador -20°C (Balay, España)
- Incubador termostaticado con gas CO₂, Modelo Heracell 150 (Thermo Electron Corporation, España)
- Microscopio óptico invertido (NIKON TMS, Japón)
- Nitrógeno Líquido, 35 VHC (Taylor-Wharton, Alemania)
- Pipetas estériles (Sarsdtedt, Alemania)
- Frascos de cultivo estériles (Sarsdtedt, Alemania)
- Placas Petri y placas de 96 pocillos estériles (Sarsdtedt, Alemania)
- Tubos estériles de 15 y 50 ml (Sarsdtedt, Alemania)

Material fungible.

- Botellas de vidrio de diversos volúmenes, desde 5 ml hasta 5 litros.
- Cubetas de cuarzo para espectrofotómetro 104-QS Hellma 10mm.
- Cubetas de plástico de espectrofotometría de 4,5ml.
- Embudos
- Eppendorfs de plástico de 1.5 y 2 ml.
- Espátulas.
- Frascos Erlenmeyer de vidrio de diferentes volúmenes.
- Gradillas para tubos Falcon y para microtubos.
- Guantes de látex.

- Imanes agitadores.
- Jeringuillas de plástico.
- Mascarillas.
- Matraces aforados de diferentes volúmenes.
- Membranas de filtración MF Millipore 0,45 μm .
- Mortero de porcelana.
- Papel de filtro convencional (Afora).
- Parafilm.
- Pesa sustancias.
- Pinzas y tijeras de acero inoxidable.
- Pipetas de plástico estériles de 1.5 mL.
- Pipetas Pasteur.
- Probetas de vidrio de diferentes volúmenes.
- Puntas de pipeta automática.
- Tubos de Ensayo.
- Tubos Falcón de 15 y 50 ml.
- Vasos de precipitados de vidrio de diferentes volúmenes.

Reactivos utilizados

Reactivo	Marca
Acetato de amonio	Sigma
Acetato de sodio	Panreac
Acetonitrilo	Scharlau
Ácido acético glacial	Panreac
Ácido clorhídrico	Panreac
Ácido gálico	Sigma
Ácido orto fosfórico	Merck
Ácido sulfúrico	Scharlau
Azul Tripán	Sigma-Aldrich
APPH (2,2'-Azobis(2-dihidro cloro metilpropionamida)	Sigma-Aldrich
Carbonato sódico	Sigma-Aldrich

Carbopol®980	BFGoodrich
Cloruro de cobre II	Sigma
Cloruro sódico	Panreac
DMSO Dimetilsulfóxido	Panreac
DPPH	Sigma
Etanol	Scharlau
Fluoresceína	Sigma-Aldrich
Hexano	Scharlau
Hidróxido sódico	Scharlau
Metanol	Carlo Erba
Metanol	Panreac
MTT	Sigma-Aldrich
Neocuproína	Aldrich
Peróxido de hidrogeno	Sigma -Aldrich
Potasio monohidrogenofosfato.	Panreac
Quercetina	Merck
Quitosano	Chitiner
Reactivo de Folin-Ciocalteu	Sigma
Reactivo de Folin-Ciocalteu	Scharlau
Sodio di hidrógeno Fosfato anhidro	Panreac
Sodio fosfato dibásico	Panreac
Trietanolamina	Acofarma
Tripolifosfato sódico (TPP)	Sigma-Aldrich
Tritón	Sigma-Aldrich
Trolox	Sigma-Aldrich

Todos los reactivos empleados en la realización de este trabajo quedan incluidos en la siguiente tabla, siendo todos ellos de una alta pureza.

3.1. OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

El material vegetal utilizado en este trabajo de tesis doctoral es de la especie *Sambucus ebulus* L. En concreto se han recolectado frutos verdes y maduros y las hojas correspondientes a ambos estados fenológicos (antes y después de senescencia), que se denominaran hoja verde (HV) y hoja madura (HM) por analogía con las otras muestras.

3.1.1 RECOLECCIÓN DE LA ESPECIE VEGETAL Y TRATAMIENTOS PREVIOS.

La recogida de las diferentes partes de las plantas de *S. ebulus* se realizó de forma manual en el municipio de Escalona (Toledo, España). Según datos oficiales de la Agencia Estatal de Meteorología, los principales indicadores climatológicos de la provincia de Toledo corresponden a una temperatura media anual de 15,4°C, la temperatura media de mínimas es de 1,6° C (Enero) y la media de máximas es de 33,6°C (Julio). El mes más frío es enero y el más cálido es julio. Los meses más lluviosos corresponden, por este orden, a mayo y a noviembre siendo la precipitación media anual de 357 mm.

En la tabla 3.1 se muestran los datos correspondientes a los meses de recogida del material biológico y las dimensiones del mismo.

<i>S. ebulus</i>	Mes de recogida	Largo (mm)	Ancho (mm)
Hojas jóvenes	Mayo	100 mm	55 mm
Hojas maduras	Agosto	130 mm	60 mm
Frutos verdes	Julio	4 mm	3 mm
Frutos maduros	Agosto	6 mm	5 mm

Tabla 3.1. Descripción de las diferentes partes del *S. ebulus* L recolectadas

Las características del lugar son adecuadas para el crecimiento espontaneo de esta especie vegetal ya que se encuentra situada al borde de una eminencia formada de capas arcillosas y areniscas (drenaje lento): altitud: 550 metros sobre el nivel del mar; coordenadas: 40°10'15"N 4°24'19"O. La recolección se realizó durante los meses de abril a

julio del 2014. Los ejemplares fueron autenticados taxonómicamente por D. José Manuel Sobrados Ferradal y depositados en el Herbario MAF del Departamento de Biología Vegetal II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, con número “MAF 176062”.

Para evitar cualquier alteración sobre la composición de la planta, las hojas se desecaron inmediatamente después de su recolección. Para ello el material recién recolectado, fue extendido en una habitación aireada protegida de la incidencia directa de la radiación solar, a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) y fue mantenido en dichas condiciones hasta pesada constante (RFE, 2015). Por último, se trocearon para tener más superficie de contacto y facilitar el procedimiento de extracción y se conservaron en bolsas antihumedad herméticas, en desecadores, en un lugar seco y protegidos de la luz y la humedad. Por su parte los frutos se congelaron directamente a -24°C después de su recolección. La desecación se realizó directamente antes de llevar a cabo la extracción siguiendo el mismo procedimiento anterior hasta llegar a peso constante.

3.1.2 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y SELECCIÓN DE FRACCIONES DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EXENTAS DE RIPS TÓXICAS

3.1.2.1. Optimización del proceso de extracción

Antes de realizar ningún ensayo de determinación o cuantificación de los extractos de origen vegetal se tiene que tener la seguridad absoluta de utilizar el mejor método de extracción para garantizar el mejor rendimiento del proceso. Para ello realizamos dos ensayos preliminares, utilizando los dos métodos de extracción más citados en la bibliografía partiendo de pequeñas cantidades de muestra.

Método de extracción A: (método de elección)

▪ Reactivos:

- NaCl (Panreac, España).
- NaH₂PO₄ (Panreac, España).
- NaOH (Scharlab, España).
- Agua Milli-Q.

- ##### ▪ Procedimiento: Se partió de 25g de las distintas partes recogidas de *S. ebulus*, esto es, hojas antes y después de la senescencia, frutos verdes y maduros.

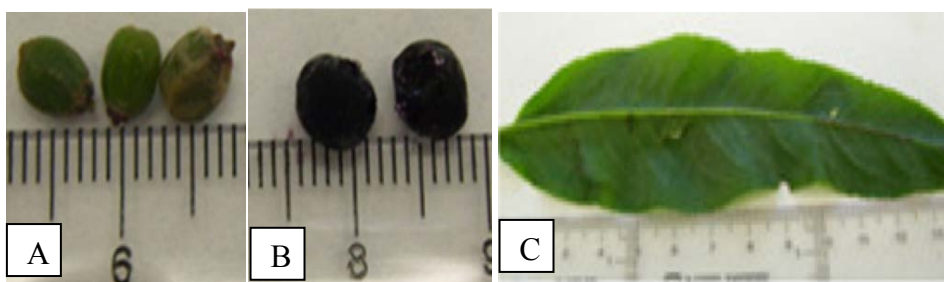


Figura 3.1. Partes utilizadas de la planta. (A) frutos verdes, (B) frutos maduros, (C) hojas.

Los frutos verdes se trituraron en un mortero de porcelana en presencia de 100 mL de solución tampón de extracción (NaCl 0,28 M, fosfato monosódico 5 mM (Panreac, España) pH=7,5). El resto de las partes se trituraron en un molinillo (Analysemmühle A10 JANKE y KUNKEL) en pequeñas cantidades y posteriormente se le añadieron 100 mL de

solución tampón para frutos maduros y 250 mL para las hojas. La extracción se realizó con agitación constante a una temperatura de 4° C durante 30 minutos.

El extracto obtenido se filtró con doble gasa de nylon y el filtrado se sometió a una primera centrifugación durante 45 min a 3.500 rpm (Beckman Coulter Avanti® Centrifuge) J-30I a 2° C. Se recuperó el sobrenadante y se sometió a una segunda centrifugación durante 30 min a 3.500 rpm a 2° C. El sobrenadante se filtró a través de papel de doble capa con pliegues y se valoró el contenido en fenoles totales y capacidad antioxidante por Folin-Ciocalteu del filtrado resultante. Además se midieron los volúmenes recogidos de los diferentes extractos “extracto crudo” y se almacenaron a -24° C hasta su análisis.

Método de extracción B: establecido por el Programa de Ciencia y Tecnología para el desarrollo (CYTED), con ligeras modificaciones, este método se base en la extracción con disolventes de polaridad creciente, sometiendo la droga a maceración con posterior percolación.

▪ Reactivos:

- Hexano (Sigma-Aldrich).
- Etanol (Shcharlau, España).
- Agua milli-Q

▪ Procedimiento: se pesaron y trituraron 2 g de hojas de *S. ebulus* con un molinillo (Janke y Kunkel IKA Labortechnik A10), posteriormente se añadieron 15 mL de hexano con el fin de eliminar los compuestos lipófilos. La droga se mantuvo en maceración durante 24 horas desechando el filtrado. El marco se dejó secar durante 48 horas en oscuridad y a temperatura ambiente.

Una vez transcurrido ese tiempo se realizó una segunda extracción con una mezcla polar, etanol: agua 8:2 (V/V), dejando macerar esta vez durante 72 horas a temperatura ambiente.

Al finalizar el periodo de extracción, se obtuvo el extracto hidroalcohólico por percolación y se valoró su contenido en fenoles totales y capacidad antioxidante por Folin-Ciocalteu para compararlo con el método de extracción A.

3.1.2.2. Análisis fitoquímico a de los extractos:

El análisis fitoquímico se realizó sobre los dos extractos obtenidos, el extracto en tampón salino y el extracto hidroalcohólico, con el fin de compararlos y escoger el que garantice un mayor rendimiento del proceso de extracción en compuestos polifenólicos.

La valoración de polifenoles totales se realizó de acuerdo al método de Folin-Ciocalteu (FC) con algunas modificaciones (George y cols., 2005).

▪ Reactivos

- Carbonato de sodio Na_2CO_3 (Sigma-Aldrich)
- Reactivo de Folin-Ciocalteu (Panreac, España)
- Ácido gálico (Sigma, España)
- Agua Milli-Q

▪ Procedimiento: se preparó una disolución de 500 mL de carbonato sódico anhidro en agua de concentración 75 g/L. En un matraz aforado de 25mL se añadieron 0,5 mL de muestra (extracto de hojas), 0,5 mL de reactivo de Folin (diluido en 10 partes de agua), 10 mL de la disolución de carbonato sódico anhidro y se enrasó con agua destilada hasta 25 mL. La solución resultante se mantuvo en oscuridad durante una hora, tiempo necesario para que la reacción se complete, y después se analizó la absorbancia a 750 nm. La concentración de polifenoles se determinó por extrapolación del valor obtenido en la recta de calibrado, para ello se utilizó el ácido gálico como patrón y los resultados se expresaron en g/L ácido gálico.

▪ Recta de calibrado: se preparó una disolución de 100 mL de ácido gálico de concentración 4 g/L (solución madre). A partir de ésta se obtuvieron las disoluciones estándar de 20, 100, 160, 320, 400, 480 ppm, con las que se elaboraron la recta de calibrado. Para ello se tomaron 0,5 mL de cada una de las disoluciones patrón, 0,5 mL de reactivo Folin, junto con 10 mL de la disolución de carbonato sódico 75g/L y se enrasaron con agua destilada hasta llegar a un volumen final de 25 mL.

Tanto las muestras como las disoluciones patrón se agitaron y se dejaron reposar durante 1 hora. Pasado ese tiempo se midió la absorbancia en cubetas de cuarzo a una $\lambda=750$ nm en el espectrofotómetro Beckman DU- 7.

Los resultados correspondientes al contenido fenólico total de la muestra (**T**) se expresaron como ppm equivalentes de ácido gálico por mg de muestra (**GAE**), extrapolando las concentraciones de las dos extracciones a partir de la recta de regresión absorbancia / concentración del ácido gálico (ppm).

$$T = (C \times V \times DF) / m$$

siendo **C**, la concentración de cada extracto obtenida de la recta de regresión; **V**, el volumen inicial en el que se disuelve el extracto; **DF**, el factor de dilución y **m**, el peso de la muestra.

3.1.2.3. Liofilización

La liofilización se llevó a cabo en 5 mL de extracto previamente congelado, en el departamento de Nutrición y Bromatología II de la Facultad de Farmacia de la UCM, en un equipo “Telstar Lyo Quest” modelo Cryodos a una temperatura de -45°C y presión de 0,1 bar. Las muestras estuvieron protegidas de la luz durante todo el proceso para evitar el deterioro de las sustancias fotolábiles. Una vez finalizado el proceso de liofilización se pesan los viales y por diferencia de peso se calculó la pérdida de humedad. Los viales se taparon y envolvieron en parafilm y fueron almacenados en desecadores dentro de nevera. Para su reconstitución se empleó PBS (pH =7,5), y se determinó su contenido en polifenoles totales por el método Folin- Ciocalteu, comparando el valor obtenido con el del extracto puro.

3.1.3 MICROENCAPSULACIÓN DE EXTRACTOS EN BASE QITOSANO

3.1.3.1 Qitosano: características, propiedades y aplicaciones

El quitosano es un polímero natural que se obtiene a partir de la quitina, uno de los biopolímeros más abundantes en la naturaleza. La quitina forma parte de la estructura de soporte de numerosos organismos vivos, tales como artrópodos (crustáceos e insectos), moluscos y hongos. Se trata además de un subproducto importante de la industria pesquera y cervecera, que en los últimos años ha encontrado gran cantidad de aplicaciones, especialmente en la industria alimentaria y biotecnológica (Okuyama y cols., 2000).

La quitina está formada por unidades de 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucosa unidas por enlaces β -(1 \rightarrow 4). La obtención de quitosano a partir de quitina se realiza por desacetilación de la misma, dejando libre el grupo amino del carbono 2, si bien este proceso nunca llega al 100% (Peter, 1995). Es por ello que el quitosano es un copolímero de 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucosa y 2-amino-2-deoxy- β -D-glucosa (Figura 3.2.).

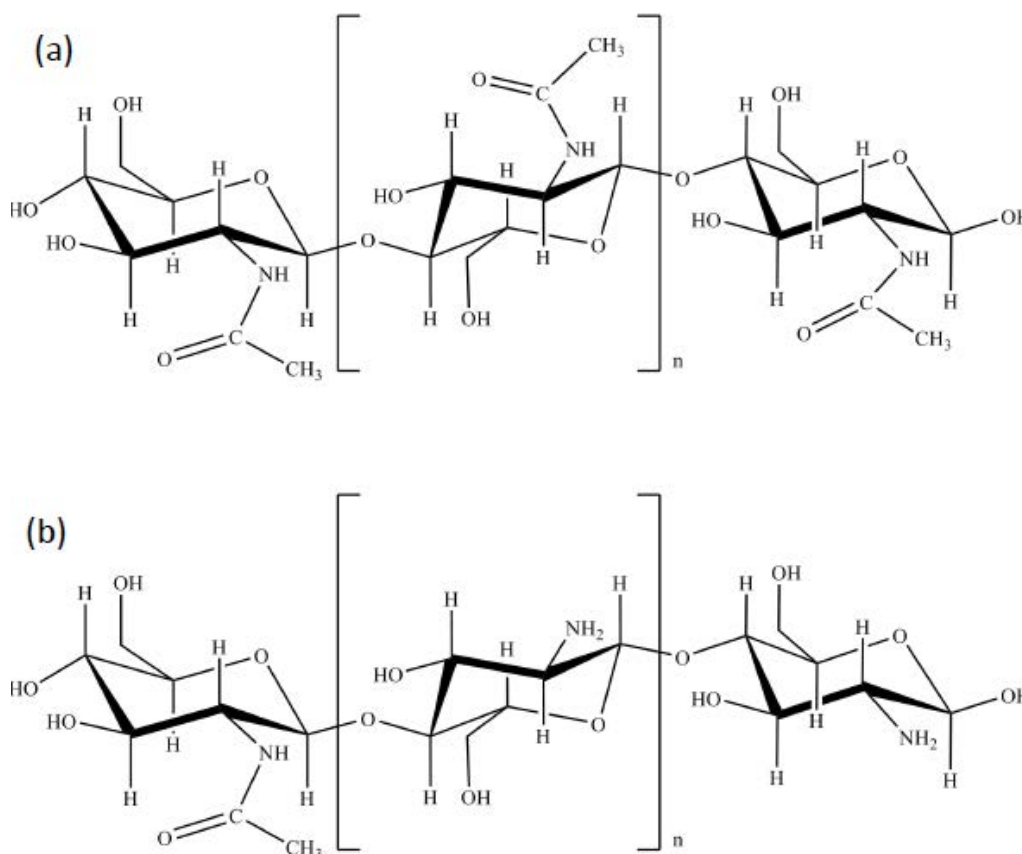


Figura 3.2. Estructura de la quitina (a) y del quitosano (b).

La fuente y el método de obtención determinan la composición de las cadenas de quitosano y su tamaño. Las principales propiedades físico-químicas del quitosano que determinan sus propiedades funcionales son su grado de desacetilación y su peso molecular promedio, aunque la cristalinidad, el contenido de agua, cenizas y proteínas también han de ser consideradas.

El porcentaje de grupos amino que quedan libres en la molécula de quitosano está estrechamente vinculado con su solubilidad. Así, como consecuencia de la hidrólisis del grupo N-acetilo, aumenta la capacidad hidrofílica del quitosano y pasa a ser soluble en soluciones ácidas diluidas (acético, fórmico, clorhídrico, entre otros) ya que el pKa del grupo amino del quitosano es de 6,5 (Acosta y cols., 1993). La protonación de los grupos amino del quitosano en medio ácido le confiere un carácter altamente reactivo.

Algunas de las propiedades funcionales del quitosano son: biodegradabilidad, biocompatibilidad, mucoadhesión, capacidad filmogénica, hemostático, promotor de absorción, actividad antimicrobiana, anticolesterolémica y antioxidante (Aranaz y cols., 2009). Estas propiedades funcionales han promovido su utilización en diversos ámbitos. En agricultura, el quitosano se ha descrito como antiviral en plantas y como aditivo en fertilizantes. Así mismo se ha investigado como agente quelante de metales en agricultura e industria y como agente filmogénico en cosmética (Agulló y cols., 2004). También ha sido utilizado en la industria papelera, en la textil y en el tratamiento de aguas residuales (No y Meyers, 2000). En la industria alimentaria se puede utilizar como ingrediente funcional y como fibra alimentaria. Además, tiene la capacidad de unirse a grasas, por lo que se utiliza como agente hipocolesterolémico en productos dietéticos (Aranaz y cols., 2009). Ha sido altamente utilizado en el campo de la biomedicina debido a su actividad inmunoestimuladora, propiedades anticoagulantes, acción antibacteriana y antifúngica (Helander y cols., 2001) y por su acción como promotor de la cicatrización de heridas (Kumar y cols., 2004).

Debido a su carácter catiónico y a sus propiedades gelificantes y filmogénicas, el quitosano ha sido estudiado en la industria farmacéutica por su potencial en el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos (Illum, 1998; Shy y Zhu, 2000). En este sentido, hay que destacar que el hidrocloreto de quitosano fue aprobado por las autoridades e incluido en la Farmacopea Europea en el año 2002.

La toxicidad oral del quitosano es muy baja. En este sentido, Hirano y cols., 1990, han descrito una LD₅₀ de 16g/kg en ratas. Sin embargo, por otras rutas de administración como la ocular, puede causar problemas de irritabilidad y daño tisular moderado que podrían condicionar su uso (Calderón y cols., 2013)

En los últimos años, el estudio del quitosano se ha centrado sobre todo en mejorar la liberación y la absorción de las llamadas biomoléculas terapéuticas, como son los fármacos proteicos (Agnihotri y cols., 2004). Existen resultados contradictorios sobre la mayor eficiencia del quitosano en solución, en polvo o en forma de nanopartículas en la liberación *in vivo*. En general, se ha visto que la eficiencia de la absorción de macromoléculas en mucosas utilizando nanopartículas de quitosano como vehículo de encapsulación es inferior a la obtenida con formulaciones de quitosano en solución o en polvo (Dyer y cols., 2002).

3.1.3.2 Micropartículas en base quitosano

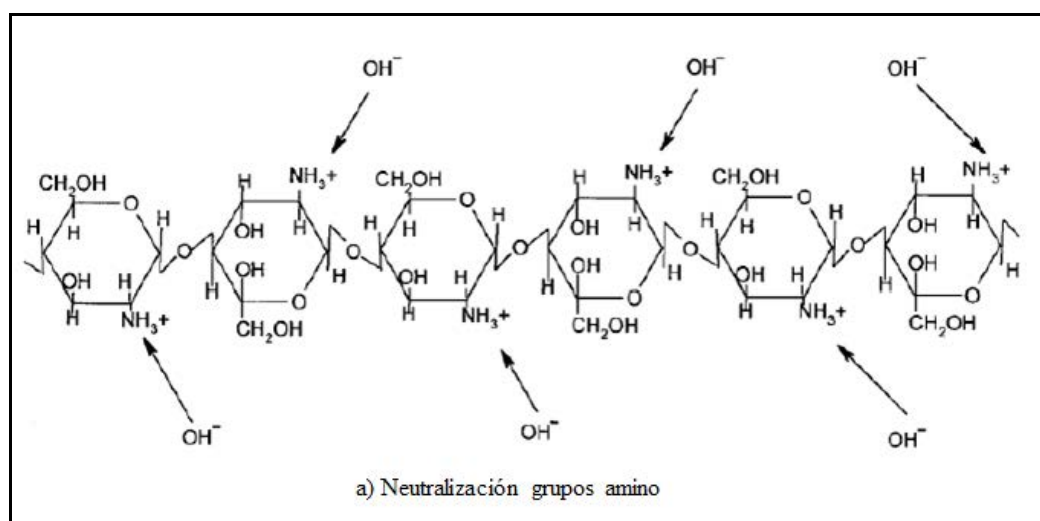
El uso de sistemas microparticulados para la encapsulación de fármacos permite el transporte de éstos al lugar de acción terapéutica, el incremento de su vida media y su liberación controlada en el tiempo. Además, al ser partículas pequeñas, presentan una elevada superficie específica (Sinha y cols., 2004). Las microesferas son sistemas homogéneos en los que el fármaco está disperso en una matriz polimérica, a diferencia de las microcápsulas, en las que el principio activo se encuentra rodeado por una capa de polímero.

Las microesferas de quitosano constituyen uno de los sistemas de liberación controlada de fármacos más estudiados, tanto para su administración parenteral como por vía oral. En su formulación se ha de considerar que la liberación del fármaco que vehiculizan depende de la densidad de la matriz polimérica. Es decir, modificando la concentración y del peso molecular del polímero e incorporando copolímero y agentes entrecruzantes se pueden obtener sistemas de encapsulación con los perfiles de liberación adecuados en cada caso.

El entrecruzamiento puede reducir la solubilidad del quitosano en solventes acuosos, aumentar su resistencia a la degradación química o biológica y ayudar a controlar la liberación de principios activos desde la matriz formada. El glutaraldehído es un agente entrecruzante muy utilizado, pero su capacidad de transformación en especies reactivas

tóxicas ha promovido la búsqueda de otros agentes y procedimientos de entrecruzamiento más seguros, como es el tripolifosfato sódico (TPP) (Muzzarelli, 2009). El TPP es entrecruzante no tóxico clasificado como GRAS por la FDA, que es capaz de formar geles al unirse con el quitosano por interacción iónica. Desde que (Bodmeier y cols., 1989) describiesen la preparación de complejos quitosano/TPP, la formación de complejos entre estas moléculas con cargas opuestas para obtener formulaciones que controlan la liberación de fármacos ha granado interés puesto que se trata de un proceso muy simple. Concretamente, la formulación de micropartículas por interacción iónica entre el quitosano y el tripolifosfato sódico es muy común porque implica la mezcla de dos fases acuosas a temperatura ambiente sin el uso de solventes orgánicos.

La reacción que se produce entre el quitosano y el TPP ha sido descrita en la bibliografía (Park y cols., 2002; Mi y cols., 1999). El TPP ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$) tiene cinco pKa: $\text{pK}_1=1$, $\text{pK}_2=2$, $\text{pK}_3=2,79$, $\text{pK}_4=6,47$ y $\text{pK}_5=9,24$. En agua se disocia en iones tripolifosfóricos ($\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$, $\text{HP}_3\text{O}_{10}^{4-}$ y $\text{H}_2\text{P}_3\text{O}_{10}^{3-}$) y en OH^- y la solución resultante tiene pH 9. Al añadir la solución de TPP (pH 9) a una solución de quitosano (pH ácido), los iones $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ y $\text{HP}_3\text{O}_{10}^{4-}$ compiten con los OH^- por reaccionar con los grupos NH_3^+ del quitosano por entrecruzamiento iónico, en el caso de los iones tripolifosfóricos o por desprotonación, en el caso de los OH^- (Figura 3.3). En otras palabras, a pH 9 habrá por tanto grupos amino neutralizado por los grupos hidroxilo y grupos amino entrecruzados iónicamente.



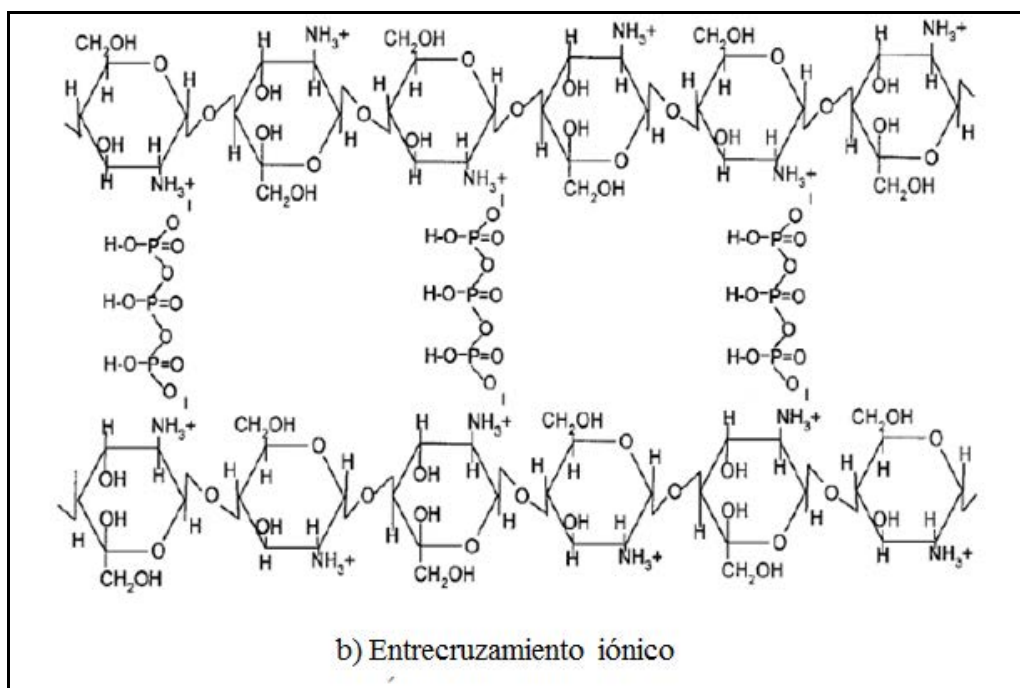


Figura 3.3. Esquema de la reacción entre el quitosano en solución ácida y los iones de TPP: A neutralización de los grupos amino, B entrecruzamiento iónico (Mi y cols., 1999) .

Sin embargo, si el pH del TPP es ajustado a un pH ácido, sólo existirán iones tripolifosfóricos. El tipo de iones tripolifosfóricos y su proporción vendrán dados por el pH de la solución. En este caso, el complejo quitosano-TPP se forma exclusivamente por entrecruzamiento iónico entre los grupos NH_3^+ y los aniones de TPP.

Además de controlar la liberación de principios activos, las micropartículas en base quitosano mejoran la biodisponibilidad de sustancias degradables como las proteínas y promueven la absorción de fármacos hidrosolubles a través de las membranas epiteliales. El uso de promotores de absorción de fármacos en las formulaciones farmacéuticas está siendo objeto de estudio actualmente para mejorar la liberación de fármacos a través de las mucosas. Los promotores empleados suelen ser polímeros multifuncionales con propiedades mucoadhesivas, capaces de abrir transitoriamente las uniones intercelulares en el epitelio, que no muestren toxicidad y que no se absorban, siendo el quitosano uno de los polímeros más estudiados. Illum y cols., (1994) estudiaron el efecto de una solución de quitosano de alto peso molecular sobre el transporte de insulina a través de la mucosa nasal en ratas y ovejas. Sus resultados fueron prometedores y desde entonces se han realizado

muchos estudios sobre el potencial del quitosano para mejorar la absorción de fármacos peptídicos a través de las mucosas. Por otro lado también se ha estudiado la administración nasal de antígenos en soluciones de quitosano y quitosano en polvo y se ha visto que promueven la respuesta inmune del organismo. (Illum y cols., 2001) evaluaron en humanos una vacuna nasal de la gripe basada en una solución de quitosano. Más del 70% de los voluntarios presentaron niveles protectores tras la administración intranasal.

El efecto positivo del quitosano sobre la liberación de fármacos a través de los epitelios se debe a una combinación entre sus propiedades mucoadhesivas y su capacidad para abrir las uniones estrechas (del inglés “*tight junctions*”) entre células epiteliales, facilitando así el transporte de fármacos, sobre todo fármacos macromoleculares, a través del epitelio.

Los epitelios actúan como barreras que separan al organismo del medio externo, de forma que incluso el movimiento de iones a través del epitelio está restringido, dando lugar a diferencias de potencial eléctrico. Las moléculas pueden atravesar el epitelio de varias formas:

- Por transporte pasivo o difusión, que se produce a favor de gradiente de concentración o gradiente de carga eléctrica y que, por lo tanto, no supone un gasto de energía para las células. La difusión pasiva puede producirse a través de la membrana celular (transporte transcelular) o entre células adyacentes (transporte paracelular).
- Por transporte activo, mecanismo que permite a la célula transportar sustancias a través de su membrana desde regiones menos concentradas a otras más concentradas. Es un proceso que requiere energía.

Las moléculas lipofílicas atraviesan fácilmente la membrana celular por difusión pasiva. Sin embargo, las moléculas hidrofílicas no pueden atravesar la membrana hidrofóbica, por lo que tienen que atravesar el epitelio por la vía paracelular. Esta vía está restringida por la presencia de las uniones estrechas, estructuras multiproteicas dinámicas y complejas que constituyen una barrera semipermeable, que restringe la difusión dependiendo de la carga y el tamaño del soluto. En el epitelio, las uniones estrechas se encuentran en la membrana plasmática en células adyacentes (Figura 3.4.) y forman una estructura continua que rodea a las células completamente. Las uniones estrechas del

epitelio forman una barrera funcional y morfológica entre las superficies apical y basolateral de las células y regulan la difusión a través de la vía paracelular (Matter y Balda, 2003).

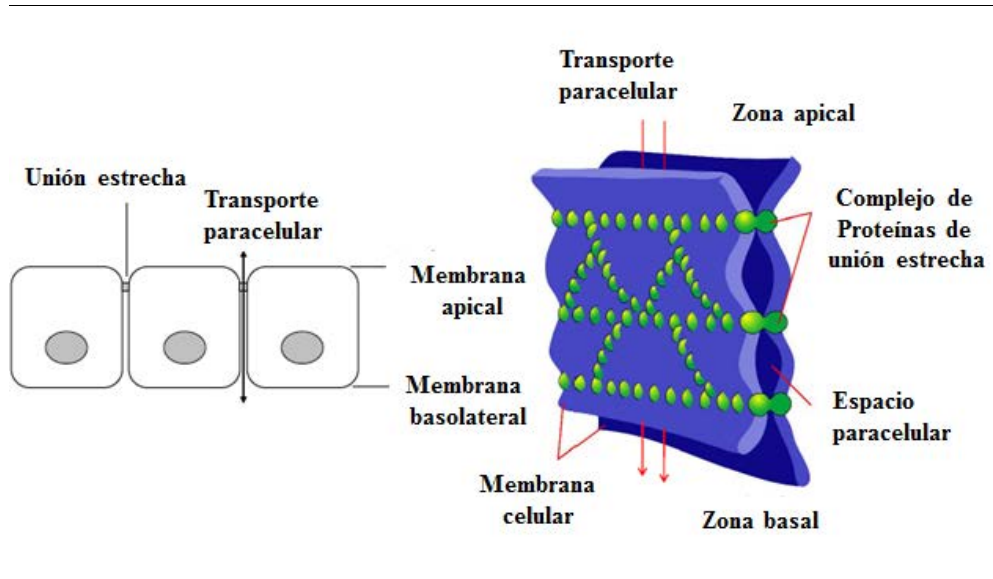


Figura 3.4. Representación esquemática de las uniones estrechas entre células epiteliales y el transporte paracelular.

La unión estrecha está formada por un grupo de proteínas transmembrana y citosólicas que no sólo interactúan entre ellas, sino también con la membrana celular y el citoesqueleto de actina, de modo que forman un sistema que une a los componentes de las uniones estrechas con el citoesqueleto. Existen varios tipos de proteínas distintas dentro del grupo que forma parte de las uniones estrechas (Matter y Balda, 2003). La ocludina es una de las proteínas integrales de membrana que forma parte de las uniones estrechas. Por un lado proporciona la integridad estructural de la unión y por otro regula su función de barrera. Hay estudios que asocian las ocludinas a la regulación de la difusión de pequeños marcadores hidrofílicos, por lo que están implicadas en la regulación de la dinámica de las uniones. Las claudinas son las principales responsables del ensamblaje de las bandas formadas por las uniones estrechas y de la formación de rutas selectivas de difusión paracelular de iones, ya que diferentes proteínas de la familia de las claudinas permiten el paso de distintos tipos de iones.

Se conocen tres proteínas citosólicas, ZO-1, ZO-2 y ZO-3 (del latín *zónula occludens*, que significa unión estrecha), denominadas proteínas asociadas a uniones estrechas, que interactúan entre ellas y ponen en contacto la unión estrecha con el citoesqueleto. Además se ha descrito que regulan la función de la unión estrecha junto con la ocludina. El estado

de fosforilación de estas proteínas reguladoras se ha asociado con diferencias en la permeabilidad en modelos *in vitro*. Las mismas rutas de señalización cuyo efecto final es la fosforilación de dichas proteínas pueden también afectar al citoesqueleto de actina, asociado a la membrana plasmática por un grupo de filamentos de actina situado debajo de la unión estrecha y por un anillo de filamentos a nivel de la unión de adhesión que también contiene miosina II. La disrupción del citoesqueleto está asociada con la apertura de las uniones estrechas y por tanto, al aumento de la permeabilidad paracelular (Ward y cols., 2000). Smith y colaboradores (2005) describieron que la habilidad del quitosano en solución y en nanopartículas para modular las uniones estrechas se puede explicar por las posibles interacciones del quitosano con receptores específicos de la superficie celular que conlleva la activación de la transducción de señales dependiente de la proteína quinasa C (PKC). La activación de la PKC además induce la pérdida de asociación de las proteínas de las uniones estrechas, la ZO-1 y la ocludina, en la membrana plasmática y, por tanto, la pérdida de las uniones estrechas. (Ranaldi y cols., 2002) también demostraron que el tratamiento con quitosano alteraba la distribución de F-actina en células Caco-2.

Existen varios métodos para la obtención de microesferas, como son (Dhawan y cols., 2004): gelificación ionotrópica, precipitación, atomización o *spray-drying*, coacervación simple, coacervación compleja, entrecruzamiento químico o térmico y emulsión.

La atomización es un proceso de evaporación de solvente que ampliamente utilizado en industria farmacéutica para producir polvos secos, gránulos y aglomerados a partir de soluciones y suspensiones. Esta técnica se puede utilizar tanto para fármacos resistentes al calor como para fármacos sensibles, para fármacos solubles o insolubles en agua y para polímeros hidrofílicos o hidrofóbicos (Fu y cols., 2001). Se trata de un proceso de una sola etapa que se puede escalar fácilmente, es de bajo coste, produce partículas de pequeño tamaño y permite reformular las partículas en forma de suspensiones, cápsulas o comprimidos (Zgoulli y cols., 1999). Las microesferas obtenidas tienen un tamaño de una micra a varias decenas de micras y son adecuadas para su administración por las vías oral, nasal o parenteral (He y cols., 1999; Chawla y cols., 1994; Illum y cols., 1994). Los parámetros del proceso de atomización, como son el tipo de aguja, la velocidad de la bomba y el flujo de air comprimido, permiten modular el tamaño de partícula.

▪ Reactivos:

- Quitosano: Quitosano (CS), suministrado por Primex (Islandia), con un peso molecular de 644 kDa y un grado de desacetilación del 90%.
- Tripolifosfato sódico (TPP), suministrado por Sigma- Aldrich (España).
- Ácido acético (Panreac)
- Ácido clorhídrico
- Acetato de Sodio (Panreac)
- Agua Milli-Q
- Folin- Ciocalteau (Panreac)
- Carbonato Sódico (Panreac)

▪ Procedimiento:

Se prepararon soluciones de quitosano en buffer Rinaudo (0,3M ácido acético y 0,2M acetato sódico, pH = 4,5) en concentración (0,1% p/v) y se dejaron en agitación 24 horas. Posteriormente se añadió el 10 o 30% p/p de liofilizado de hojas maduras de *S. ebulus*.

Las soluciones resultantes se atomizaron en un Büchi Mini Spray- Dryer B- 290 (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Suiza), representado en la Figura 3.5. Se utilizaron las siguientes condiciones: temperatura de entrada (inlet) 180°C, temperatura de salida 90°C, velocidad de flujo 80% y velocidad de bombeo 20%. Las microesferas resultantes se recogieron del colector y fueron almacenadas en un desecador Pyrex[®] (Afora S.A., Barcelona, España) a temperatura ambiente.

En el proceso de atomización, el líquido llega a la aguja gracias a la bomba peristáltica y la fuerza del aire comprimido lo separa en gotas, que pasan a una cámara donde es evaporado el solvente. El solvente de las gotas es retirado debido a la energía calorífica producida por el atomizador. Se obtiene una eficiencia óptima de atomización cuando existe un equilibrio entre la energía de entrada y la cantidad de energía necesaria, que depende de la muestra que se atomice. Puesto que el punto de ebullición del agua es 100°C, la temperatura de entrada del atomizador debe ser mayor. Se ha descrito en la bibliografía que la temperatura de entrada óptima para la preparación de microesferas a partir de soluciones de quitosano es de 160 °C. A temperaturas inferiores o velocidades de flujo altas, el solvente de las gotículas no se evapora completamente.

En el caso de las microesferas entrecruzadas, antes del proceso de atomización, se añadió además el agente entrecruzante. Se utilizaron dos concentraciones de TPP (0,1 y 0,2% p/v) en una proporción de volumen 10:1. El rendimiento de atomización (RA) se calculó a partir de la cantidad total de sólidos iniciales en la solución.



Figura 3.5. Atomizador Büchi Mini Spray- Dryer B- 290.

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica UCM

Para determinar la eficiencia de encapsulación (EE) de las microesferas obtenidas por atomización, se tomaron 5mg de microesferas y se disolvieron en 20 mL de HCl 0,1N durante 24 horas. De ahí se tomó una alícuota que se centrifugó a 10000rpm (Mikro 12-24, Hettich Zentrifugen, Andreas Hettich GmbH y Co KG, Tuttlingen, Alemania) y se determinó la cantidad de fármaco presente por el método de Folin-Ciocalteu.

Los estudios de liberación *in vitro* de las micropartículas se realizó suspendiendo 50 mg de microesferas en 5 mL de fluido gástrico simulado (SGF) sin enzimas dentro de una bolsa de diálisis de celulosa de 12000 Da de diámetro de poro (Sigma- Aldrich, Madrid, España) para evitar la pérdida de microesferas durante la toma de muestras. La bolsa se introdujo después en un recipiente que contenía 50 mL de SGF, a 37°C y 100 rpm de agitación. Se tomaron muestras de 0,5 mL a intervalos de tiempo predeterminados y fueron filtradas a través de un filtro de jeringa de acetato de celulosa de 25 mm de diámetro y 0,20 μm de diámetro de poro (Albet, Barcelona, España).

3.2. MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN DE EXTRACTOS

3.2.1. DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES

La cuantificación de los flavonoides se realizó con el liofilizado de las distintas partes del *S. ebulus* por el método descrito por Kostennikova Z, (1992) con ligeras modificaciones.

▪ Fundamento: los flavonoides son un grupo de compuestos fenólicos muy extenso derivados del núcleo benzo- γ -pirano. Poseen varios grupos hidroxilos enlazados a estructuras anulares, C₆-C₃-C₆, que poseen un gran número de grupos hidroxilos formando glicósidos, son polares, por lo que son ligeramente solubles en disolventes polares, como el metanol, etanol, acetato de etilo o agua. La cuantificación de flavonoides en productos naturales usualmente se hace mediante cromatografía de capa fina, cromatografía de gases, cromatografía líquida de alta resolución o espectrofotometría. Los métodos por cromatografía de gases y de alta resolución aportan información definitiva en la caracterización de las muestras pero presentan limitaciones importantes debido a los costos del equipamiento. En cambio, los métodos espectrofotométricos permiten cuantificar flavonoides con estructuras similares y son convenientes y apropiadas en las 19 determinaciones rutinarias.

▪ Reactivos:

- Ácido sulfúrico (Scharlau)
- Agua Milli-Q
- Etanol (Scharlau)
- Quercetina (Merck)

▪ Procedimiento: se pesó un equivalente a 0,5 g del liofilizado de las distintas partes de la droga (hojas jóvenes, hojas maduras, frutos verdes y maduros) y se introdujeron en cartuchos tapados con algodón por los dos lados dentro del cuerpo de Soxhlet. A continuación se añadió una mezcla a partes iguales de ácido sulfúrico al 10% p/v y etanol al 50% v/v, hasta sifonar y se llevó a reflujo durante 2 horas en Soxhlet controlando la temperatura y la ebullición.

Después se dejó enfriar y se filtró a vacío. El residuo se lavó con 60 mL de etanol al 50% v/v, para desecharlo finalmente. El filtrado se concentró en baño maría hasta la mitad del volumen inicial y se enfrió sobre baño de hielo durante 1 hora. A continuación se filtró, lavando el precipitado formado con porciones de 20 mL de agua bidestilada fría (10-15°C), Se eliminó el filtrado y los lavados, y el residuo tanto del filtro como del recipiente, se disolvió con 70 mL de etanol 96°, calentando previamente a 50 °C; la solución se pasó a una matraz aforado de 100 mL y se enrasó con etanol 96°. La solución obtenida se analizó por espectrofotometría UV a 258 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-7. El proceso se realizó por triplicado.

El blanco consistió en una solución de etanol 96° y como patrón se empleó una solución de 8 µg/mL de quercetina en el mismo disolvente.

La expresión empleada para el cálculo fue la siguiente:

$$X = \frac{A_m \times P_R \times F_D \times 5}{A_R} \times 100$$

donde:

X: Contenido de flavonoides totales expresados como quercetina (%).

A_m: Absorbancia de la solución muestra (nm).

P_R: Peso de la sustancia de referencia (g).

FD: Factor de Dilución.

A_R: Absorbancia de la solución de referencia (nm)

3.2.2. CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

3.2.2.1. Método CUPRAC

La denominación “CUPRAC” procede del acrónimo inglés “Copper Reducing Antioxidant Capacity”, con este procedimiento se midió la capacidad antioxidante (CA) de las distintas partes en estudio del *S. ebulus*. (Apak y cols., 2007).

- **Fundamento:** este método está basado en la reducción de Cu (II) a Cu (I) por la acción combinada de todos los antioxidantes (agentes reductores) en una muestra. Para realizar el ensayo de CUPRAC se utilizó como reactivo la neocuproína (2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline). Estos complejos tienen una solubilidad muy limitada en agua y por tanto deben ser disueltos en disolventes orgánicos como el etanol. En este caso se empleará el reactivo Cu (II)- neocuproína [Cu (II)-Nc] como agente oxidante cromogénico.

La reacción que tiene lugar es la siguiente: los protones liberados pueden neutralizarse con la solución de acetato amónico. En esta reacción los polifenoles (-OH) se oxidan a las correspondientes formas quinónicas (= O) y el Cu (II)-Nc es reducido a Cu (I)-Nc que es muy coloreado y muestra un máximo de absorción a 450 nm.

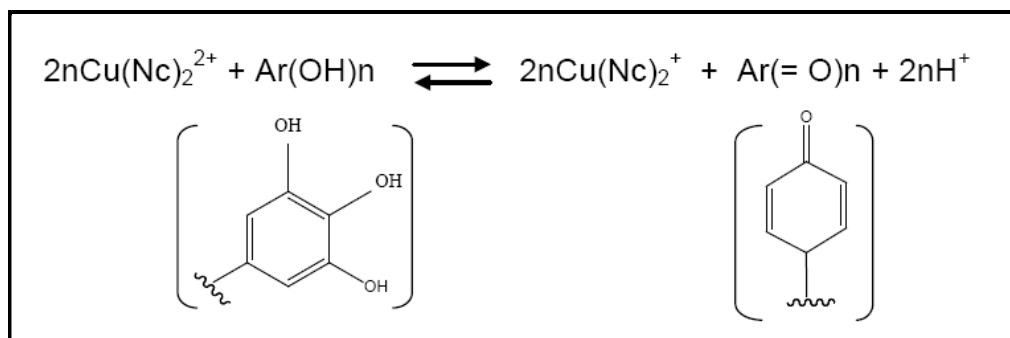


Figura 3.6. Reacción del método CUPRAC. (Girbés y Jiménez, 2010).

- **Reactivos:**
 - Acetato amónico (Sigma, España).
 - Ácido gálico (Sigma, España).
 - Agua Milli-Q.
 - Cloruro de cobre (II) (Sigma, España)
 - Etanol 96 % (Sharlau)
 - Neocuproína (Nc) 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina (Aldrich, España).

- Procedimiento: para poder determinar la capacidad antioxidante se realizó una curva patrón. Para ello se prepararon varios tubos de ensayo a los cuales se le añadió distintos volúmenes de la disolución de referencia, en este caso es el ácido gálico 1 mM (20-80 μ L), también se añadió a cada tubo 1 mL de cloruro de cobre (II) 10 mM, 1 mL de neocuproína 7,5 mM en etanol, 1 mL de acetato de amonio 1 M (pH = 7), y la cantidad correspondiente de agua Milli-Q para alcanzar un volumen final de 4 mL, homogeneizando en vórtex durante unos segundos y dejando en reposo durante una hora. Una vez transcurrido ese tiempo se midieron las absorbancias a 450 nm en el espectrofotómetro Beckman DU-7.

La medida de los diferentes extractos del *S. ebulus* se realizó sustituyendo en el método el patrón de ácido gálico, por 50 μ L de los extractos de frutos verdes, hojas antes y después de senescencia y 30 μ L del extracto de fruto maduro. Para los cálculos se tuvo en cuenta el volumen de extracto utilizado y el volumen de extracto de partida (extracto crudo). Los resultados se extrapolaron en la curva de calibrado de ácido gálico 1 mM y expresando los resultados en μ g equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra seca.

3.2.2.2. Método de Folin-Ciocalteu

La determinación de fenoles totales se realizó siguiendo el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, utilizando ácido gálico como compuesto de referencia (Singleton y Rossi, 1965).

- Fundamento:

Los fenoles reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu dando un color azul propio de la reacción con fenoles. El reactivo se adquiere ya preparado de las casas comerciales y contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico que reacciona con restos fenólicos presentes en las proteínas (tirosinas) y en compuestos como ácido gálico y sus derivados, flavonoides, etc.

Uno de los polifenoles más sencillos es el ácido gálico y sus derivados (Fig. 3.7.). Este ácido en forma de resto galoilo se encuentra en multitud de polifenoles y por eso se utiliza como compuesto de referencia en este método de determinación de fenoles totales.

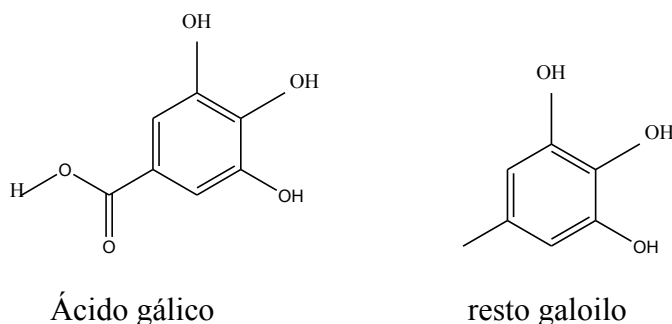


Figura 3.7. Ácido gálico y sus derivados

El ácido fosfomolibdotúngstico (formado por las dos sales en el medio ácido), de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso, es el que medimos a una longitud de 750 nm.

Es un método de medida de contenido en fenoles totales y otros compuestos que no siendo fenólicos, muestran una cierta capacidad de reacción. Esta reacción es una medida también de la capacidad antioxidante, por lo que en muchos trabajos se ha asimilado como un método de determinación de capacidad antioxidante.

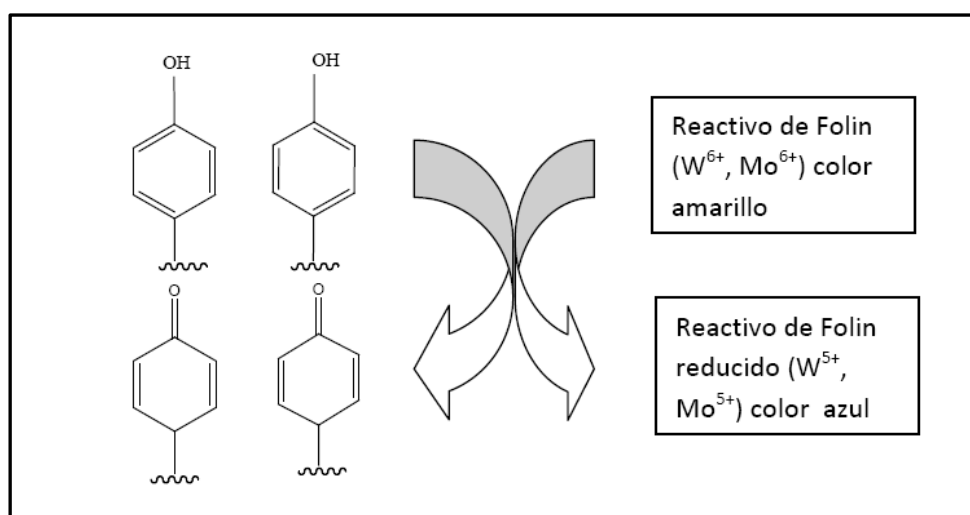


Figura 3.8. Reacción de Folin – Ciocalteu. (Girbés y Jiménez. 2010)

▪ Reactivos:

- Ácido gálico (Sigma, España).
- Agua Milli-Q.
- Carbonato sódico Na₂CO₃ (Sigma-Aldrich, España).
- Reactivo de Folin - Ciocalteau (Sigma, España).

▪ Procedimiento: para realizar la recta patrón se utilizaron tubos de ensayo previamente forrados de papel aluminio y se les añadió 60, 120, 180 o 240 µL de ácido gálico de concentración 2,5mM, 1800 µL de solución de carbonato sódico al 7,5 % y el agua correspondiente para alcanzar un volumen total de 3900 µL. Posteriormente se añadieron 600 µL de reactivo Folin–Ciocalteu a cada tubo, se agitaron en el vórtex y se dejaron reposar durante una hora en oscuridad, tiempo suficiente para que la reacción haya terminado. Pasado ese tiempo se midieron las absorbancias a una λ de 750 nm en el espectrofotómetro Beckman DU-7.

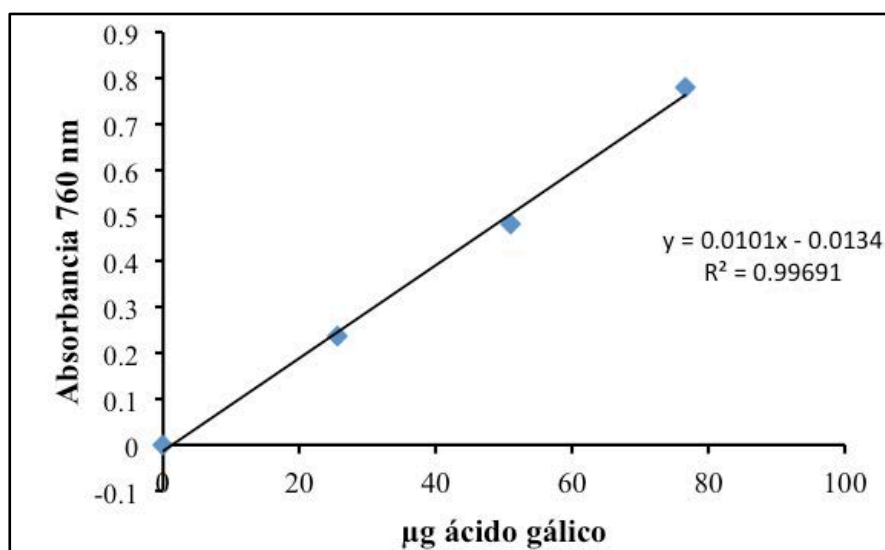


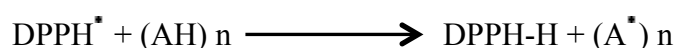
Figura. 3.9. Recta patrón de ácido gálico 2,5 mM

La medida de los diferentes extractos del *S. ebulus* se realizó sustituyendo en el método, el patrón de ácido gálico, por un volumen de extracto, 300 µL de frutos verdes, maduros y hojas antes y después de senescencia. Para los cálculos se tuvo en cuenta el volumen de extracto utilizado y el volumen de extracto de partida (extracto crudo). Los resultados se interpolaron en la curva de calibrado de ácido gálico 2,5 mM y se expresan en µg equivalentes de ácido gálico por gamo de droga seca.

3.2.2.3. Método de DPPH

Otro procedimiento para estimar la actividad antioxidante de las muestra es la utilización del DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo), radical orgánico nitrogenado y estable de coloración púrpura, que se pierde progresivamente en presencia de sustancias antioxidantes, se produce un descenso de la absorbancia del radical DPPH a 515 nm, (Brand-Williams y cols., 1995).

▪ Fundamento: este procedimiento se basa en la capacidad que tiene un compuesto antioxidante de donar átomos de hidrogeno al compuesto DPPH•, pasando éste a su forma reducida:



La deslocalización del electrón desapareado otorga al DPPH• una coloración violeta caracterizada por una banda de absorción, en solución metanólica, centrada alrededor de λ 515 ± 10 nm. La coloración desaparece cuando entra en contacto con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno o con otra especie radicalaria (R•), originándose la forma reducida DPPH-H O DPPH-R. La pérdida de absorbancia de DPPH• proporciona un índice para estimar la capacidad de los compuestos ensayados como captadores de radicales libres. La reacción se mide a los 10 minutos del inicio, ya que en este intervalo, la mayoría de sustancias completan la reacción con el DPPH. El ensayo DPPH es un método rápido y sencillo.

▪ Reactivos:

- Agua Milli-Q.
- Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) (Sigma-Aldrich)
- DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) (Sigma)
- Metanol (Panreac, España).

▪ Procedimiento: el DPPH sólo puede disolverse en un medio orgánico por eso se utilizó el metanol como disolvente y la concentración utilizada fue la de 0,1 mM. La cuantificación se realizó empleando una solución patrón de Trolox 1mM en metanol. Para realizar la recta patrón se añadieron 25, 50, 75 y 100 µL de solución de Trolox 1 mM en metanol en distintos tubos además de 2.900 µL de DPPH 0,1 mM en metanol a cada tubo y

la cantidad de metanol al 80% correspondiente para obtener un volumen final de 3 mL. Se agitaron los tubos y una vez transcurridos los 10 minutos se midió la absorbancia a 515 nm. La medida de los extractos se realizó sustituyendo en el método, el patrón de Trolox por un volumen determinado de extracto (50 μ L). Los resultados se interpolaron en la curva de calibrado de Trolox (1 mM) y se expresan en μ g equivalentes de Trolox por gamo de muestra seca. Los ensayos se realizan en cuatro extractos diferentes y 6 réplicas cada uno de ellos.

3.2.2.4. Método de ORAC

La actividad captadora de radicales libres de los extractos de *S. ebulus* se determinó por el método ORAC siguiendo el protocolo de Xu y Chang (2008) con ligeras modificaciones. Este método determina la capacidad antioxidante de la muestra problema frente al daño oxidativo producido por los radicales peroxilos (usados como pro-oxidantes) (Cao y cols., 1993). Para ello se utilizó un espectrofluorimetro Optima Fluostar (BMG Labtechnologies Gmb, Offenburg, Alemania).

- Fundamento: la metodología se basa en la pérdida de fluorescencia en presencia de radicales peroxilo generados por descomposición térmica del AAPH (2,2'-Azobis 2-dihidro cloro metilpropionamida) (Ou y cols., 2001). Según el método descrito por Dávalos y cols., 2004.

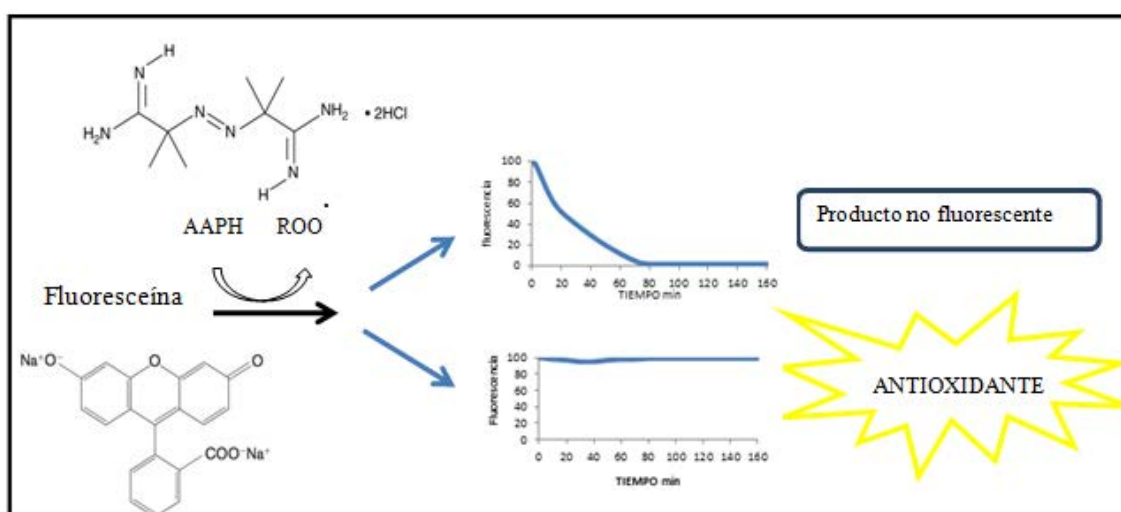


Figura 3.10. Capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC). Pérdida de fluorescencia en presencia de ROS y mantenimiento de la fluorescencia en presencia de antioxidantes.

Los compuestos con actividad antioxidante, son capaces de neutralizar los radicales peroxilo mediante la donación de un átomo de hidrógeno, evitando su reacción con la fluoresceína y por ello la disminución de fluorescencia.

▪ Reactivos:

- 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro (AAPH) (Sigma-Aldrich)
- Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) (Sigma-Aldrich)
- Fluoresceína (Sigma-Aldrich)
- Metanol (Panreac Química)
- Tampón PBS [$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} + \text{K}_2\text{HPO}_4$] (Panreac Química).

▪ Procedimiento: las muestras liofilizadas de las distintas partes de *S. ebulus* se disolvieron en PBS (1 mg/mL) (K_2HPO_4 , NaH_2PO_4) (Panreac Química, S.A.) y a partir de dicha solución, se prepararon diluciones en PBS (75 mM; pH 7,4) (Figura 3.11.). El antioxidante usado como referencia fue el Trolox, ácido 6-hidroxi-2,5, 7,8 tetrametilcroman-2-carboxílico (Sigma-Aldrich, España), análogo sintético hidrosoluble de la vitamina E.

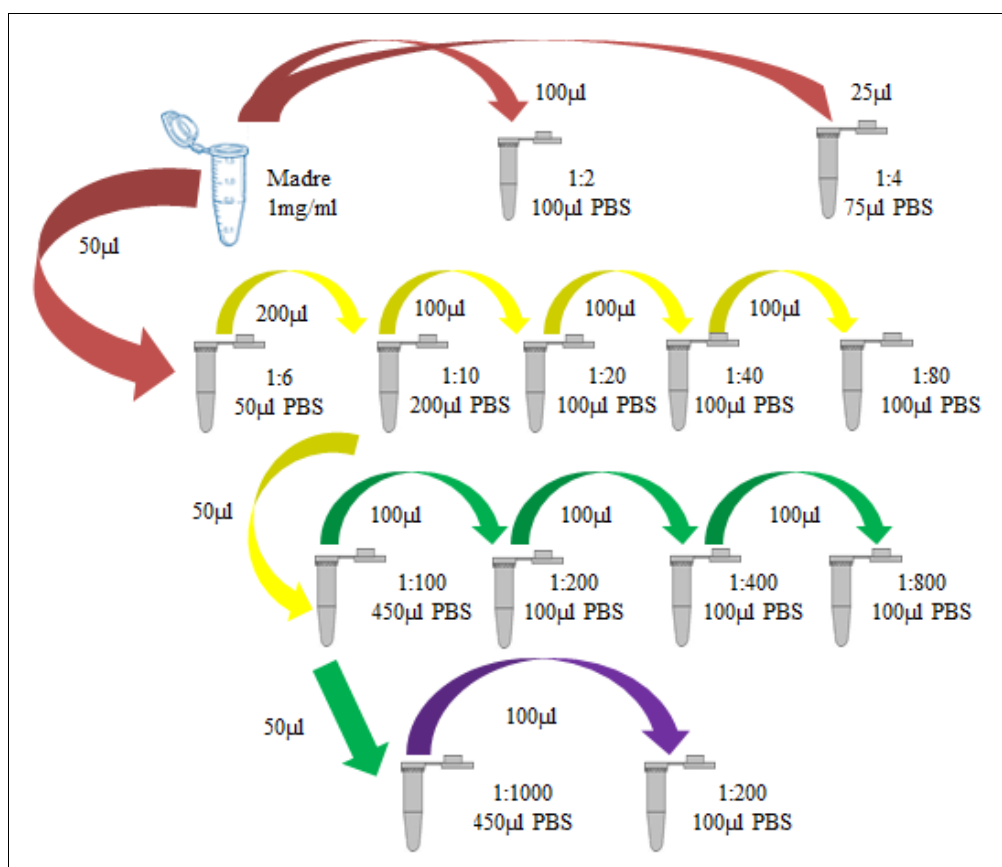


Figura 3.11. Esquema diluciones ORAC

En placa de 96 pocillos de poliestireno negro (Biogen Científica S.L, Madrid, España) se depositaron 20 μ L de las distintas concentraciones de *S.ebulus*, 20 μ L de tampón fosfato (blanco) y distintas concentraciones de Trolox (1-8 mM), en orden creciente de concentración de menor a mayor según un orden determinado y que se refleja detallado en la figura 3.12.

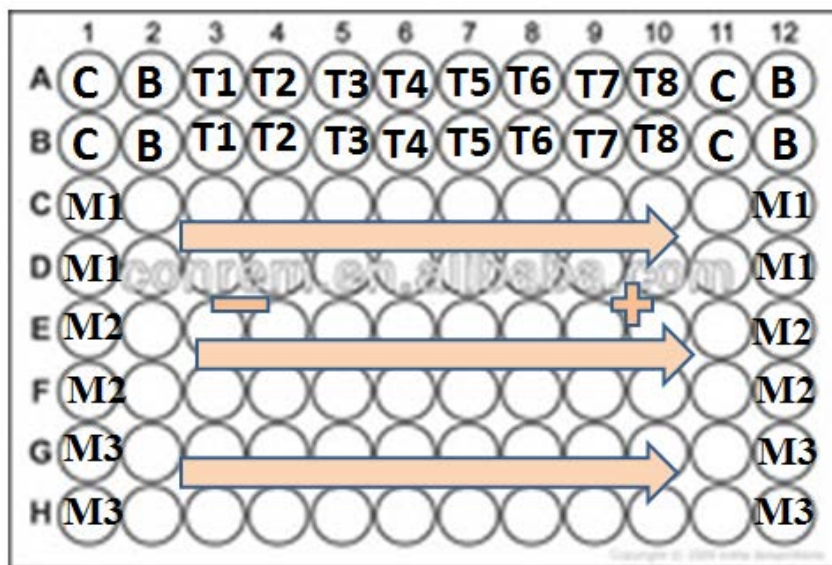


Figura 3.12. Placa de 96 pocillos donde C= Control, B= Blanco, T1-T8 = Trolox a distintas concentraciones, M1, M2, M3 = las distintas muestras

A continuación se añadieron 120 μ L de fluoresceína (Sigma-Aldrich España) a todos los pocillos (concentración final 70 nM), y se mantuvo la placa en incubación a 37 $^{\circ}$ C durante 10 minutos. Seguidamente se añadió 60 μ L del azocompuesto generador de radicales APPH (Sigma-Aldrich, España) (concentración final 12 mM).

La fluorescencia se mide en un lector de microplacas OPTIMA FLUOstar fluorimétrico (BMG LABTECH GmbH, Alemania) a una longitud de onda λ_{exc} = 485 nm y λ_{em} = 520 nm. Se registra cada 90 segundos durante 2 horas y media en un total de 104 ciclos. El lector de microplacas de fluorescencia se controla por Software FLUOstar (V2.20 R7).

La pérdida de la fluorescencia a lo largo del tiempo se cuantifica mediante la fórmula que determina el área bajo la curva (AUC):

$$AUC=1+\Sigma f_i/f_0$$

Donde,

f_0 : es la fluorescencia inicial medida a tiempo 0.

f_i : es la fluorescencia medida a un tiempo determinado.

Después se determinó el área bajo la curva neta (AUC) para cada muestra:

$$AUC \text{ total} = AUC \text{ antioxidante (Trolox o muestra)} - AUC \text{ del blanco}$$

De este modo se calcularon las ecuaciones de la recta de regresión correspondientes al área neta y a la concentración del antioxidante en estudio. Los resultados se expresaron en micromoles equivalentes de Trolox / mg de muestra en estudio, siendo la concentración de antioxidante de las muestras proporcional a la intensidad de la fluorescencia en el ensayo (Ou y cols., 2002; Tomer y cols., 2007).

Todas las muestras se prepararon por duplicado y se realizaron seis ensayos independientes.

3.2.3. CARACTERIZACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR Y LA CAPACIDAD PROTECTORA EN CULTIVOS CELULARES

3.2.3.1. Líneas celulares

Se utilizaron cultivos celulares de astrocitos de glioblastoma humano de grado III, líneas celulares U-373-MG. Se trata de células de aspecto estrellado, que se adhieren bien a los frascos de cultivo utilizados y cuyo crecimiento se produce en monocapa.

3.2.3.2. Inductor de estrés oxidativo

El tóxico seleccionado para favorecer la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), es el peróxido de hidrógeno [H₂O₂] (Sigma-Aldrich, España), siendo el radical hidroxilo que se forma el responsable de los efectos citotóxicos. El peróxido de hidrógeno origina radicales libres por la reacción de Haber-Weiss: O₂⁻ + H₂O₂ → O₂ + ·OH + OH⁻, se produce un incremento del estrés oxidativo, que a su vez produce un incremento en la formación de radicales libres. Estos últimos juegan un papel importante en la degeneración y muerte neuronal en la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas (Halliwell, 1992). Para inducir el estrés oxidativo sobre la línea celular U373-MG, la concentración utilizada es de 1 mM. Dichas concentraciones fueron establecidas por el equipo de investigación del departamento de Farmacología (Farmacognosia y Farmacología Experimental) de la Facultad de Farmacia de la UCM en trabajos previos. Estas concentraciones ocasionan el 50% de la mortalidad (IC₅₀) (Naval, 2006).

3.2.3.3. Cultivos celulares

Las células se encontraban conservadas a -196 °C, en viales de 2 mL, se descongelaron de forma rápida para evitar la formación de cristales. Para ello se introdujeron en un baño a 37°C, agitando durante un tiempo máximo de 1 minuto. En campana de flujo laminar, el contenido del vial se metió en un tubo falcon de 50 mL que contenía 9 mL del medio de crecimiento Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM-C) libre de piruvato: 4,5 g/L de glucosa, L-glutamina y 25 mM HEPES, con un 10 % de suero fetal bovino (FBS) y 0,5%

de gentamicina (50 mg/mL). Se resuspendieron bien con pipeta y se centrifugó a 800 rpm durante 5 minutos. A continuación, se retiró el medio y de nuevo se añadieron 10 mL de medio DMEM-c. Se sembraron dos frascos de cultivo y se mantuvieron en un incubador (Heracell 150) a 37°C, 5% CO₂. El medio de cultivo se cambió a las 24 horas de la descongelación para retirar las células muertas y los restos de glicerol que puedan afectar al crecimiento. Pasados diez días de la descongelación, las células estuvieron preparadas para ser utilizadas en los diferentes ensayos. En todos los casos, el mantenimiento de los cultivos se realizó cambiando el medio del cultivo cada 2 o 3 días. Se trabajó con pases de células entre 1 y 29. Para mantener la supervivencia celular durante los tratamientos con las diferentes muestras se utilizó medio DMEM de mantenimiento (DMEM-m) de igual composición al medio de crecimiento excepto por contener 1% FBS.

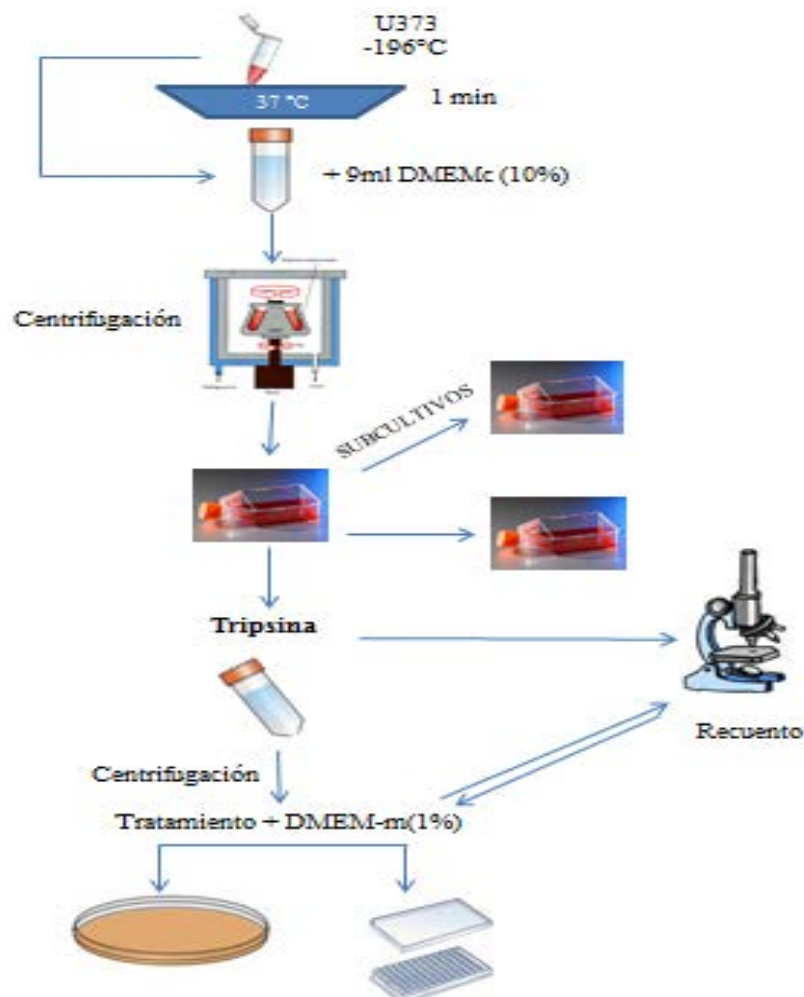


Figura 3.13. Descongelación de cultivos celulares

Una vez preparadas las células para su uso, se retiró el medio de cultivo con pipetas Pasteur y se lavaron las células con 5 mL de PBS exento de calcio y magnesio (los iones calcio y magnesio inhiben la acción de la enzima tripsina). Para despegar las células de su soporte (frasco de cultivo), después de retirar el PBS se añadió 1600 µL de tripsina- EDTA y se mantuvo el frasco en el incubador durante 3-4 minutos. Pasado este tiempo, se observó al microscopio de contraste de fases el cambio en la morfología celular (de forma estrellada a forma redonda) como indicador de su desprendimiento. A continuación se añadieron 10 mL de DMEM-c para inactivar la acción de la tripsina. La suspensión de células se centrifugó en tubo Falcon a 800 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 10 mL de DMEM-c. De esta forma, la suspensión celular quedó preparada para la realización de los diferentes ensayos.

Si las células no fueran a ser empleadas inmediatamente, es conveniente realizar subcultivos de forma que puedan mantenerse en condiciones de crecimiento adecuadas.

- Subcultivos celulares:

Cuando las células alcanzaron el 80% de confluencia, se realizaron subcultivos celulares (pases) con el fin de mantenerlas en condiciones de replicación normal. Para ello, se eliminó el medio de cultivo y se lavaron las células con PBS sin calcio ni magnesio. Se tripsinizaron las células con una solución de tripsina-EDTA durante 3-4 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo, se inactiva la tripsina añadiendo 10 mL de medio correspondiente. En el caso de Las líneas celulares U373-MG requieren de un paso más en el procedimiento. Así estas células se centrifugaron a 800 rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se añadió 10 mL del correspondiente medio. Finalmente se procedió al cultivo de las células tras el recuento celular para ello se procedió al reparto de la suspensión celular en dos o tres nuevos frascos de 75 cm². El medio de cultivo se cambió cada 2 ó 3 días hasta llegar a una nueva confluencia.

- Congelación celular o criopreservación:

Para la conservación de las células no utilizadas, tras contrastar su buen funcionamiento se procedió a su congelación en medio constituido por una mezcla de FBS con glicerol al 10%. El glicerol es un medio crioprotector que favorece el proceso de vitrificación, proceso de congelación por el cual se solidifica el agua sin que se formen cristales, evitando el daño celular (Ameigeiras y Gil-Loyzaga, 2011).

En una primera etapa los viales se introdujeron en un congelador a -20°C durante 24 h. Pasado este tiempo se trasladaron a un congelador de -80°C (Hetofrig CL410, Escandinavia) donde se almacenaron durante un tiempo no inferior a una semana ni superior a ocho. Para conservaciones más prolongadas es necesario emplear nitrógeno líquido (-196°C). La velocidad de congelación de las células debe ser gradual para minimizar el daño celular. Si es muy rápida, la célula no es capaz de deshidratarse, favoreciéndose la formación de hielo intracelular. Por el contrario, si la velocidad de enfriamiento, es lenta, conlleva a una deshidratación extrema de la célula pudiéndose llegar al colapso celular (Mazur, 1984).

3.2.3.4. Recuento de células viables in vitro

- Fundamento:

El número de células viables in vitro se determinó mediante la técnica de exclusión con azul tripan en cámara Neubauer (Keith y Elliot, 1979). Dicho colorante tiñe de forma selectiva las células muertas, mientras que las vivas, al presentar intacta las membranas citoplasmáticas impiden el paso del colorante al interior celular.

- Reactivos:

- Azul tripan (Sigma-Aldrich).

- Procedimiento:

La cámara se cargó con 90 µL de la suspensión celular y 10 µL de azul tripan. La conversión del número de células/cámara en células/mL se lleva a cabo empleando la siguiente ecuación:

$$\text{Células totales} = \frac{X \cdot 10^4 \cdot d \cdot V}{5}$$

Siendo **X**, el número de células contadas en los cinco cuadrantes sombreados de la cámara de Neubauer dispuesto en L; **10⁴** el factor de conversión de la cámara, **d**, el factor de dilución (10) y **V**, el volumen total de suspensión en mL. El número de células necesario para cada ensayo se ha de ajustar previamente.

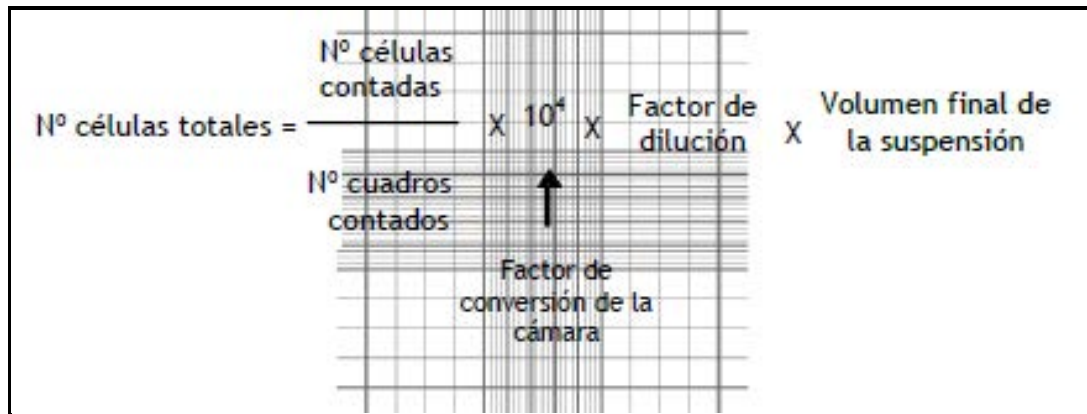


Figura 3.14. Cámara de Neubauer. Distribución de los cuadrantes que la componen.

▪ Material para el cultivo celular:

Los cultivos celulares se deben realizar en condiciones de esterilidad en un lugar específico para cultivos. El material empleado en este trabajo es el siguiente:

- Autoclave, Trace Raypa Steam Sterilizer, Modelo STERICLAV-S (Raypa, España)
- Baño termostático, Modelo Unitronic 320 OR (Selecta Precistern, España)
- Cabina de flujo laminar vertical, Thermo Scientific. (MSC Advantage, España)
- Centrífuga Sorvall RT 6000 Du Pont Instruments (Giralt, EEUU)
- Congelador de -80°C, Modelo 902, Thermo Electron Corporation. (ULT Freezer, España)
- Eppendorf de 0,5; 1,5 y 2 mL (Sarsdtedt, Alemania)
- Frigorífico y congelador -20°C (Balay, España)
- Incubador termostático con gas CO₂, Modelo Heracell 150 (Thermo Electron Corporation, España)
- Microscopio óptico invertido (NIKON TMS, Japón)
- Nitrógeno Líquido, 35 VHC (Taylor-Wharton, Alemania)
- Pipetas estériles (Sarsdtedt, Alemania)
- Frascos de cultivo estériles (Sarsdtedt, Alemania)
- Placas Petri y placas de 96 pocillos estériles (Sarsdtedt, Alemania)
- Tubos estériles de 15 y 50 mL (Sarsdtedt, Alemania)

3.2.3.5. Determinación de la viabilidad celular mediante la técnica del MTT

La actividad biológica se determinó en diluciones consideradas activas (5, 10, 25, 50 y 100 µg/mL) de los extractos liofilizados de frutos maduros y hojas senescentes. Dichas diluciones se prepararon a partir de soluciones madre 1 mM en PBS exento de calcio y magnesio, disolviendo previamente los compuestos en 10µL de dimetilsulfóxido (DMSO) (Panreac, España). Las soluciones madre se mantuvieron a 4°C y protegidas de la luz.

▪ **Fundamento:** la determinación de la viabilidad celular mediante el ensayo de reducción de MTT, se realizó siguiendo el método original de Mossmann (1983) con algunas modificaciones. Esta técnica se basa en la modificación del color originado como consecuencia de la apertura del anillo de la sal de tetrazolio “reducción” del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) a formazán (Takahashi y col., 2002). Las células vivas poseen deshidrogenasas mitocondriales que son capaces de transformar la sal de MTT en un derivado, el formazán, que adopta la forma de cristales de color azul-violáceo insolubles en agua pero que se solubilizan con disolventes orgánicos, como dimetilsulfóxido (DMSO). La intensidad de la coloración esta en relación directa con la viabilidad celular y puede ser medida por colorimetría a 550 nm. Los resultados se expresaron como porcentaje de viabilidad, considerando el 100% de viabilidad la media de las absorbancias de los pocillos correspondientes a las células no tratadas. Como control negativo se empleó tritón X-100 (Sigma-Aldrich, España) tóxico que provoca mortalidad celular. (Mosmann, 1983; Liu y cols., 1997; Takahashi y cols., 2002).

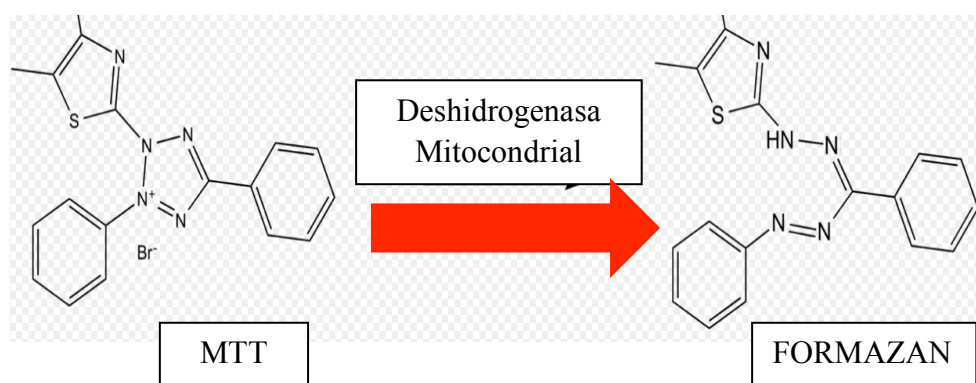


Figura 3.15. Reducción del MTT. La sal de tetrazolio se reduce a formazán por las deshidrogenasas mitocondriales.

▪ Reactivos:

- Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (Sigma-Aldrich).
- Dimetilsulfóxido (DMSO) (Panreac Química S.A.).
- Solución de fosfato salino (PBS) (Invitrogen).
- Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, España).

▪ Procedimiento:

1.- Efecto de los extractos de *S. ebulus* sobre la integridad y actividad funcional de las mitocondrias de las células.

Las líneas celulares U373-MG se sembraron en placas de 96 pocillos con una intensidad de (5 x 10⁴ células/pocillo) y se incubaron 37°C y 5% de CO₂ durante 24 horas. Una vez transcurrido ese tiempo, las células se trataron con diferentes concentraciones de los extractos en estudio (rango de concentraciones de 2.5-500 µg/mL) durante 24 horas. A continuación, se añadieron 100 µL/pocillo de una mezcla de una disolución de MTT (2 mg/mL en PBS (Sigma-Aldrich, España)) y medio DMEM al 10%. Las células se mantuvieron en incubación a 37°C durante 1 hora (incubador Heraeus D-6450 Hanu, Alemania). Los cristales de formazán formados se disolvieron por adición de 100 µL de DMSO (Panreac, España) en cada pocillo con agitación vigorosa de la placa para asegurarse una completa solubilización. La medición se realiza espectrofotométricamente a una longitud de onda de 550 nm. La viabilidad celular se expresa como porcentaje de reducción de MTT, considerándose como 100% la media de las absorbancias de los pocillos con células no sometidas a ningún tratamiento (control).

2.- Efecto de los extractos sobre la integridad y actividad funcional de las mitocondrias de las células en un modelo de estrés oxidativo inducido por H₂O₂:

El procedimiento seguido fue el mismo que el desarrollado en el apartado anterior, con la diferencia de que las células se sometieron a estrés oxidativo producido por H₂O₂. A las 24 horas del pretratamiento con diferentes concentraciones de los extractos en estudio (2,5; 5 y 10 µg/mL) Para las hojas maduras y (5; 10 y 25 µg/mL) para los frutos maduros, las células se fueron expuestas a H₂O₂ durante 30 minutos. 24 horas después, se realizó el ensayo de MTT en las mismas condiciones experimentales del apartado anterior.

3.2.4. CARACTERIZACIÓN CROMATOGRÁFICA MEDIANTE HPLC

La identificación de los principales compuestos fenólicos en *S. ebulus* se realizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), una técnica de separación cromatográfica basada en la diferencia de distribución de las especies entre dos fases no miscibles, en la que la fase móvil es un líquido que atraviesa por percolación una fase estacionaria contenida en una columna. En el caso del HPLC se le puede integrar un método analítico de detección como la espectrofotometría UV-visible, que se basa en que determinadas sustancias, en función de su estructura, son capaces de absorber a determinadas longitudes de onda. Para analizar una sustancia, se debe realizar un barrido a diferentes longitudes de onda, y detectar los máximos de absorción.

- Fundamento:

El equipo se compone de un sistema de bombeo, un inyector, una columna cromatográfica, un controlador de la temperatura de la columna, un detector y un sistema de adquisición de datos. La fase móvil es suministrada desde uno o varios depósitos y circula a través de la columna, normalmente a un caudal constante, y después a través del detector. Los sistemas de bombeo del HPLC, hacen pasar la fase móvil a un flujo constante. Las fluctuaciones de presión deben ser mínimas. Los tubos y conexiones deben poder resistir las presiones desarrolladas por el sistema de bombeo.

Existen sistemas controlados por microprocesador que mediante un programa definido son capaces de suministrar una fase móvil de composición constante y eso se conoce como (elución isocrática) o variable (elución en gradiente). En el caso de la elución en gradiente, existen sistemas de bombeo que suministran los disolventes desde diversos depósitos y la mezcla de los disolventes se puede efectuar en el lado de baja presión o en el lado de alta presión de la bomba o bombas.

La disolución de la muestra se introduce en la fase móvil circulante en la cabeza de la columna, utilizando un sistema de inyección que puede trabajar a alta presión. Se utilizan dispositivos de bucle fijo y de volumen variable que funcionan manualmente o mediante un inyector de muestras automático. El llenado parcial de los bucles de forma manual puede llevar a una menor precisión del volumen de inyección.

En HPLC se utilizan muchos tipos de fases estacionarias, principalmente:

- sílice, alúmina o grafito poroso, utilizados en cromatografía en fase normal, en la que la separación se basa en las diferencias de adsorción y/o de distribución de masas.
- resinas o polímeros con grupos ácidos o básicos, utilizados en cromatografía de intercambio iónico, en la que la separación se basa en la competición entre los iones a separar y los de la fase móvil.
- sílice o polímeros porosos, utilizados en cromatografía de exclusión por tamaño, en la que la separación se basa en las diferencias de volumen entre las moléculas.
- una variedad de soportes modificados químicamente preparados a partir de polímeros, sílice o grafito poroso, utilizados en HPLC en fase inversa, en la que la separación se basa principalmente en el reparto de las moléculas entre la fase móvil y la fase estacionaria.
- fases estacionarias modificadas químicamente especiales, por ejemplo derivados de la celulosa o la amilosa, proteínas o péptidos, ciclodextrinas, etc., para la separación de enantiómeros (cromatografía quiral).

La mayor parte de las separaciones se basan en mecanismos de reparto utilizando sílice modificada químicamente como fase estacionaria y disolventes polares como fase móvil. La superficie del soporte, por ejemplo los grupos silanol de la sílice, se hace reaccionar con diferentes reactivos de silano para producir derivados de sililo ligados covalentemente que abarcan un número variable de sitios activos sobre la superficie del soporte. La naturaleza de la fase ligada es un parámetro importante para determinar las propiedades de separación del sistema cromatográfico.

En el caso de las separaciones analíticas, el tamaño de las partículas de las fases estacionarias más comúnmente utilizadas varía entre 3 μm y 10 μm . Las partículas pueden ser esféricas o irregulares, de porosidad y área superficial específica variables. Estos distintos parámetros contribuyen al comportamiento cromatográfico de una fase estacionaria particular. Para las fases inversas, la naturaleza de la fase estacionaria, son factores determinantes adicionales, el grado de ligamiento, por ejemplo expresado como la carga de carbono, y el hecho de que la fase estacionaria esté recubierta o no en los extremos («end-capping», es decir, sililación de los grupos silanol residuales). Cuando

están presentes grupos silanol residuales pueden aparecer colas en los picos, particularmente en las sustancias básicas.

Para cromatografía analítica se utilizan columnas, de acero inoxidable de longitud y diámetro interior variables. La temperatura de la fase móvil y de la columna se debe mantener constante durante el análisis para obtener una mayor eficacia. Se recomienda no calentar las columnas por encima de 60° C a causa de la posible degradación de la fase estacionaria o posibles cambios en la composición de la fase móvil.

Para la cromatografía en fase normal, se emplean disolventes apolares. La presencia de agua en la fase móvil debe ser estrictamente controlada para obtener resultados reproducibles. En HPLC en fase inversa, se emplean fases móviles polares, con o sin modificadores orgánicos.

Los componentes de la fase móvil se filtran para eliminar las partículas de tamaño superior a 0,45 μm y se desgasifican antes del bombeo, mediante el paso de una corriente de helio, tratamiento con ultrasonidos o utilización en línea de módulos de membrana/vacío, para evitar la creación de burbujas de gas en la cubeta del detector. Los disolventes utilizados para preparar la fase móvil están normalmente exentos de estabilizantes y son transparentes a la longitud de onda de la detección, si se emplea un detector ultravioleta. Los disolventes y otros componentes empleados deben ser de calidad apropiada. El ajuste del pH, si fuera necesario, se efectúa exclusivamente sobre el componente acuoso de la fase móvil y no sobre la mezcla. Si se utilizan disoluciones tampón, se realiza un lavado adecuado del sistema con una mezcla de agua y el modificador orgánico de la fase móvil (5 por ciento V/V) para evitar la cristalización de las sales una vez finalizada la cromatografía. Las fases móviles pueden contener otros componentes, por ejemplo un contra ión para la cromatografía de par iónico o un selector quiral para la cromatografía que utiliza una fase estacionaria aquiral.

Los detectores más utilizados son los espectrofotómetros en el ultravioleta/visible (UV/Vis), incluyendo los detectores de barra de diodos. También se pueden utilizar espectrofotómetros de fluorescencia, refractómetros diferenciales, detectores electroquímicos, espectrómetros de masas, detectores de difusión de la luz, detectores de radiactividad u otros detectores especiales, dependiendo de las características físico-químicas de los compuestos a estudiar.

▪ Procedimiento:

En el presente trabajo se empleó un sistema cromatográfico modular Jasco formado por los siguientes componentes (Figura 3.16.):

- Interfaz LC-NET II/ADC.
- Desgasificador DG-2080-54.
- Unidad de gradiente cuaternario LG-2080-04.
- Bomba PU-2080 Plus.
- Inyector AS-2050 Plus para 100 muestras.
- Inyector UV-2070 Plus con función PDA.
- Horno CO-2065 Plus.

Los datos generados son transmitidos a través del interfaz LC-NET II/ADC a un ordenador dotado del programa ChromNav y SpectraManager.

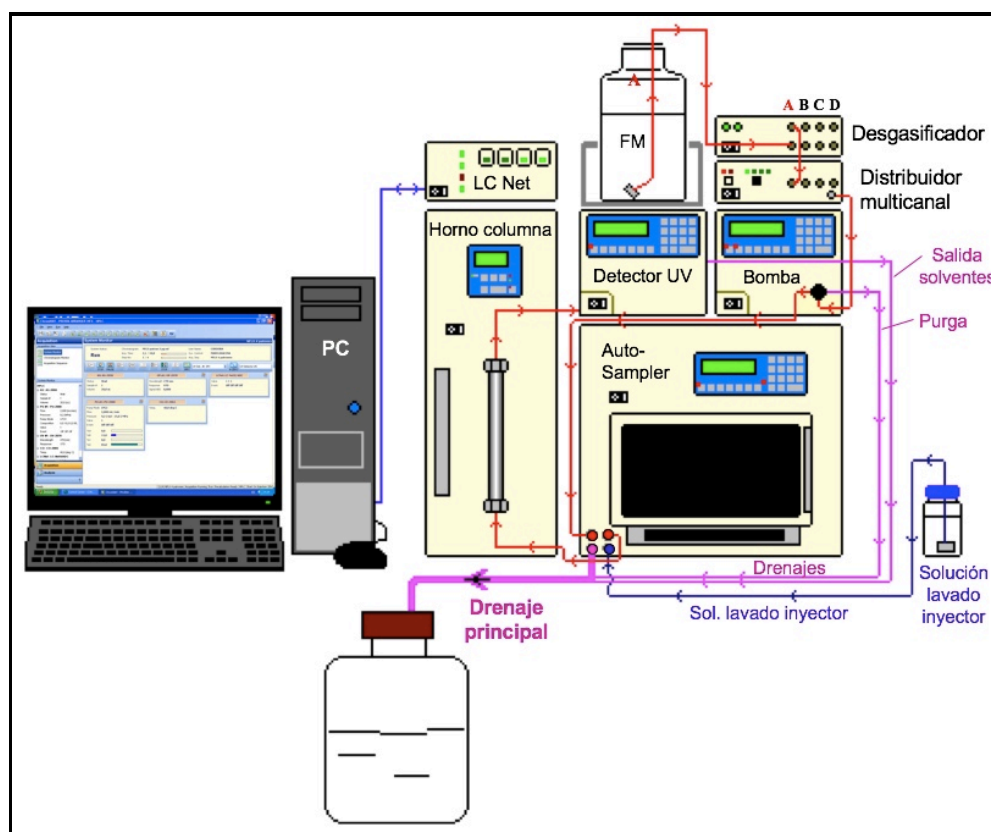


Figura 3.16. Esquema HPLC JASCO

Los parámetros cromatográficos empleados en esta memoria son los siguientes:

- Fase estacionaria: Columna MEDITERRANEA SEA 18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m) con una precolumna de las mismas características (4 x 3 mm)
- Temperatura de análisis: 40 ° C
- Fase móvil: fosfórico 1% -acético 10% (pH 1,5) (A); acetonitrilo (ACN) (B)

Tiempo (min)	Proporción A (%)	Modalidad
0-10	2-20	Gradiente
10-15	20-2	Gradiente

- Flujo: 1 mL/min (P: 20,3 bar)
- Detección: 260 nm y 375 nm
- Volumen de inyección: 20 μ L

Los componentes de la fase móvil se filtraron a través de membranas Supor[®] (Pall) de 47 mm de diámetro y 0,45 μ m de diámetro interno empleando una unidad de filtración Millipore[®] acoplada a un sistema de vacío (Büchi Vac V-500), conforme al procedimiento interno PGL 001/0. La degasificación de los medios recién filtrados se llevó a cabo en un baño de ultrasonidos Ultrasons H. Selecta durante 25 minutos.

Para seleccionar la longitud de onda (λ) de máxima absorción de los compuestos a estudiar, se procedió a efectuar un barrido espectrofotométrico de las distintas soluciones patrón (ácidos fenólicos y ácidos orgánicos) en un espectrofotómetro Beckman DU-7 a una velocidad de barrido de 120 nm/min.

Las muestras se prepararon a partir de los extractos liofilizados de hojas antes y después de senescencia, frutos verdes y maduros. Para ello se pesó 1 mg de cada extracto y se diluyó en 2 mL de agua Milli-Q. Una vez disuelto se filtraron con filtros de jeringa Millipore 0,45 μ m y se acondicionaron en viales de vidrio ámbar de 1,5 mL para su inyección inmediata en el sistema.

3.3. ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FORMULACIONES SEMISÓLIDAS

3.3.1. DISEÑO Y ELABORACIÓN DE FORMULACIONES TÓPICAS: ASPECTOS GENERALES

Las formas farmacéuticas tópicas se pueden clasificar en tres grupos:

- Las formas líquidas que son bastante frecuentes (soluciones, suspensiones o emulsiones líquidas).
- Las formas sólidas, que también se suelen utilizar (polvos suavizantes y lubricantes y las barras o lapiceros que contienen sustancias medicamentosas).
- Las formas semisólidas que constituyen el grupo más amplio dentro de las formulaciones aplicadas sobre piel y mucosas (Vila-Jato, J.L., 2001), y que detallaremos a continuación.

Según la Real Farmacopea Española 5ª Ed., las preparaciones semisólidas para aplicación cutánea están destinadas a la administración local o transdérmica de principios activos, o tienen una acción emoliente o protectora. Se trata de formulaciones de aspecto homogéneo constituidas por una base, simple o compuesta, en la cual habitualmente están disueltos o dispersados uno o más principios activos. La composición de esta base puede repercutir en las propiedades biofarmacéuticas del fármaco que incluye. Los excipientes utilizados en la base pueden ser sustancias de origen natural o sintético y constituir un sistema de una o varias fases. De acuerdo con la naturaleza de la base, la preparación puede tener propiedades hidrófilas o hidrófobas; puede contener también otros excipientes adecuados, como conservantes antimicrobianos, antioxidantes, estabilizantes, emulsionantes, espesantes y agentes potenciadores de la penetración.

Se pueden distinguir varios tipos de preparaciones semisólidas para aplicación cutánea: pomadas, cremas, geles, pastas, cataplasmas, apósitos adhesivos medicamentosos y parches cutáneos. Según su estructura, las pomadas, cremas y geles presentan normalmente un comportamiento viscoelástico y propiedades de fluidos no newtonianos, por ejemplo, de tipo plástico, pseudoplástico o tixotrópico, a altas velocidades de cizalladura. Las pastas presentan frecuentemente propiedades de dilatación (RFE, 2015).

Las características que de modo general deben reunir las formulaciones de administración tópica son las siguientes (Vila-Jato, J.L., 2001):

- ✓ Deben ser bien tolerados y no ser ni irritantes ni sensibilizantes.
- ✓ Compatibilidad física y química con la formulación y con el material de acondicionamiento.
- ✓ Estabilidad.
- ✓ Consistencia adecuada para permitir su administración sobre la piel o mucosas.
- ✓ Deben ceder adecuadamente el principio activo que incorporan.
- ✓ Caracteres organolépticos no desagradables.

Geles

Los geles desde un punto de vista galénico pueden definirse como sistemas bifásicos estructurados, de consistencia semisólida a pesar de su elevado componente líquido, destinados a aplicarse sobre piel o mucosas. Se considera que por lo general estos sistemas carecen de poder de penetración y por tanto repercuten escasamente en la capacidad de liberación del fármaco que incluyen. En su formulación el excipiente principal es el gelificante, polímeros capaces de general un gel por si mismo en contacto con el medio líquido (independientemente del pH del medio), o que necesitan un pH determinado para gelificar. En cualquier caso para mantener la estabilidad del sistema se ha de tener precaución con la temperatura, cambios de pH, agitación excesiva o la presencia de electrolitos, entre otros factores. Existen diversas maneras de clasificar los geles:

A. Según su comportamiento frente al agua:

- Geles lipófilos (oleogeles): son preparaciones de fase líquida oleosa cuyas bases están constituidas habitualmente por parafina líquida con polietileno o aceites grasos gelificados con sílice coloidal o con jabones de aluminio o zinc.
- Geles hidrófilos (hidrogeles): son preparaciones cuyas bases están constituidas habitualmente por agua, glicerol o propilenglicol, gelificados con poloxámeros, almidón, derivados de la celulosa, carbómeros o silicatos de magnesio y aluminio.

B. Según el número de fases en que están constituidos:

- Geles monofásicos: el medio líquido lo constituye una sola fase o líquidos miscibles; agua, alcohol, solución hidroalcohólica, aceite, etc.

- Geles bifásicos: constituidos por dos fases líquidas inmiscibles, formándose una estructura transparente con propiedades de semisólido. Estos sistemas se pueden a su vez agrupar en dos categorías:
 - Los TOW gels: en estos sistemas el lípido se incorpora a la micela que forma el emulgente, el cual se comporta como agente solubilizante. Los TOW gels son geles bifásicos micelares O/A.
 - Los TAS gels: geles transparentes basados en emulsiones de siliconas agua/silicona (W/S). Se consideran como una crema transparente de agua en siliconas, de gran aplicación cosmética.

- C. Según su viscosidad: fluidos, semisólidos o sólidos (formulación de los sticks desodorantes y colonias sólidas)

- D. Según su elasticidad: elásticos, como por ejemplo el gel de gelatina; no elásticos (el ejemplo más conocido es el del ácido silícico o gel de sílice)

- E. En función de la naturaleza de la fase interna:
 - Inorgánicos: como el magma de bentonita.
 - Orgánicos: naturales (goma arábica o gelatina) o sintéticos (carboximetilcelulosa sódica e hidroxipropilcelulosa)

Pomadas

Las pomadas constan de una base en una sola fase en la que pueden estar dispersadas sustancias sólidas o líquidas. Existen tres grupos principales de pomadas:

- Pomadas hidrófobas: sólo pueden absorber pequeñas cantidades de agua. Las bases que se emplean con más frecuencia en su formulación son las parafinas sólidas, las parafinas líquidas y líquidas ligeras, los aceites vegetales, las grasas animales, los glicéridos sintéticos, las ceras y los polialquilsiloxanos líquidos.
- Pomadas que emulsionan agua: pueden absorber mayores cantidades de agua produciendo después de su homogeneización emulsiones del tipo agua en aceite o aceite en agua, dependiendo de la naturaleza de los emulsionantes. Pueden usarse para este fin agentes emulsionantes del tipo agua en aceite, tales como alcoholes de

lanolina, ésteres de sorbitán, monoglicéridos y alcoholes grasos, o agentes emulsionantes del tipo aceite en agua, tales como alcoholes grasos sulfatados, polisorbatos, éter cetosteárilico del macrogol o ésteres de ácidos grasos con macrogles. Las bases utilizadas son las de las pomadas hidrófobas. (Vila-Jato, J.L., 2001)

- Pomadas hidrófilas: son preparaciones cuyas bases son miscibles con agua. Las bases están constituidas generalmente por mezclas de macrogles (polietilenglicoles) líquidos y sólidos. Pueden contener cantidades adecuadas de agua (RFE, 2015).

Cremas

Las cremas son preparaciones multifásicas tipo emulsión constituidas por una fase lipófila y una fase acuosa. Se dividen en dos grupos:

- Cremas lipófilas: la fase continua es la fase lipófila A/O. Estas preparaciones contienen agentes emulsionantes del tipo agua en aceite, tales como alcoholes de lanolina, ésteres de sorbitán y monoglicéridos.
- Cremas hidrófilas: tienen como fase continua la fase acuosa O/A. Estas preparaciones contienen agentes emulsionantes del tipo aceite en agua, tales como jabones de sodio o de trolamina, alcoholes grasos sulfatados, polisorbatos y ésteres de ácidos grasos y alcoholes grasos polioxietilados combinados, en caso necesario, con agentes emulsionantes del tipo agua en aceite. (Vila-Jato, J.L., 2001)

Pastas

Las pastas son preparaciones semisólidas para aplicación cutánea que contienen elevadas proporciones de sólidos finamente dispersados en la base. (Vila-Jato, J.L., 2001)

Cataplasmas

Las cataplasmas consisten en una base hidrófila que retiene el calor, en la que se encuentran dispersados los principios activos sólidos o líquidos. Normalmente se extienden en una capa gruesa sobre un apósito adecuado y se calientan antes de su aplicación sobre la piel. (Vila-Jato, J.L., 2001).

Apósitos adhesivos medicamentosos

Los apósitos adhesivos medicamentosos son preparaciones flexibles que contienen uno o más principios activos. Están destinados a ser aplicados sobre la piel y diseñados para mantener un estrecho contacto entre ésta y el o los principios activos, de tal modo que éstos puedan ser absorbidos lentamente o actuar como agentes protectores o queratolíticos. Constan de una base adhesiva, que puede ser coloreada, que contiene uno o más principios activos, extendida como una capa uniforme sobre un soporte apropiado de material natural o sintético. Los apósitos adhesivos medicamentosos no provocan irritación ni sensibilización de la piel. La capa adhesiva está cubierta por una banda protectora adecuada, que se retira antes de aplicar el apósito sobre la piel. Cuando se retira, la banda protectora no provoca la separación de la preparación del soporte.

Los apósitos adhesivos medicamentosos se presentan en una gama de tamaños que permita su uso directo o bien en forma de láminas de mayor tamaño que deben cortarse antes de su utilización. Los apósitos adhesivos medicamentosos se adhieren firmemente a la piel mediante una presión suave y pueden ser retirados sin provocar ningún daño apreciable en la piel ni la separación de la preparación del soporte.

Parches cutáneos

Los parches cutáneos son preparaciones flexibles que contienen uno o más principios activos. Están destinados a ser aplicados sobre la piel y diseñados para mantener un estrecho contacto entre la piel y el principio o principios activos de tal modo que éstos puedan actuar localmente.

Los parches cutáneos consisten en una base adhesiva, que puede ser coloreada, que contiene uno o más principios activos, extendida como una capa uniforme sobre un soporte apropiado de material natural o sintético. La base adhesiva no provoca irritación ni sensibilización de la piel. La capa adhesiva está cubierta por una banda protectora adecuada, que se retira antes de aplicar el parche sobre la piel. Cuando se retira, la banda protectora no provoca la separación de la preparación del soporte. Los parches cutáneos se presentan en una gama de tamaños adaptados a su uso. Se adhieren firmemente a la piel mediante una presión suave y pueden ser retirados sin provocar ningún daño apreciable en la piel ni la separación de la preparación del soporte (RFE, 2015).

3.3.2. ELABORACIÓN DE LAS FORMULACIONES

Con el objetivo de preparar una formulación de administración tópica de consistencia adecuada y que no modifique las propiedades intrínsecas del extracto de *S. ebulus*, se elaboraron geles Carbopol[®] 980 (BFGoodrich) como agente gelificante, trietanolamina (TEA) (Merck; Barcelona, España) como neutralizante y agua purificada Milli-Q.

▪ Fundamento:

El Carbopol[®] (o Carbomer[®]) (carboxipolimetileno), está constituido por polímeros sintéticos de ácido acrílico, de alto peso molecular, de cadenas entrecruzadas y copolimerizados con alilsucrosa o éteres de pentaeritritol. Se presenta como un polvo blanco, higroscópico, ácido, de aspecto sedoso, con un ligero olor característico. Contiene entre un 56 y un 68% de grupos de ácido carboxílico (COOH) respecto a su base seca. Tiene un pH entre 2,7 y 3,5 en dispersiones acuosas al 0,5% (p/v) y un pH entre 2,5 y 3,0 en dispersiones acuosas al 1%. La densidad aparente del producto es de 1,7 g/cm³ y la apelmazada es 1,4 g/cm³, siendo su humedad inferior al 2% (p/p). Sin embargo, el Carbopol[®] es un compuesto higroscópico y el contenido de humedad a la temperatura de 25°C y 50% de humedad relativa es del 8-10% (p/p). El tamaño medio de las partículas primarias es alrededor de 0,2 µm de diámetro y de las partículas floculadas está entre 2 y 7 µm, las cuales no se pueden descomponer en las partículas primarias. Se utiliza como agente gelificante (0,5-2%) aumentando la viscosidad, suspensor (0,5-1%), emulsificante (0,1-0,5%) y aglutinante (5- 10%) en formulaciones farmacéuticas (Koleng, y cols., 2006).

El Carbopol[®] al dispersarse en agua forma soluciones ácidas coloidales de baja viscosidad. Tras la neutralización se origina un incremento en la viscosidad dando lugar a una red tridimensional que constituye la estructura de gel (Fig. 3.17.). Como agentes neutralizantes se utilizan ciertos aminoácidos, el borato sódico, hidróxido de potasio, bicarbonato sódico, hidróxido sódico y aminas polares orgánicas, como la trietanolamina, laurilamina y estearilamina. Una vez neutralizado, el gel acuoso Carbopol[®] presenta la máxima viscosidad a un pH entre 6 y 8 siendo la misma considerablemente reducida si el pH es menor que 3, mayor que 12 o en presencia de electrolitos fuertes. Los geles de Carbopol pierden rápidamente viscosidad al ser expuestos a la luz ultravioleta, minimizándose esta reducción por la adición de un antioxidante o por la utilización de trietanolamina como agente neutralizante (Koleng y cols., 2006).

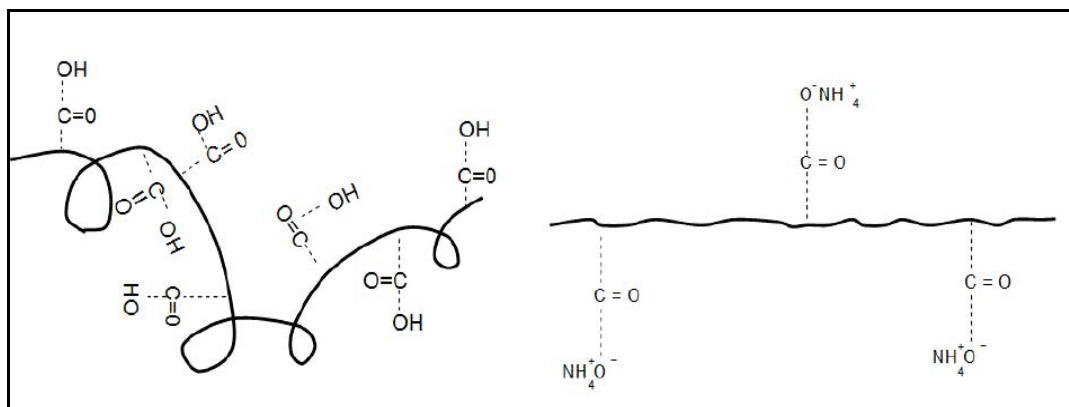


Figura 3.17. Representación esquemática del polímero de Carbopol® antes y después de la neutralización.

Las dispersiones acuosas de Carbopol® constituyen un soporte de fácil crecimiento de microorganismos siendo necesario la adición de conservantes apropiados. En este sentido, los geles acuosos pueden esterilizarse por autoclave. A temperatura ambiente y en condiciones adecuadas, las dispersiones de Carbopol® mantienen su viscosidad durante periodos de tiempo largos (Koleng, y cols., 2006).

Se encuentran comercializados diferentes tipos de Carbopol®, los cuales varían en su peso molecular, gado de entrecruzamiento de las cadenas, estructura polimérica y componentes residuales. Estas características dan lugar a las propiedades reológicas particulares de cada producto. El benceno es el solvente utilizado normalmente en la polimerización, sin embargo, existen formas de Carbopol® preparados únicamente con etilacetato o mezcla de etilacetato/ ciclohexano (Koleng, y cols., 2006). En nuestro estudio seleccionamos el Carbopol® 980, suministrado por BF Goodrich que presenta una viscosidad de 22,95 cp a una concentración de 0,2% (p/v en agua) y de 49,8 cp a una concentración del 0,5% (p/v en agua) y un porcentaje de etilacetato y ciclohexano, únicos solventes utilizados en la fabricación del producto, del 0,21 y 0,03 respectivamente.

- Procedimiento:

Se han preparado geles a dos concentraciones de Carbopol® (1%, 1,5%). Para ello se incorporó el polímero poco a poco sobre un volumen determinado de extracto en agitación continua. Una vez añadida toda la cantidad del gelificante se dejó hinchar durante 24 h como paso previo a su neutralización con trietanolamina hasta un pH = 6,5 ± 0,5.

3.3.3. CARACTERIZACIÓN REOLÓGICA DE LAS FORMULACIONES

3.3.3.1. Estudios de extensibilidad

▪ Fundamento:

La extensibilidad en formulaciones tópicas es crítica para su aceptación por parte del paciente, y está relacionada también con la eficacia terapéutica ya que permite poner en íntimo contacto la formulación con la piel (Suñé y cols., 1967). Este ensayo aparece descrito en el Formulario Nacional (PN/L/CP/003/00).

Suñé define el índice de extensibilidad como “el valor del área media que determina la pomada en 2 ensayos paralelos con 200 g de peso” (Buenestado y cols., 1972). El dispositivo de medida o extensómetro, está formado por un tornillo micrométrico, una placa de metacrilato cuadrada con sistema de medida y pesas de 50, 100 y 200 g.

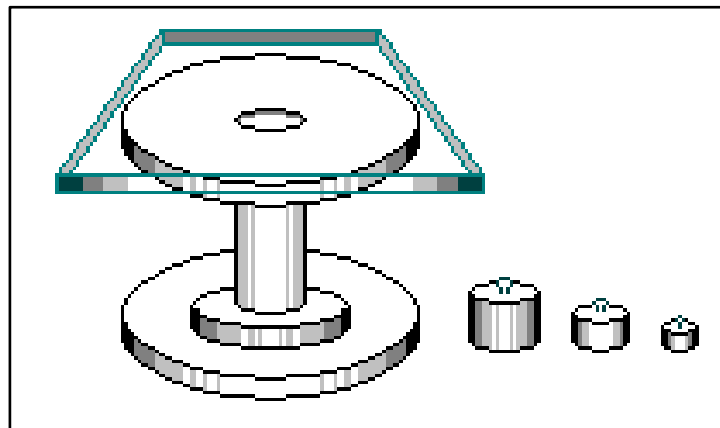


Figura 3.18. Extensómetro de Pozo y Suñé.

▪ Procedimiento:

1. Se dispuso una cantidad de la formulación en el centro del instrumento (aproximadamente 1 mL de gel).
2. Se colocó encima la placa cuadrada graduada ($P = 28$ g).
3. Se registraron las dimensiones alcanzadas por la fórmula al extenderse por la acción de los distintos pesos.
4. Se repitió el mismo proceso añadiendo los distintos pesos.
5. Se realizan todos los ensayos por triplicado.
6. Se indica la temperatura en cada ensayo, por estar este parámetro directamente relacionado con la reología de la formulación y por consiguiente con su extensibilidad.

▪ Expresión de los resultados:

La determinación de la superficie de la elipse descrita por la extensibilidad de la muestra ensayada se realiza aplicando la fórmula siguiente:

$$S(\text{mm}^2) = \pi \cdot \frac{d}{2} \cdot \frac{d'}{2}$$

Siendo d y d' las dimensiones (mm) alcanzadas por la extensión de la muestra sobre las mediatrices graduadas.

La representación gráfica de la extensibilidad en función de los parámetros peso y superficie permite realizar un estudio comparativo del fenómeno extensiométrico entre las distintas muestras ensayadas (Buenestado y cols., 1973) (Buenestado, y cols., 1973b). La evaluación estadística de los datos obtenidos en los diferentes estudios se ha llevado a cabo mediante un paquete de programas estadísticos de ordenador: SIMFIT (Bardsley, 2001), que nos permitió realizar una medición lineal de los extensogramas y calcular el índice de extensibilidad y su intervalo de confianza para cada ensayo.

3.3.3.2. Estudios de viscosidad

La reología estudia cómo se deforma y fluye la materia cuando se le somete a una fuerza de tensión, compresión o cizalla. En general, los sistemas dispersos y coloidales se comportan de forma muy similar a los líquidos cuando son sometidos a una tensión o una compresión, pero su comportamiento es, en cambio, muy diferente cuando se les aplican fuerzas de cizalla.

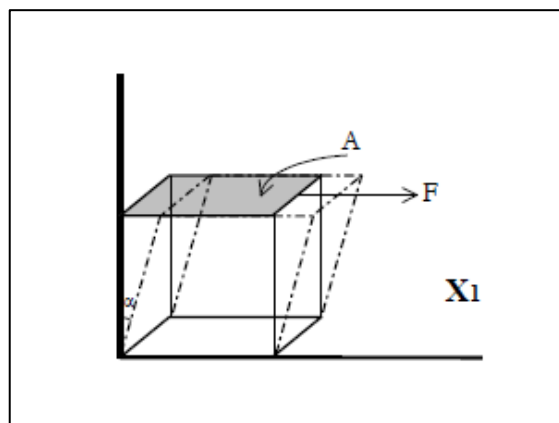


Figura 3.19. Aplicación de una fuerza de cizalla sobre un material.

La figura 3.19. representa un material sometido a una presión. La porción inferior del material se mantiene estacionaria, mientras que la superior es empujada con una fuerza F que actúa en la dirección x en un área A . Esta fuerza aplicada por unidad de área es lo que se llama fuerza de cizalla (S), y causará en el material una deformación. La velocidad de cizalla (D) es el gradiente de velocidad que se establece entre la capa inferior y la superior. Según la ley de Newton, la constante de proporcionalidad entre la fuerza de cizalla y la velocidad de cizalla se define como la viscosidad (η). De esta forma tendremos:

$$S = \frac{F}{A}$$

$$D = \frac{\delta\gamma}{\delta t}$$

$$\eta = \frac{S}{D}$$

Una vez que la fuerza haya cesado, pueden darse las siguientes situaciones:

- Que el material retorne a su forma original → Comportamiento elástico.
- Que permanezca en la nueva posición → Comportamiento plástico.

Cuando la deformación sigue una relación lineal con la fuerza de cizalla, hablamos de fluidos newtonianos, comportamiento típico de soluciones y suspensiones acuosas diluidas.

1. Sólidos ideales: cuando una fuerza de estiramiento (tensión) se aplica sobre un sólido ideal, la magnitud del estiramiento o deformación producida es proporcional a la tensión aplicada. Este fenómeno se conoce como la Ley de Hooke, y la constante de proporcionalidad se denomina módulo de cizalla. Una vez que cesa la fuerza, la energía acumulada en forma de energía elástica se libera y el cuerpo recupera inmediatamente su forma inicial.

2. Fluidos newtonianos: cuando se aplica una fuerza sobre un fluido newtoniano, éste se deforma con una velocidad proporcional a la fuerza aplicada y fluye. Una vez que cesa la fuerza, el material no recupera su forma original. Esto se debe a que la energía se habrá disipado como calor para vencer la energía interna que se oponía al flujo. En el caso de líquidos newtonianos, la viscosidad del líquido es una constante, de modo que el material se comporta de acuerdo a la Ley de Newton. Si representamos la fuerza de cizalla ejercida (S) frente a la velocidad de cizalla (D), se obtiene una línea recta de pendiente α constante, que representa la viscosidad del sistema.

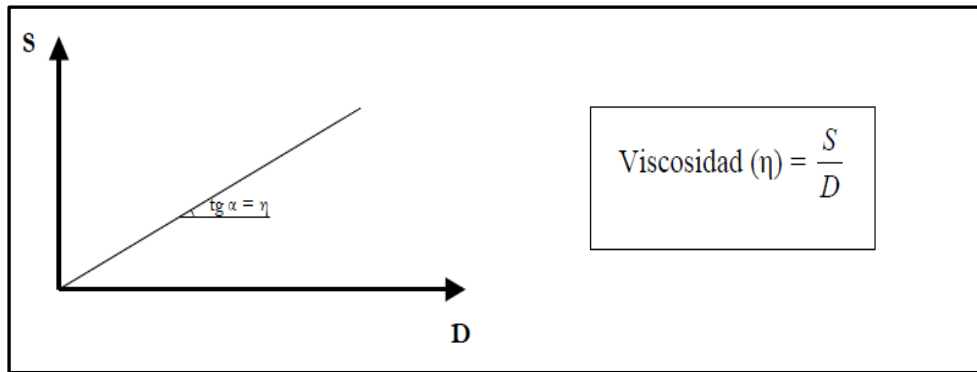


Figura 3.20. Viscosidad en fluidos newtonianos.

3. Fluidos no newtonianos: estos fluidos no siguen la Ley de Newton, y su viscosidad no permanece constante sino que varía con la velocidad de cizalla aplicada. Así no podemos hablar en este caso de la viscosidad como una constante característica del material, sino que nos referiremos a una viscosidad diferencial ($\frac{\partial \delta}{\partial \gamma}$), que se corresponde con la pendiente de la tangente de la curva que se obtiene al representar la fuerza de cizalla ejercida (S) frente a la velocidad de cizalla (D), en cada punto.

Existen varios tipos de comportamiento no newtoniano en función del tipo de desviación observada con respecto a la Ley de Newton:

- Comportamiento plástico: Este tipo de materiales se comportan como un sólido (elástico), es decir, no fluyen hasta que se alcanza una determinada fuerza de cizalla umbral (S_0) que se conoce como fuerza de ruptura. A partir de ahí, el material fluye y se comporta como un fluido newtoniano. La viscosidad se denomina viscosidad plástica (η_p) y se calcula a partir de la ecuación:

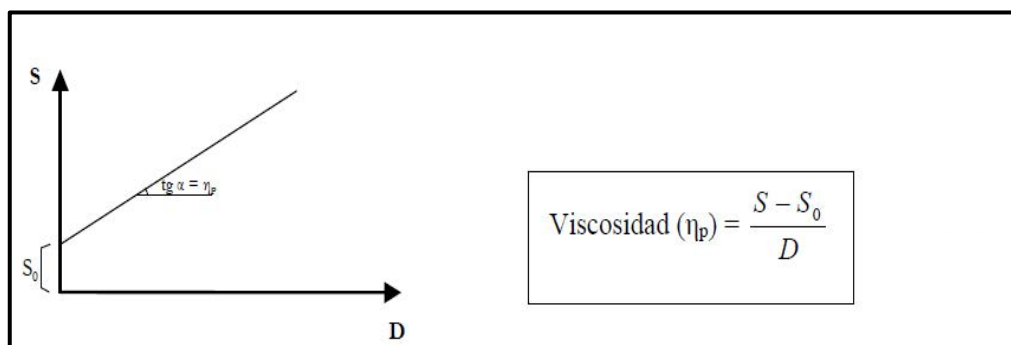


Figura 3.21. Viscosidad en materiales plásticos.

- Comportamiento pseudoplástico: cuando un material posee un valor de ruptura (S_0) tan bajo que no es apreciable, y su viscosidad diferencial disminuye con la fuerza de cizalla, se dice que tiene un comportamiento pseudoplástico. La viscosidad aparente se calcula a partir de la tangente a la curva obtenida en cada punto. La mejor forma de describir el sistema será pues a través del reograma completo.
- Comportamiento dilatante: cuando un sistema formado por partículas sólidas dispersas en un líquido a una elevada concentración es sometido a una fuerza, puede experimentar un aumento aparente en su volumen o dilatación. Al aumentar la velocidad de cizalla, aumenta de la resistencia a la cizalla, esto es, la viscosidad. Este tipo de fluidos tienen un comportamiento dilatante, y el incremento en la viscosidad se denomina dilatación reológica. La viscosidad aparente se calcula también en este caso a partir de la tangente a la curva obtenida en cada punto.

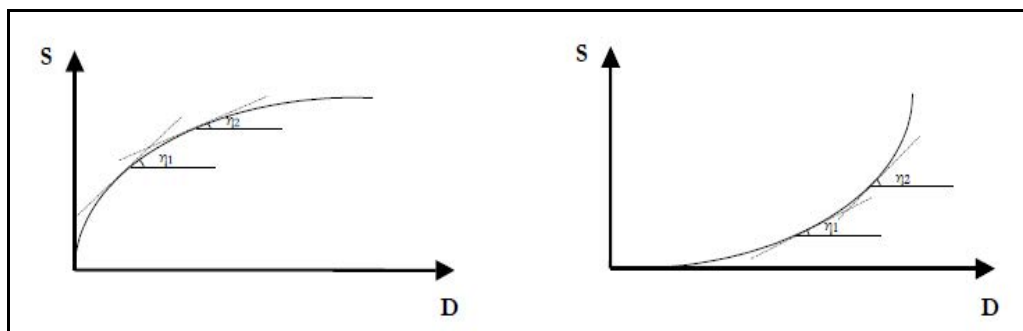


Figura 3.22. Viscosidad en materiales pseudoplásticos y dilatantes, respectivamente.

- Comportamiento tiempo-dependiente: este tipo de comportamiento es característico de materiales cuya viscosidad no sólo depende de la velocidad de cizalla, sino también del tiempo durante el que han sido sometidos a la fuerza de cizalla. Cuando un sistema en equilibrio se somete a un cambio repentino en las condiciones externas, las partículas tardan cierto tiempo en adaptarse a ellas. De la misma manera, aunque un sistema sea reversible y pueda recuperar su estructura inicial una vez que se haya cesado de aplicar una fuerza, esta recuperación requerirá también cierto tiempo. Este fenómeno se denomina tixotropía, y se detecta a partir de reogramas con un ciclo de subida en el que se va aumentando la fuerza de cizalla, y uno de bajada en el que se va disminuyendo. Si las curvas

obtenidas en cada dirección son diferentes, se obtiene un ciclo de histéresis. El área englobada en este ciclo es representativa de la facilidad de reestructuración del sistema.

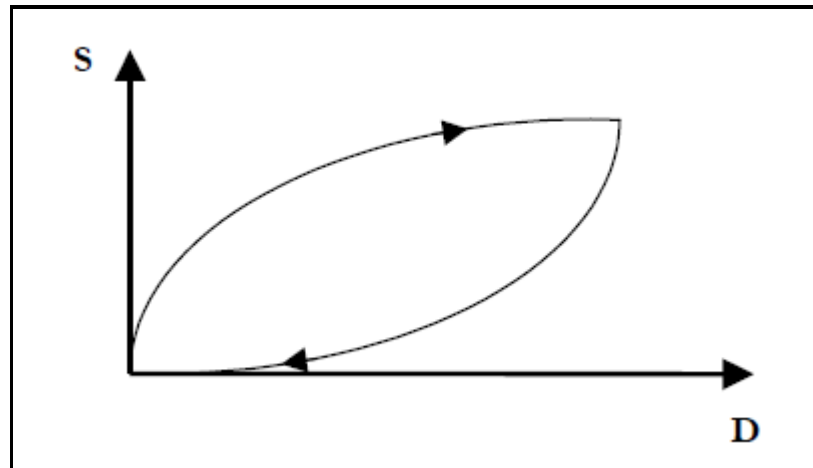


Figura 3.23. Viscosidad en materiales tixotrópicos.

Viscoelasticidad

Cuando un material sobre el que se ejerce una fuerza almacena parte de la energía como energía elástica (elasticidad) mientras que otra parte se disipa como calor (viscosidad), se dice que actúa como viscoelástico.

- Procedimiento:

Los estudios de reología de los geles estudiados se llevaron a cabo en un viscosímetro geométrico de cono y placa Brookfield modelo HB con aguja CP42, provisto de un baño de recirculación termorregulado conectado a la placa donde se deposita la muestra. Se determinó la viscosidad (η) y fuerza de cizalla (D) de las muestras a una temperatura constante de $25 \pm 0,1^\circ \text{C}$. Las medidas se efectuaron a una velocidad de cizalla establecida entre 0 y 30 s^{-1} con una rampa de velocidad controlada de 15 s , y entre 30 y 0 s^{-1} con la misma rampa de velocidad.

El informe de datos puntuales así como los reogramas completos (curva de subidas y bajadas) fueron proporcionados por el software Rheocalc (V.1.1) que controlaba el equipo.



Figura 3.24. Viscosímetro Brookfield modelo HB con aguja CP42.

3.3.4. ESTUDIOS DE DIFUSIÓN A TRAVÉS DE MEMBRANA

- Fundamento:

Existe un interés creciente en el estudio de la liberación y posible penetración de xenobióticos a través de la piel o mucosas. La necesidad de datos relevantes obtenidos bajo condiciones reproducibles y seguras han originado un desarrollo y estandarización de los métodos tanto *in vivo* y *ex vivo* como *in vitro* (Brain y cols., 1998).

El procedimiento más utilizado en la evaluación de la absorción percutánea de fármacos es el diseño de estudios *in vitro* mediante la utilización de celdas de difusión (Bronaugh, 1989), (Schaefer, y cols., 1996d), (Brain, y cols., 1998), (Jiang, y cols., 1998). En este tipo de ensayos se consigue un control de las condiciones experimentales de una manera precisa, siendo las únicas variables la piel y el compuesto a estudiar (Brain y cols., 1998). La simplicidad de la metodología de los experimentos permite la realización, de un gran número de ensayos con menos esfuerzo. Además, la metodología *in vitro*, proporciona información esencial adicional frente a las investigaciones *in vivo* sobre la velocidad de absorción de los compuestos directamente debajo de la membrana a estudiar, y lleva a cabo estimaciones del metabolismo cutáneo siempre que se mantenga la viabilidad de la piel a lo largo del experimento (Bronaugh, 1989, Schaefer y cols., 1996d, Brain y cols., 1998). También, proporciona información sobre la penetración y distribución del principio activo en las capas de la piel (Touitou y cols., 1998), permite el estudio de sustancias potencialmente nocivas utilizando piel humana (Schaefer y cols., 1996e), y se han utilizado extensamente en trabajos que establecen una correlación entre las características estructurales de los compuestos y su permeabilidad a través de la membrana (Durrheim y cols., 1980), (Schaefer y cols., 1996d).

Tipos de celdas de difusión

Una celda de difusión con un diseño correcto debe reunir una serie de características (Brain y cols., 1998):

- Estar fabricada a partir de materiales inertes.
- Resistencia mecánica.
- Fácil manejo.
- Permitir el uso de membranas de distinto grosor.
- Proporcionar una buena homogeneización del medio en el compartimento receptor.

- Asegurar un contacto total entre la membrana y la fase receptora evitando la presencia de burbujas de aire, etc.
- Mantener una temperatura constante y controlable.
- Poseer volúmenes y áreas de difusión calibrados de una manera precisa.
- Ser capaz de mantener la integridad de la piel, a lo largo del ensayo.
- Tener la posibilidad de muestreo sencillo y, si es posible, automatizable.
- Disponibilidad de la celda a un coste razonable.

Existen diversos tipos de celdas de difusión agrupadas como celdas estáticas o celdas dinámicas. Entre el compartimento donador y el compartimento receptor, se coloca una membrana bien de origen sintético o de origen natural.

➤ Celdas de difusión estáticas

- Celdas horizontales

Están constituidas por dos cámaras dispuestas horizontalmente, una de las cuales contiene el componente que va a absorberse y la otra el medio receptor. Las dos cámaras se encuentran separadas por una membrana. El contenido de una o de ambas cámaras puede ser agitado para asegurar la adecuada dispersión de las moléculas de fármaco y minimizar la difusión estática de las capas limitantes. El control de la temperatura se efectúa introduciendo todo el montaje en un baño de agua termostatzado.

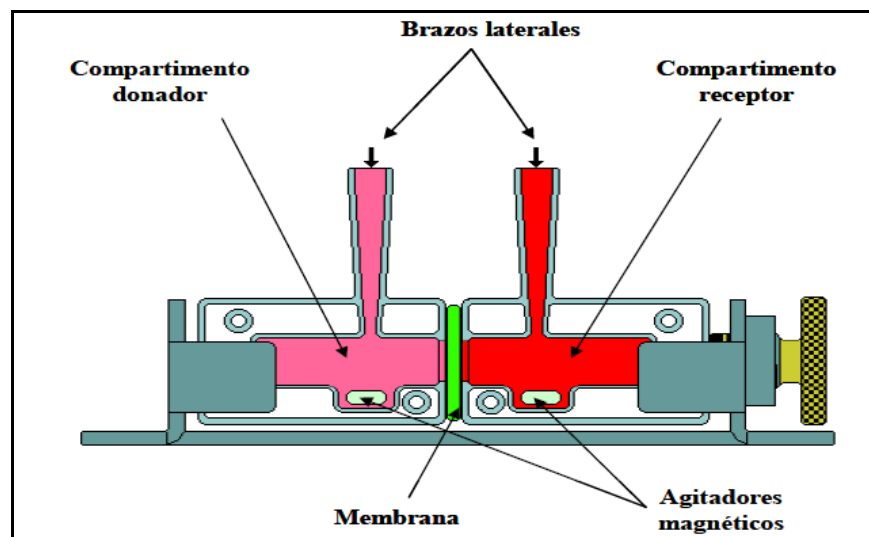


Figura 3.25. Diseño celda horizontal (Gutiérrez, 2011).

Este tipo de celdas consideran con exactitud los principios de la difusión según los cuales el compuesto en cuestión difunde a través de la correspondiente membrana desde el

compartimento donador (en solución) al receptor (misma solución) manteniéndose en agitación ambas soluciones. La concentración del compuesto en el compartimento donador no disminuye significativamente a lo largo del experimento. La aplicación de este diseño es importante en aquellos estudios donde es relevante el establecimiento del estado estacionario. Se provoca una excesiva hidratación del estrato córneo y consecuentemente, una disminución de la función de barrera del mismo (Durrheim y cols., 1980), (Bronaugh y cols., 1985), (Bronaugh, 1989), (Schaefer y cols., 1996d), (Brain y cols., 1998).

○ Celdas verticales

Durante los últimos años se han diseñado y estudiado diferentes modelos de celdas verticales. La celda de difusión de Franz es una de las más empleadas para estudiar la absorción en piel simulando las condiciones *in vivo*, Franz (Franz, 1975) diseñó una celda de difusión estática que se asemejaba a esta situación. Mediante este procedimiento, la piel por su lado epidérmico está expuesta a las condiciones ambientales y, por su lado dérmico, bañada por un fluido receptor en continua agitación dispuesto en un recipiente debajo de la piel (compartimento receptor), a partir del cual, se retiran alícuotas cuyo análisis permite la monitorización de la absorción de los compuestos que han atravesado la membrana (Bronaugh y cols., 1985) (Bronaugh, 1989) (Schaefer y cols., 1996d) (Brain y cols., 1998).

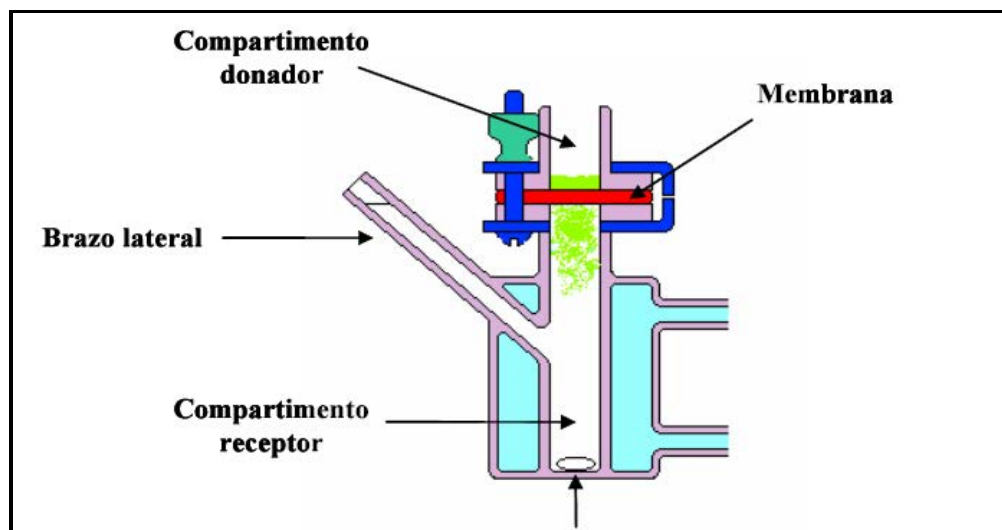


Figura 3.26. Diseño celda de Franz (Gutiérrez, 2011).

➤ Celdas de difusión dinámicas:

La celda de difusión de flujo continuo (Bronaugh y cols., 1985) es otro tipo de celda de difusión vertical. El medio receptor fluye bajo la piel (lado de la dermis) recogiendo el material penetrado a través de la membrana al compartimento receptor y depositándolo en viales colocados en un colector de fracciones. Dentro de la cámara receptora existe una apropiada agitación al crearse una ligera presión de retorno cuando el fluido es forzado a salir por la pequeña conexión de salida, situación que además asegura un contacto íntimo del fluido con la piel. Este diseño de celda presenta una serie de ventajas de entre las que destacan:

- Facilidad de automatización.
- Mantenimiento de las condiciones sumidero imitando más fielmente las condiciones *in vivo*.
- Distribución de los compuestos hidrófobos desde la piel al compartimento receptor de una manera más fisiológica, debido al continuo reemplazamiento de medio receptor.
- Posibilidad de mantener más fácilmente la viabilidad de la piel en experimentos de larga duración, usando soluciones fisiológicas como fluido receptor que se renueva constantemente.

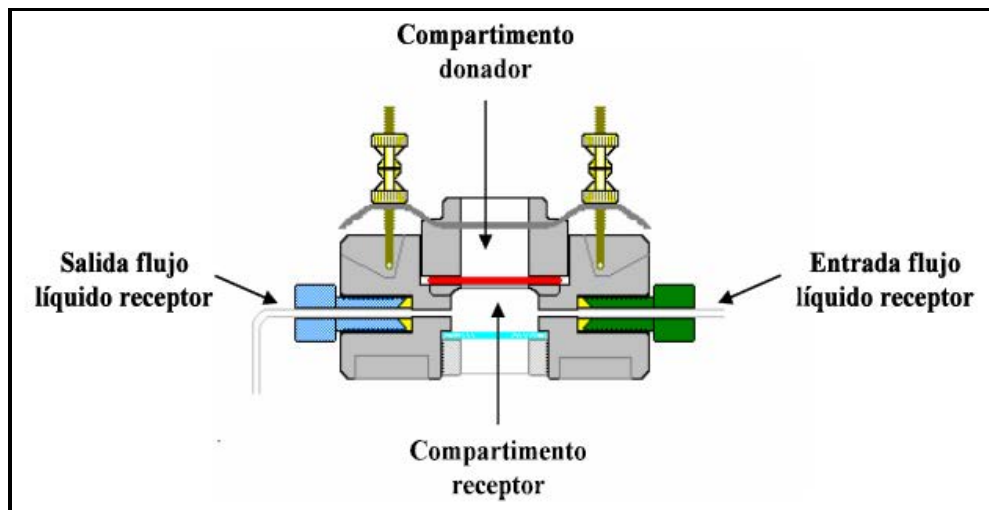


Figura 3.27. Diseño celda de difusión de flujo continuo (Gutiérrez, 2011).

El fluido receptor ideal debe proporcionar una simulación exacta de las condiciones de penetración *in vivo* del compuesto a estudiar. Como regla general, la concentración del compuesto en el fluido receptor no debe exceder el 10 % de la solubilidad máxima a la

temperatura de trabajo (condiciones “shink” o sumidero); una excesiva concentración en la fase receptora conduciría a una disminución en la velocidad de absorción. En la elección del fluido receptor hay que tener en cuenta la posibilidad de interferencia con la barrera de la piel. Cualquier solución amortiguadora fosfato salina a un pH =7,4 es el líquido más comúnmente utilizado aunque, como se indica a continuación, no es siempre la elección más apropiada. Se ha determinado que en compuestos con una solubilidad en agua < 10 µg/mL, puede ser necesario la adición de co-solventes. Con el fin de inhibir el crecimiento microbiano se pueden añadir agentes antibacterianos al líquido receptor. Si se pretende mantener la viabilidad de la piel, el compartimento receptor debe contener una solución fisiológica con adecuadas proporciones de nutrientes (Bronaugh, 1989; Brain y cols., 1998; Bronaugh y cols., 1999). Existen distintas variables de trabajo en los experimentos de difusión *in vitro* que se resumen a continuación:

A. Tipos de membranas

Es la variable más importante. Se recomienda el uso de piel humana en este tipo de experimentos evitando la extrapolación de datos desde un modelo animal, sin embargo, y debido principalmente a las dificultades de su obtención, se sustituye frecuentemente por membranas sintéticas.

B. Temperatura de trabajo

Los experimentos de difusión *in vitro* se llevan a cabo normalmente manteniendo una temperatura superficial de la piel de 32°C (valor *in vivo*) (Schaefer y cols., 1996d; Brain y cols., 1998). Estas condiciones se consiguen atemperando la solución receptora (Franz, 1975), sumergiendo las celdas en un baño de agua (Durrheim y cols., 1980) o perfundiendo agua a una determinada temperatura a través de un sistema de termostatación que cubre la celda (Bronaugh y cols., 1985). Es necesario validar qué temperatura de trabajo debe seleccionarse en cada equipo para garantizar una temperatura en la superficie de la membrana de 32°C (Córdoba-Díaz y cols., 2000).

C. Procedimiento de aplicación del principio activo

Deben considerarse diversos factores en la selección de un procedimiento adecuado, como: la naturaleza del vehículo, la concentración del principio activo, la cantidad de formulación aplicada, el mecanismo de aplicación, el tiempo de exposición y el sistema para retirar el vehículo aplicado, si es necesario (Brain y cols., 1998).

En función de la de la dosis de principio activo aplicada, podemos hablar de sistemas con dosis finitas o con dosis infinitas. En un experimento con dosis finitas, se aplica una cantidad determinada de formulación mimetizando las condiciones “en uso” (Schaefer., 1996d; Brain y cols., 1998). Estas condiciones permiten la evaporación de los constituyentes volátiles de la formulación aumentando las concentraciones relativas del vehículo residual en la superficie de la piel al igual que sucede bajo condiciones reales, *in vivo* (Schaefer y cols., 1996d). A su vez, durante el experimento podría existir una marcada disminución de la dosis en el compartimento donador (Brain y cols., 1998).

Cuando se trabaja a dosis infinitas, se dispone una cantidad suficiente de compuesto sobre la piel de modo que no exista, prácticamente, cambios en la concentración del compartimento donador durante el experimento (Brain y cols., 1998).

Debido a la gran cantidad de formulación aplicada se produce una oclusión de la piel siendo la evaporación de la muestra insignificante y creando condiciones no fisiológicas con velocidades de absorción exacerbadas (Schaefer y cols., 1996d). Es un método apropiado si dentro de los objetivos experimentales se incluye el cálculo de parámetros de difusión, como el coeficiente de permeabilidad, o la investigación de mecanismos promotores de la penetración (Brain y cols., 1998).

D. Intervalo de muestreo en el compartimento receptor

En aquellos experimentos en los que la finalidad principal radica en la determinación de la cantidad total absorbida de un principio activo en el compartimento receptor, únicamente es necesario tomar una muestra al finalizar el experimento (Franz, 1975). Por el contrario, se establecen intervalos frecuentes de muestreo a lo largo de toda la experiencia cuando se quiere determinar parámetros de la difusión como por ejemplo el flujo, el tiempo de latencia, el estado estacionario (Franz, 1975; Brain y cols., 1998).

Mecanismos que rigen el proceso de difusión

El transporte de fármacos a través de la piel se lleva a cabo por mecanismos de difusión pasiva (Guy y cols., 1989; Hadgraft, 2001). El modelo matemático aplicado a los procesos de difusión considera cada capa de piel homogénea asumiéndose una función de barrera constante en cada una de ellas, y el establecimiento de un reparto del principio activo entre los distintos estratos (Guy y cols., 1989).

Primera Ley de Fick

La manera más sencilla de estudiar un proceso de absorción *in vitro* consiste en aplicar la primera ley de Fick la cual, podría ser una aproximación válida en algunos experimentos *in vitro*. Sin embargo, el estrato córneo es una barrera muy impermeable y por lo tanto, se requiere un largo tiempo para establecer las condiciones de estado estacionario (requisito para aplicar la primera ley de Fick), siendo improbable que se alcance en una aplicación terapéutica o cosmética. Por otra parte, este tipo estudios *in vitro* permite un análisis general del fenómeno. El flujo de un compuesto a través del estrato córneo, membrana que se corresponde generalmente con el paso limitante a la difusión, puede ser descrito de forma simplificada a través de la primera ley de Fick mediante la ecuación:

$$\frac{dQ}{dt} = \frac{DKC}{h}$$

dQ/dt es la velocidad de penetración en piel (flujo (J)), **D** es el coeficiente de difusión del principio activo en el estrato córneo, **K** es el coeficiente de reparto del compuesto entre la piel y el vehículo, **C** es la concentración del principio activo en el vehículo (se asume que la concentración del compuesto en la fase receptora es cero) y **h** es la longitud de camino difundido.

Esta ecuación solo es válida en condiciones de estado estacionario y siempre que no existan interacciones significativas entre el fármaco y los componentes de la piel (Guy y cols., 1989; Barry, 2001; Hadgraft, 2001; Moser y cols., 2001).

Los parámetros fisicoquímicos principales que controlan la difusión de xenobióticos a través de la piel son: el coeficiente de reparto, el coeficiente de difusión y la solubilidad. No es fácil separar los valores de K y D, y el cálculo de su magnitud depende de h, que debido a la imprecisión que existe en la determinación de la tortuosidad de los canales intercelulares, no puede ser estimada de una manera correcta.

Estas tres variables son agrupadas como una constante heterogénea denominada coeficiente de permeabilidad $K_p (= KD/h)$ quedando la ecuación anterior simplificada de la siguiente forma (Hadgraft, 2001):

$$\frac{dQ}{dt} = J = KpC$$

En función del fundamento matemático del proceso, existen una serie de parámetros que pueden ser utilizados en el desarrollo y optimización de una formulación dérmica desde el punto de vista teórico. Así, cambios en las características de una formulación pueden provocar modificaciones en las variables D, K y C siendo estos parámetros, fundamentales a la hora de diseñar una formulación que busque una optimización de la penetración en piel de los principios activos (Guy y cols., 1989).

Un aumento de la difusión y solubilidad del principio activo en el estrato córneo, y un aumento del grado de saturación del compuesto en el vehículo (referido a la concentración de principio activo disuelto en el vehículo respecto a la solubilidad del principio activo en dicho vehículo) son estrategias, basadas en la primera ley de Fick, cuyo objetivo es conseguir una mayor penetración en piel. La última estrategia está fundamentada en la interacción entre el principio activo y el vehículo, en cambio, las dos primeras, implican un efecto del vehículo en la función de barrera del estrato córneo (Moser y cols., 2001).

Segunda ley de Fick

Como antes se ha mencionado, es difícil que se lleguen a alcanzar las condiciones de estado estacionario en ensayos de difusión de fármacos, principalmente cuando se mimetizan las condiciones *in vivo*, siendo necesario aplicar la segunda ley de difusión de Fick para analizar los perfiles de flujo y concentración bajo estas condiciones. Esta segunda ley de Fick se rige por la siguiente expresión general:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2}$$

dC/dt es la velocidad de difusión, D es el coeficiente de difusión, x es la distancia a través de la piel y dC es el gradiente de concentración del principio activo a ambos lados de la membrana.

Diversos autores han aplicado un modelo matemático a un experimento de difusión *in vitro* basados en la segunda ley de Fick (Parry y cols., 1990; Harrison y cols., 1995; Coceani y cols., 2003), desarrollando un modelo de difusión transdérmica en celdas de difusión de flujo continuo basado en una membrana constituida por dos capas, la primera

capa se corresponde con el estrato córneo y la segunda capa con la epidermis viable-dermis. Cada capa se consideró homogénea y se caracterizó por un coeficiente de difusión efectivo que representa el transporte por todas las rutas de penetración y un coeficiente aparente de reparto que representa la absorción total del compuesto en todas las regiones dentro de cada capa de piel (Harrison y cols., 1995). El modelo matemático referido se encuentra resumido en la tabla siguiente:

Difusión en la membrana	
$\frac{\partial C_i}{\partial t} = D_{ei} \frac{\partial^2 C_i}{\partial x^2}$ <p>cuando $x = 0$, $C_1 = K_1 C_{don}$ cuando $x = h$, $C_2 = K_2 C_{rec}$</p>	
<p>Bicapa: Flujo que sale de la capa 1 debe equilibrarse con el flujo que entra en la capa 2</p> $D_{e1} \frac{dC_1}{dx} = D_{e2} \frac{dC_2}{dx}$ <p>cuando $t = 0$, $C_1 = C_2 = 0$</p>	
Balance de masas en compartimento donador	Balance de masas en compartimento receptor
$\frac{\partial C_{don}}{\partial t} = \frac{A}{V_{don}} D_{e1} \frac{\partial C_1}{\partial x} \Big _{x=0}$ <p>Cuando $t = 0$, $C_{don} = C_{don'}$</p>	$\frac{\partial C_{rec}}{\partial t} = \frac{A}{V_{rec}} D_{e2} \frac{\partial C_2}{\partial X} \Big _{x=h} - \frac{F_{rec}}{V_{rec}} C_{rec}$ <p>Cuando $t = 0$, $C_{rec} = 0$</p>

Tabla 3.2. Descripción matemática del estado no estacionario en un experimento de difusión in vitro en celdas de difusión de flujo continuo. C: concentración del principio activo en una capa de la piel i. x: distancia a través de la piel. h: espesor efectivo de la piel. D_e : coeficiente de difusión efectivo. K: coeficiente de reparto aparente. A: área de piel disponible en la difusión. V: volumen del compartimento. F_{rec} : Flujo del líquido receptor a través de la cámara receptora. 1 se refiere a la capa de la piel constituida por el estrato córneo. 2 se refiere a la capa de la piel constituida por la epidermis viable-dermis. don se refiere a donador. rec se refiere a receptor.

El flujo intrínseco al compartimento receptor se determina a partir de la expresión (Harrison y cols., 1995):

$$J_{intrin} = -D_s \frac{\partial C_2}{\partial X} \text{ x=h}$$

El balance general de masas en el compartimento receptor de una celda de difusión de flujo continuo (celda de difusión utilizada en el trabajo actual), se describe según la relación:

$$V_{rec} \frac{dC_{rec}}{dt} = JA - F_{rec}C_{rec}$$

V_{rec} es el volumen del compartimento receptor, C_{rec} la concentración de compuesto en el compartimento receptor, J el flujo de principio activo de la piel al compartimento receptor, A = el área de piel disponible en la difusión y F_{rec} el flujo del líquido receptor a través de la cámara receptora. El término (dC_{rec}/dt) se refiere a la acumulación del compuesto en la celda del receptor.

Con el objetivo de simplificar el balance de masas, a menudo se ha asumido que la acumulación en la cámara receptora es tan pequeña que se considera despreciable. Esto en principio parecería razonable ya que el flujo de líquido receptor retira el principio activo, limitando físicamente su acumulación. En dicho caso el flujo aparente vendría expresado como (Harrison y cols., 1995):

$$J_{ap1} = \frac{F_{rec} C_{rec}}{A}$$

Sin embargo, los resultados obtenidos por diversos autores indicaron que el J_{ap1} , generalmente, no es una buena estimación del flujo intrínseco principalmente en las fases tempranas del experimento de difusión, donde aparentemente la acumulación es mayor. Observaron, en ciertas condiciones experimentales que, aunque se asumiera que el término (dC_{rec}/dt) era pequeño, no era una razón suficiente para eliminarlo de la ecuación. Por otra parte, en el caso de principios activos de baja permeabilidad, o volúmenes de receptor muy pequeños combinados con flujos altos de líquido receptor, se conseguía una mejor estimación del flujo intrínseco a partir del J_{ap1} .

Dichos autores, estudiaron un segundo flujo aparente (J_{ap2}) al tener en cuenta el término de acumulación en la ecuación del balance de masas, quedando la relación como (Harrison y cols., 1995):

$$J_{ap2} = \frac{V_{rec} \frac{dC_{rec}}{dt} + F_{rec} C_{rec}}{A} \quad (\text{Ec. 13})$$

Se comprobó que la aproximación de J_{ap2} era una aproximación correcta del flujo intrínseco en todo el curso del experimento, excepto a tiempo cero (Harrison y cols., 1995).

Diversos autores han estimado el flujo intrínseco a partir de los datos experimentales (C_{rec} frente al tiempo) obtenidos en los ensayos de difusión *in vitro* mediante el cálculo del flujo aparente a través de las últimas dos ecuaciones (Harrison y cols., 1995; Córdoba-Díaz y cols., 2000). En líneas generales la representación de la cantidad absorbida y acumulada de principio activo en función del tiempo, gráfica (Q - t) (Figura 3.28.) una vez atravesada la membrana, así como, el flujo establecido en función del tiempo, gráfica (J - t)

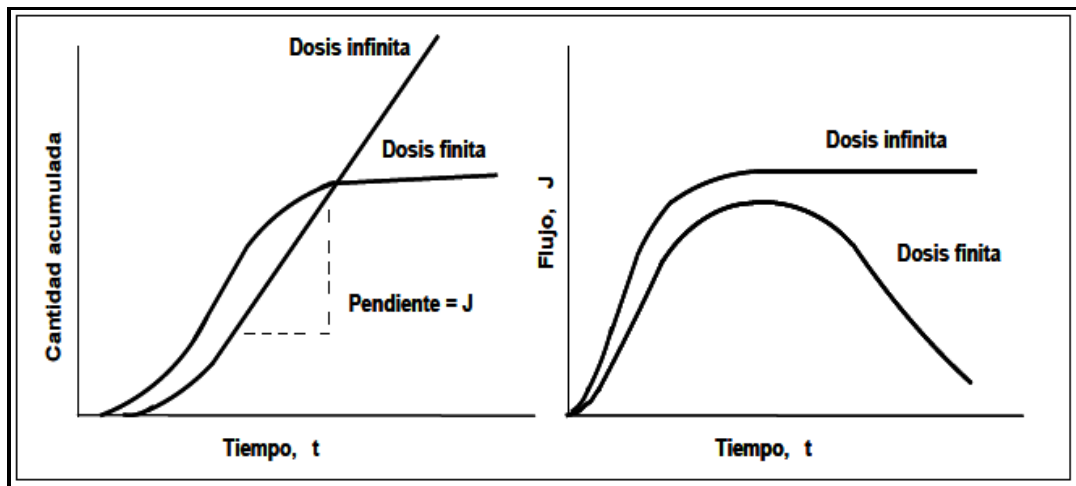


Figura 3.28. Perfiles de absorción expresados en cantidades acumuladas o en flujos con respecto al tiempo según tengamos un sistema de dosis finita o de dosis infinita (Schaefer y cols., 1996d).

En ensayos de difusión *in vitro* realizados bajo condiciones de dosis infinitas se establece un pseudo estado estacionario representado en la gráfica (Q - t) a través de una relación lineal, cuya pendiente se corresponde con el máximo flujo. Los valores de flujo cambian con el tiempo, observándose en la gráfica (J - t), como una vez que aparece el

estado estacionario el valor del flujo máximo se mantiene constante. La K_p se calcula aplicando la primera ley de Fick, a partir del valor de flujo en el estado estacionario (Schaefer y cols., 1996d). La extrapolación de la porción lineal de la curva al eje “x” nos da el tiempo de latencia (Guy y cols., 1989; Parry y cols., 1990; Schaefer y cols., 1996d) el cual, es una medida de la difusividad del compuesto relacionada con su volumen molecular y las propiedades de la barrera de la piel. Se calcula a partir de la siguiente expresión:

$$D = \frac{h^2}{6L}$$

En aquellos experimentos en los que se establecen condiciones de dosis finitas, al contrario de lo que sucede en condiciones de dosis infinitas, la cantidad acumulada en el compartimento receptor es limitada.

El estado estacionario normalmente no se establece durante el periodo de exposición aplicado (reflejando las condiciones en uso) o es difícil de determinar (Schaefer y cols., 1996d). Se observa un valor de flujo máximo en la gráfica ($J - t$) pero no se mantiene constante. Por todo ello es necesario estudiar cuidadosamente el diseño experimental de un determinado estudio de difusión para que se ajuste a un propósito específico y se obtendrán parámetros relevantes (Brain, 1998).

▪ Procedimiento:

Se utilizó un equipo automático de difusión PermeGear® ILC- 07 (PermeGear Riegelsville, PA) (Figura 3.29.), que incluye siete celdas de flujo continuo fabricadas de Kel-F® y colocadas en línea sobre un soporte, el cual, se conecta a un baño termostatzado de circulación Haake® - DC10 (Gebrüde Haake, Karlsruhe, Alemania) que mantiene la temperatura experimental de trabajo.

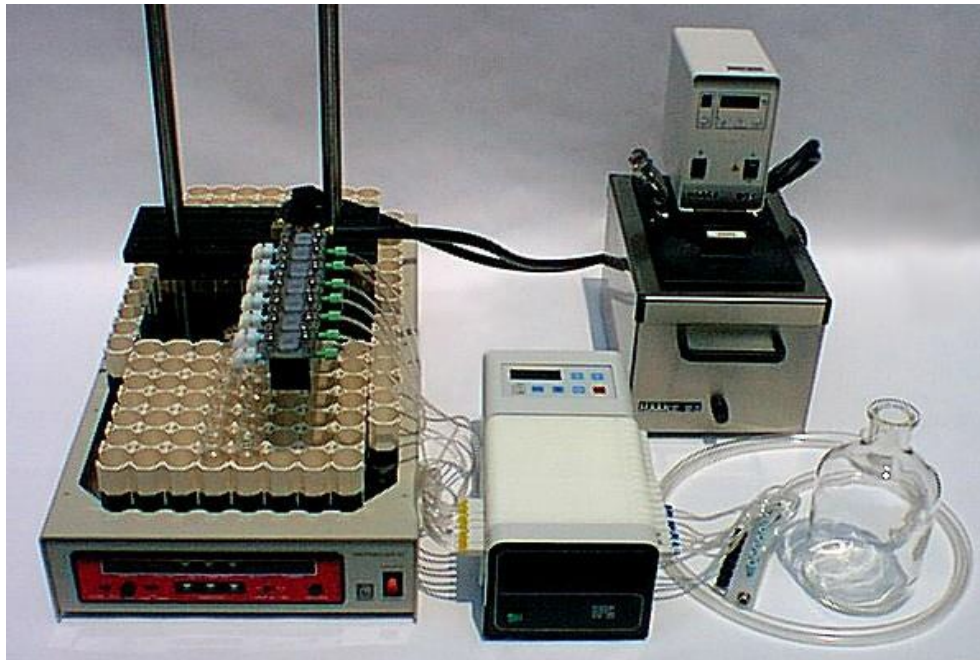


Figura 3.29. Equipo de difusión de flujo continuo (PermeGear® ILC-07)

Las celdas, están constituidas por los siguientes componentes (Figura 3.30.):

- Un compartimento donador (1) ($V = 1,10 \text{ cm}^3$).
- Un soporte (2) con un orificio de 1 cm de diámetro sobre el que se coloca la membrana (área de difusión efectiva $0,785 \text{ cm}^2$).
- Un compartimento receptor (3) ($V = 0,85 \text{ cm}^3$) que presenta conexiones de entrada y salida para el fluido receptor y se cierra por la parte inferior con una tapa de cristal (4), ajustada mediante una contratuerca (5), que permite ver el contenido del interior.
- Todo el sistema se cierra herméticamente mediante una lámina de acero inoxidable (6), adaptada al compartimento donador, que se coloca sobre él encajándose a través de unas tuercas de cierre ajustable.

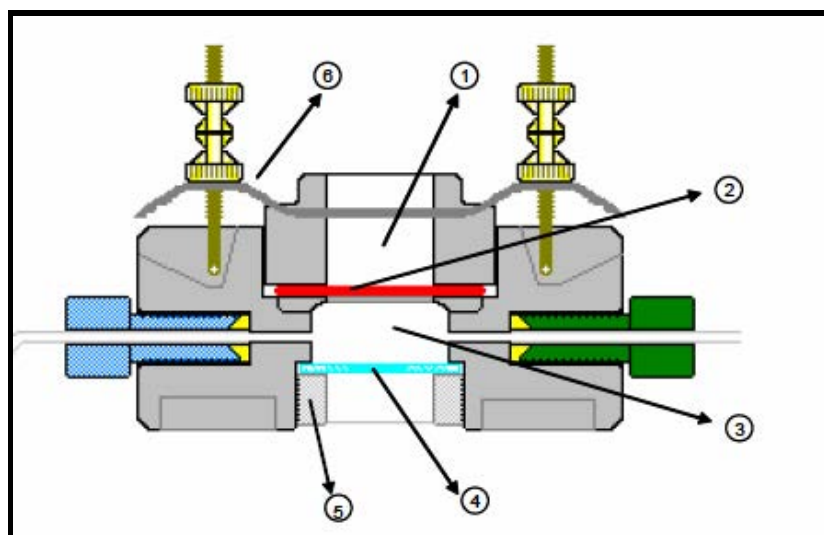


Figura 3.30. Esquema de la celda de difusión de flujo continuo.

El medio receptor fluye a través del compartimento receptor mediante la incorporación de una bomba peristáltica programable de 16 canales Ismatec® IPC 16 (Ismatec, Zürich, Suiza) utilizando conductos de Tygon™ conectados inicialmente al módulo de distribución, el cual se conecta a su vez a la botella reservorio de vidrio. El fluido sale del compartimento receptor a través de un conducto de Tygon™ hasta los tubos o viales dispuestos en un colector de fracciones Isco® Retriever IV (Isco, Lincoln, NE, USA). En los puntos de unión de los conductos de Tygon™ al módulo de distribución y a las puertas de entrada y salida del compartimento receptor, se aplican conexiones 1/4-28 HPLC.

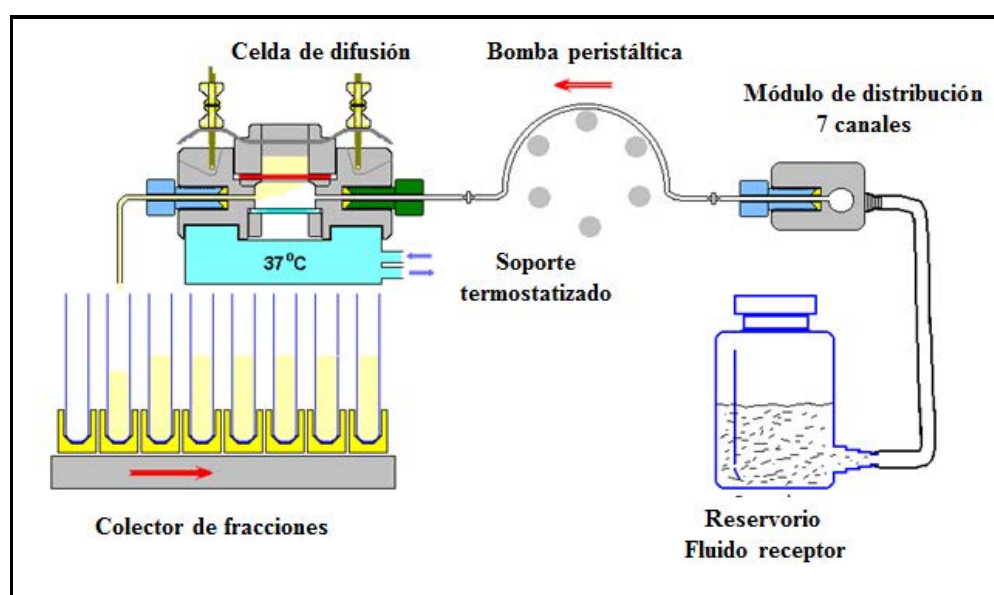


Figura 3.31. Detalle funcionamiento aparato de difusión de flujo continuo.

Se realizó una validación previa de los elementos mecánicos del equipo de difusión automático de flujo continuo PermeGear® ILC-07 en nuestro laboratorio (Córdoba-Díaz y cols., 2000).

Membranas utilizadas

En el presente trabajo se han utilizado membranas hidrófilas de diálisis de celofán con una capacidad de retención de 12 kDa y membranas hidrófobas de silicona Silmax® (Pillar Surgical, La Jolla, USA). Se obtuvieron trozos cuadrados de aproximadamente 1 cm de lado se montaron en las celdas de difusión como se observa en figura 3.32.

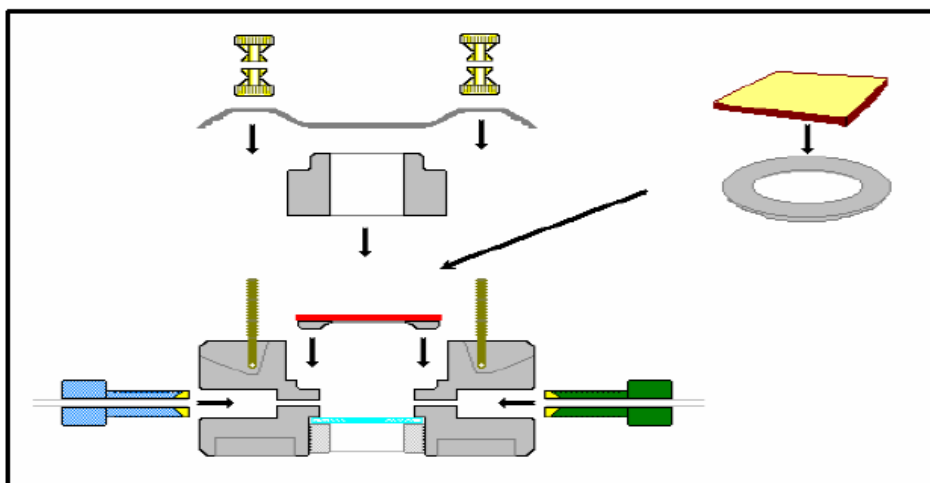


Figura 3.32. Detalle del montaje de membrana o piel en las celdas de difusión.

Descripción de los estudios de difusión in vitro realizados

Una vez montadas las celdas con la membrana de difusión correspondiente, se llenaron los compartimentos receptores con una solución receptora (solución tampón fosfato salino pH=7,4, PBS) asegurándose de que no quedaban burbujas de aire debajo de la membrana.

Tras un periodo de acondicionamiento de 30 minutos se recogieron muestras de medio receptor a modo de blanco. El ensayo de difusión propiamente dicho comenzó con la disposición de la muestra correspondiente en el compartimento donador y con la puesta en marcha de la bomba y el programador, ajustando así, el flujo de trabajo del medio receptor (F_{rec}) y los intervalos de muestreo.

En los sistemas de difusión de dosis infinita puede calcularse K_p (cm/h) según la primera ley de difusión de Fick, a partir del valor del flujo del principio activo en el estado estacionario. En los experimentos llevados a cabo en el presente trabajo se realizaron en condiciones de dosis finitas, en los cuales llega a alcanzarse de forma clara el estado estacionario.

En estos casos se determina el K_p mediante el flujo máximo aparente (J_{\max}) equivalente al flujo intrínseco en el estado estacionario. Para ello, el valor de flujo aparente (J_{ap}) para cada intervalo de tiempo, calculándose el término de acumulación (dC_{rec}/dt) numéricamente a partir de los datos de C_{rec} frente al tiempo (Harrison y cols., 1995). Como se ha comentado en condiciones de dosis finitas, el flujo experimental aumenta hasta llegar a un máximo y decrece a partir de este valor. Dicho comportamiento permitió ajustar el perfil del flujo obtenido experimentalmente a una función bi-exponencial como la expresada a continuación (Córdoba-Díaz y cols., 2000):

$$J = B(e^{-v_1 t} - e^{-v_2 t}) + C$$

B es una constante relacionada con la cantidad de principio activo que ha penetrado desde cero a infinito y v_1 y v_2 son las constantes aparentes de velocidades crecientes y decrecientes del flujo.

A partir de la primera derivada de la ecuación anterior, se obtuvo el valor del tiempo en alcanzar el flujo máximo ($t_{j_{\max}}$) y flujo máximo aparente (J_{\max}). Se aplicó la primera ley de Fick lo que dió lugar a la siguiente expresión:

$$K_p = \frac{J_{\max}}{C_o}$$

C_o es la concentración de principio activo de partida en el vehículo.

El ajuste de los modelos cinéticos a los datos experimentales se llevó a cabo por regresión no lineal mediante ajuste estadísticos por mínimos cuadrados ponderados utilizando un programa estadístico adecuado SIMFIT.

En este tipo de estudios se utilizaron dosis finitas y condiciones oclusivas.

Con cada formulación se obtuvieron 3 resultados y todas las muestras se determinaron por el método de Folin-Ciocalteu.

Previo a la formulación de los geles se realizaron ensayos de difusión a partir del extracto puro y del liofilizado del extracto elegido de *S. ebulus* con dos membranas distintas, una hidrófila y la otro lipófila con el fin de elegir la membrana que presenta mayor difusión. Posteriormente se realizaron otros ensayos de difusión de los geles preparados con porcentajes crecientes del agente gelificante (Carbopol[®]-980) (1%, 1,5%), con el fin de investigar la influencia de la viscosidad del gel frente a la difusión del extracto del *S. ebulus* y seleccionar aquella concentración de agente gelificante que ofreciera menor resistencia a la difusión del principio activo en la posterior preparación de un gel.

Para dicha selección se evaluaron los perfiles de cesión del extracto puro y liofilizado obtenidos a través de la membrana de acetato de celulosa y a través de la membrana de PDMS para cada concentración de agente gelificante ensayada y el coeficiente de permeabilidad (Kp) calculado engloba en el presente estudio la difusión del extracto a través del gel, y a través de la membrana hidrófila.

De esta manera, en este desarrollo galénico se han llevado a cabo los siguientes ensayos:

- Difusión de extracto puro seleccionado a través de membrana hidrófila
- Difusión de liofilizados del extracto seleccionado a través de membrana hidrófila
- Difusión de extracto puro seleccionado a través de membrana Lipófila
- Difusión de liofilizados del extracto seleccionado a través de membrana Lipófila
- Difusión de extracto en gel con 1% de Carbopol[®]-980 membrana hidrófila.
- Difusión de liofilizados en gel con 1% de Carbopol[®]-980 membrana hidrófila.
- Difusión de extracto puro en gel con 1% de Carbopol[®]-980 membrana lipófila.
- Difusión de liofilizados en gel con 1% de Carbopol[®]-980 membrana lipófila
- Difusión de extracto puro en gel con 1.5% de Carbopol[®]-980 membrana hidrófila.
- Difusión de liofilizados en gel con 1.5% de Carbopol[®]-980 membrana hidrófila.
- Difusión de extracto puro en gel con 1.5% de Carbopol[®]-980 membrana lipófila
- Difusión de liofilizados en gel con 1.5% de Carbopol[®]-980 membrana lipófila

Variables experimentales

- Membranas de difusión:

- Membrana hidrófila de 12 kDa de capacidad de retención
- Membrana lipófila de polidimetilsiloxano (PDMS) Silmax[®] de 127 μm de grosor (Pillar Surgical, La Jolla-California)

- Temperatura (en el compartimento donador y superficie de la membrana): 32°C

- Solución receptora: PBS (pH 7,4)

- Flujo de líquido receptor (F_{rec}): 2 mL/h

- Duración del ensayo: 8 h

- Tiempo recogida receptores (t): cada hora (hasta 2 horas), cada 2 horas (de 2h a 8h) horas.

- Número de celdas por ensayo (n): 3

4. RESULTADOS y DISCUSIÓN

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL Y OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN

4.1.1. DESECACIÓN

La desecación es una operación básica farmacéutica mediante la cual se busca la eliminación total o casi total del líquido que acompaña a un sólido por métodos térmicos. Se recurre a desecar un producto cuando necesitamos incrementar su estabilidad química o microbiológica, queremos abaratar costes de transporte al reducir peso y volumen, mejorar su aspecto, modificar sus propiedades mecánicas para facilitar su manipulación posterior o como paso previo a su incorporación en otro proceso tecnológico como la compresión. Uno de los principales inconvenientes de trabajar con material vegetal es el elevado porcentaje de humedad que posee, lo cual compromete su estabilidad y manipulación. Por ello es necesario eliminar el agua de la muestra hasta valores tecnológicamente aceptables antes de su almacenamiento y uso.

Tal y como se ha indicado en el apartado correspondiente de Material y métodos, las distintas partes de la planta fueron inmediatamente desecadas tras su recolección, hasta peso constante (humedad en equilibrio de la droga) mediante secado estático. En el caso de las hojas (en sus dos estados fenológicos) se necesitó aproximadamente doce días y se registró una pérdida de humedad de 6,5%. Para los frutos maduros el tiempo de desecación fue más largo, veinte días, con una pérdida de humedad del 82,12%. Las diferencias en el tiempo de desecación y humedad residual entre frutos y hojas pueden explicarse debido al contenido en agua inicial de la muestra, las diferencias en superficie específica y el contenido en otras sustancias como azúcares, que hacen que se formen soluciones al estado de saturación.

4.1.2. OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN

Con el objetivo de utilizar el método de extracción que nos garantizase la mayor concentración de los distintos compuestos a estudiar, se realizaron extracciones de las

hojas con los dos métodos mencionados en la parte de Material y Métodos y se realizó la determinación de fenoles totales por triplicado con el reactivo de Folin-Ciocalteu obteniendo los siguientes resultados:

Método de extracción	$\mu\text{g EAG/mg muestra} \pm \text{desv. est}$
A	$44,6 \pm 0,87$
B	$18,7 \pm 0,26$

Tabla 4.1. Resultados de la determinación con Folin de los dos extractos.
Valor medio \pm desviación estándar. EAG: equivalente de ácido gálico.

Según los resultados anteriores el método de extracción A, realizado con PBS pH 7,4 y sucesivas centrifugaciones es mucho más eficaz que el método B, por lo que se seleccionó como método de extracción en el resto del estudio.

4.1.3. LIOFILIZACIÓN

Existen dos estrategias fundamentales en la conservación de extractos acuosos, la ultradesecación o la congelación. Aunque desecar la muestra por debajo de su humedad en equilibrio por técnicas como la liofilización puede resultar industrialmente muy caro, las ventajas respecto a la estabilidad de la muestra especialmente en el caso de principios activos muy termosensibles la hacen una técnica de elección.

Todos los viales con los extractos de las distintas partes de *S. ebulus* se pesaron antes y después del proceso de liofilización, y por diferencia de peso se calculó la pérdida de humedad. Los resultados de humedad perdida se recogen en la tabla 4.2.

Extracto	Humedad perdida (%)
Hoja verde	92,96
Hoja madura	94,38
Fruto verde	93,76
Fruto maduro	85,86

Tabla 4.2. Humedad perdida respecto de la masa total.

4.2. CARACTERIZACIÓN DE EXTRACTOS

4.2.1. CONTENIDO EN FLAVONOIDES TOTALES

Para realizar la cuantificación de flavonoides totales se preparó el patrón de quercetina y se midió en el espectrofotómetro conforme aparece indicado en el apartado 3.2.1. obteniéndose una señal de 0,4920 UA.

Por otro lado se realizó la extracción de flavonoides de las distintas partes de *Sambucus ebulus* L. (hojas jóvenes, hojas maduras, frutos verdes y maduros); los resultados se indican en la tabla 4.3.:

Muestra	Flavonoides totales (% quercetina)
Hojas verdes	16,3 ± 3,13
Hojas maduras	16,0 ± 0,28
Frutos verdes	32,5 ± 2,83
Frutos maduros	36,4 ± 0,49

Tabla 4.3. Contenido de flavonoides totales de extractos de las distintas partes de *S. ebulus*

Se puede observar de forma clara que los extractos más ricos en flavonoides fueron los de frutos en sus dos estados fenológicos y sin diferencia significativa entre ellos. Las dos muestras de hojas tienen un contenido en flavonoides muy inferior.

4.2.2. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO CUPRAC

Aunque el procedimiento de determinación de fenoles totales con el reactivo de Folin–Ciocalteu evalúa también la capacidad antioxidante de una muestra, es conveniente aplicar diversas técnicas *in vitro* para poder obtener conclusiones adecuadas. Esto es debido a la diversidad de mecanismos por los que los antioxidantes puede ejercer su acción y la complejidad de las muestras tipo extractos, que dependen de la solubilidad del antioxidante en las distintas fases, el tipo de sustrato oxidable o las interacciones con otros componentes entre otros. Así por ejemplo los valores obtenidos

para polifenoles por CUPRAC, son comparables a los obtenidos por TEAC y ligeramente superiores a los obtenidos por FRAP (Apak y cols., 2007).

En primer lugar se determinó la recta patrón también con ácido gálico. Los experimentos se realizaron por triplicado y se calculó el valor medio de las diferentes absorbancias. En la figura 4.1. se representa la recta patrón de las absorbancias a 450 nm frente a los μg de ácido gálico 1 mM.

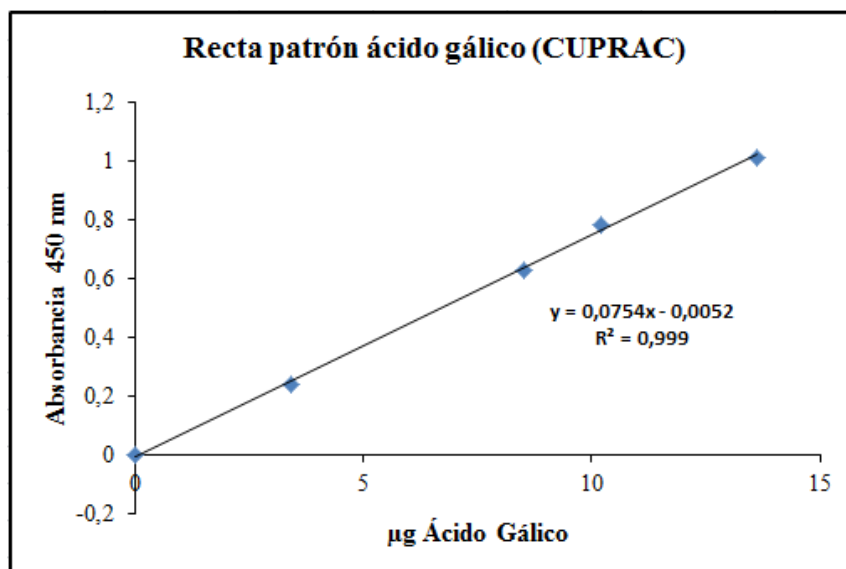


Figura 4.1. Recta patrón de la capacidad antioxidante de ácido gálico por el método CUPRAC.

El análisis de regresión de los resultados obtenidos con los patrones de ácido gálico ponen de manifiesto que el método presenta una adecuada linealidad en el rango de concentraciones establecido y que el método carece de sesgo analítico.

Para medir las muestras de extracto se sustituyó el patrón por 50 μL de extracto crudo de cada parte del *S. ebulus*, excepto en los frutos maduros que se utilizaron 20 μL de extracto crudo. Se calculó el valor de x sustituyendo en la ecuación de la recta patrón el valor de la absorbancia (y). Los resultados se obtienen a partir de las diluciones realizadas para cada muestra (Tabla 4.4).

$$= \frac{Y(abs) - a}{b} * \frac{vol_{extracto\ crudo}}{\mu\text{L}_{de\ extracto\ utilizado} * gr_{droga\ de\ partida}} * Indice_{dilución}$$

Muestra	$\mu\text{g eqv. AG}^*/\text{g muestra}$
Hojas Verdes	4.27 ± 0.05
Hojas Maduras	3.76 ± 0.05
Frutos Verdes	1.17 ± 0.02
Frutos Maduros	3.39 ± 0.06

Tabla 4.4. Método de CUPRAC. Capacidad antioxidante de las diferentes partes de *S. ebulus* expresada en μg equivalentes de ácido gálico (valor medio \pm desviación estándar)/g muestra.

En la tabla 4.4. se ve que las hojas no senescentes son las que tienen una mayor capacidad antioxidante. Por su parte las hojas senescentes y los frutos maduros poseen una capacidad antioxidante ligeramente inferior mientras que los frutos verdes presentan un valor mucho más bajo.

4.2.3. CONTENIDO TOTAL EN COMPUESTOS FENÓLICOS: MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEAU

En primer lugar se realizaron rectas patrón con ácido gálico (AG) por triplicado y se calculó el valor medio de las diferentes absorbancias. En la figura 4.2. se representa la recta patrón de absorbancias a 760 nm frente a los μg de ácido gálico presentes en la muestra.

Para medir las muestras se sustituyó el patrón por 300 μL de extracto crudo de cada parte de *S. ebulus*. Al obtener valores de absorbancia muy altos se realizaron diluciones tomando 100 μL de la mezcla (extracto + carbonato sódico 7.5% + reactivo Folin+ Agua) con 3000 μL del agua Milli-Q, dilución 1:30 y se utilizaron cubetas de cuarzo y el espectrofotómetro Beckman DU-7 a 760 nm. Se calculó el valor de x sustituyendo en la ecuación el valor de la absorbancia (y). Teniendo en cuenta las diluciones realizadas para cada muestra.

$$= \frac{Y(\text{abs}) - a}{b} * \frac{\text{vol}_{\text{extracto crudo}}}{\text{volumen de extracto utilizado} * \text{mg Droga}} * \text{Factor dilución}$$

Donde:

Y = Es la absorbancia medida.

a = Ordenada en el origen de la recta patrón

b = Pendiente de la recta patrón

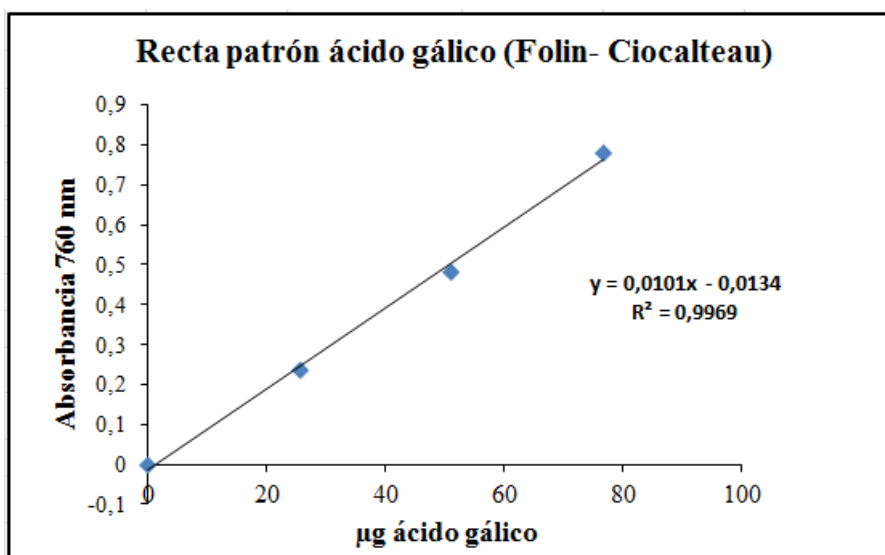


Figura. 4.2. Recta patrón de ácido gálico 2,5 mM

Los resultados se muestran en la tabla 4.5.

Muestra	μg eqv. AG/mg muestra
Hojas Verdes	45,25 ± 0,431
Hojas Maduras	44,53 ± 0,207
Frutos verdes	8,45 ± 0,195
Frutos Maduros	18,93 ± 0,209

Tabla 4.5. Método de Folin – Ciocalteu. Fenoles Totales de las diferentes partes de *S. ebulus*. (media ± desviación estándar)/mg muestra.

Los resultados (tabla 4.5.) muestran valores mayores que los obtenidos para el análisis de flavonoides totales. Esto se encuentra dentro de lo esperado, siendo los flavonoides un subgrupo de los compuestos fenólicos.

Todos los extractos (HV, HM, FV, FM) contienen compuestos fenólicos en cantidades significativas y muy parecidas exceptuando el fruto verde que tiene un valor muy por debajo de los demás. Estos resultados son congruentes con los obtenidos en los de determinación de capacidad antioxidante por el método CUPRAC.

4.2.4. ENSAYO DE CAPACIDAD ANTIRRADICALARIA: METODO DPPH

La determinación de la capacidad antirradicalaria se realizó mediante el análisis de la caída de absorción frente a radicales libres estables como el DPPH con el tiempo.

La recta patrón se realizó por triplicado y se calculó el valor medio de las diferentes absorbancias. En la figura 4.3. se representa la recta patrón de (%) de degradación del radical DPPH 0,1 mM frente a los volúmenes de Trolox 1 mM.

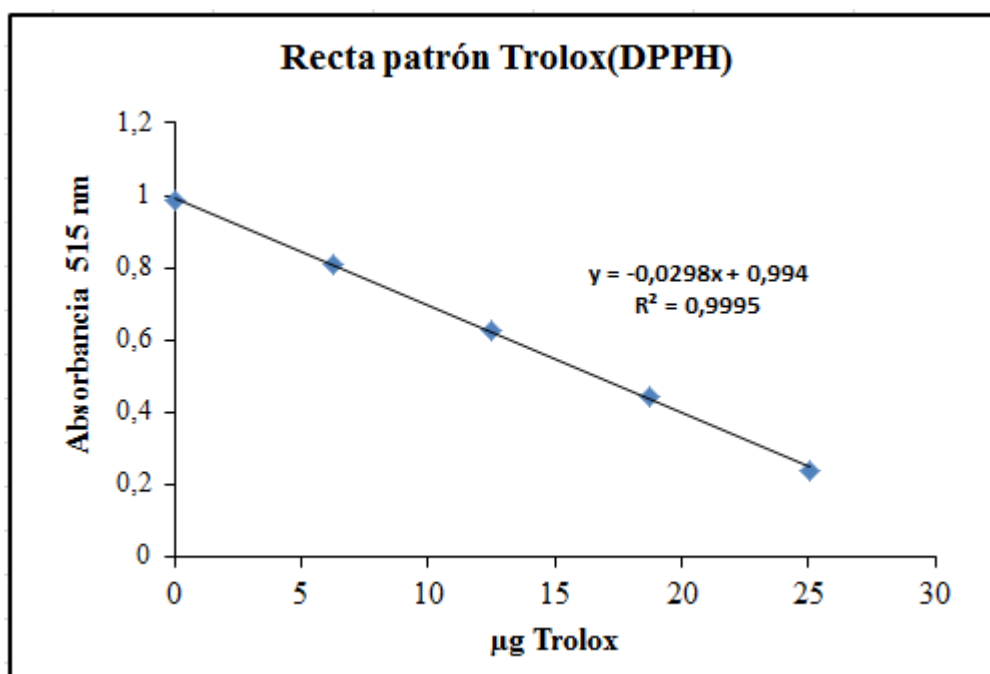


Figura 4.3. Recta patrón de Trolox[®] 1 mM

El análisis de regresión de los resultados obtenidos ponen de manifiesto que el método presenta una adecuada linealidad en el rango de concentraciones establecido y que el método carece de sesgo analítico.

Para medir las muestras de extractos sustituimos el patrón por 50 μ l de extracto crudo de cada parte del *S. ebulus*. La medida se realiza en los cuatro extractos diferentes haciendo 6 réplicas de cada uno. Los resultados se expresaron en μ g equivalentes de Trolox por gramo de peso de muestra.

Se calculó el valor de x sustituyendo en la ecuación el valor de la absorbancia (y). Los resultados se obtienen teniendo en cuenta el volumen de extracto utilizado, el volumen de extracto de partida (extracto crudo) y las diluciones realizadas para cada muestra.

Muestra	mg ET /g muestra
Hojas Verdes	5,75 \pm 0,07
Hojas Maduras	5,95 \pm 0,08
Frutos Verdes	2,14 \pm 0,04
Frutos Maduros	1,89 \pm 0,04

Tabla 4.6. Método del radical DPPH. Capacidad antirradicalaria de las diferentes partes de *S. ebulus*. (Media \pm desviación estándar)/g de muestra.

Al realizar el ensayo DPPH, se observa de nuevo la diferencia entre los valores obtenidos entre los frutos y las hojas, estas últimas mostraron los valores más altos en capacidad antirradicalaria.

Cabe mencionar que aunque distintos métodos expresen sus resultados en equivalentes Trolox, los valores no son comparables entre sí, al estar basados estos métodos en diferentes reacciones de los antioxidantes.

4.2.5. ENSAYO DE CAPACIDAD DE CAPTACIÓN DE RADICALES LIBRES: MÉTODO ORAC

Se investigó la posible actividad antioxidante de las muestras de *S. ebulus* usando el método ORAC. En la Figura 4.4. se representa la curva estándar de Trolox, con concentraciones conocidas de este antioxidante, análogo hidrosoluble de la vitamina E.

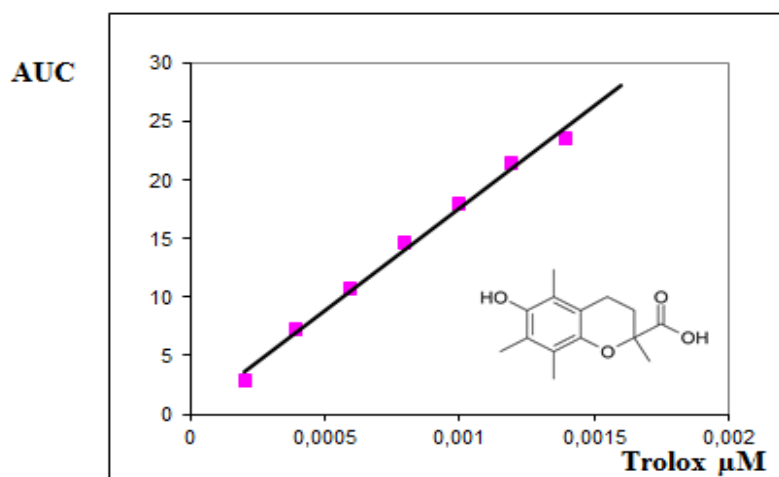


Figura 4.4. Curva de calibración de Trolox. Regresión lineal del área bajo la curva (AUC)

El análisis de regresión de los resultados obtenidos ponen de manifiesto que el método presenta una adecuada linealidad en el rango de concentraciones establecido y que el método carece de sesgo analítico.

En la tabla 4.7. se muestran los resultados de los valores de ORAC obtenidos, expresados como $\mu\text{mol Trolox/mg}$ muestra liofilizada.

Muestra	$\mu\text{mol Trolox/mg}$ muestra
Hojas Verdes	$1,80 \pm 0,41$
Hojas Maduras	$1,24 \pm 0,12$
Frutos Verdes	$1,28 \pm 0,23$
Frutos Maduros	$1,08 \pm 0,16$

Tabla 4.7. Capacidad de captación de radicales de oxígeno (método ORAC) de las distintas partes del *S. ebulus*. (media \pm desviación estándar).

Las muestras de *S. ebulus* estudiadas presentan un potencial efecto antioxidante al captar los radicales peroxilo generados por la descomposición térmica del AAPH.

4.2.6. ANALISIS COMPARATIVO DE RESULTADOS

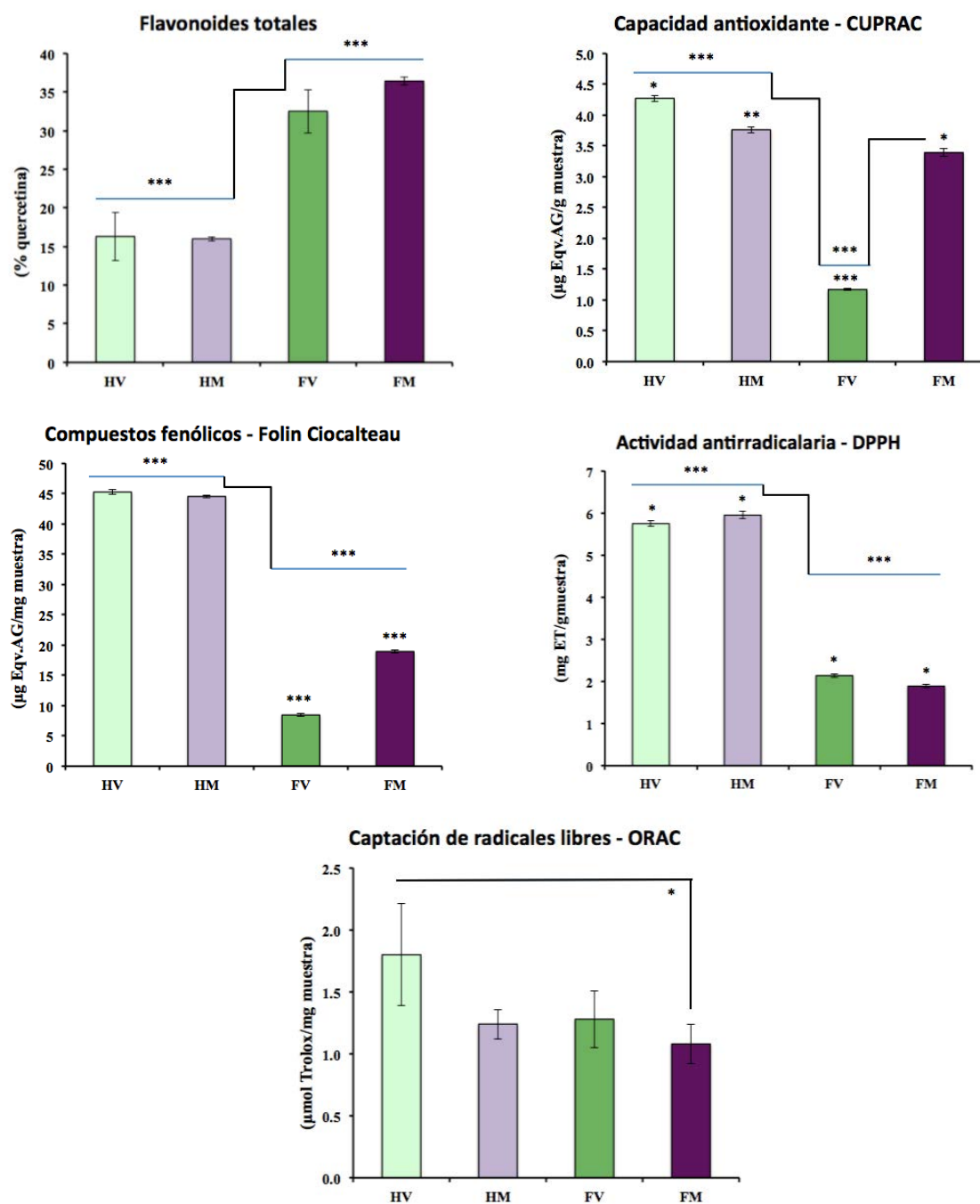


Figura 4.5. Análisis comparativo de las técnicas de evaluación de los extractos de *S. ebulus*. Los resultados fueron evaluados por un test ANOVA de una vía seguidos de un ensayo Turkey de comparación múltiple ($p < 0.05$)

Los extractos más ricos en flavonoides fueron los de frutos en sus dos estados fenológicos y sin diferencia significativa entre ellos. Las dos muestras de hojas tienen un contenido en flavonoides muy inferior. Sin embargo los resultados de los ensayos de

contenido en compuestos fenólicos (método Folin-Ciocalteu), capacidad antirradicalaria (método DPPH) y de capacidad de captación de radicales libres (método ORAC), confirman las observaciones obtenidas a partir del ensayo de capacidad antioxidante (método CUPRAC) confirmándose que las hojas verdes son las que presentan mayor capacidad antioxidantes y antirradicalaria, seguido de las hojas maduras.

Conclusión parcial

Según los resultados obtenidos con los métodos anteriores se puede apreciar que los extractos de hojas han demostrado tener más capacidad antioxidante que los extractos de frutos, con pequeños matices entre los dos estados fenológicos, a excepción del contenido de flavonoides totales donde los frutos maduros tienen el valor más alto.

Para seguir adelante con los estudios de actividad biológica y viabilidad celular se decidió descartar las hojas verdes y frutos verdes por la posibilidad de que estos extractos contengan RILs tóxicas (Girbes, 2009).

4.3. ESTUDIOS DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA

4.3.1. ESTUDIOS DE VIABILIDAD CELULAR

En este estudio se evalúa en cultivos celulares de células U373-MG, la posible incidencia que puede tener sobre la viabilidad celular, la presencia de diferentes concentraciones de los extractos seleccionados en los estudios precedentes. De esta manera, las células viables poseen un sistema enzimático mitocondrial viable capaz de degradar el MTT a un derivado coloreado denominado formazán (Takahashi y cols., 2002). Como control negativo se empleó Tritón X-100, un tensoactivo altamente citotóxico. Los resultados se muestran en la figura 4.5.:

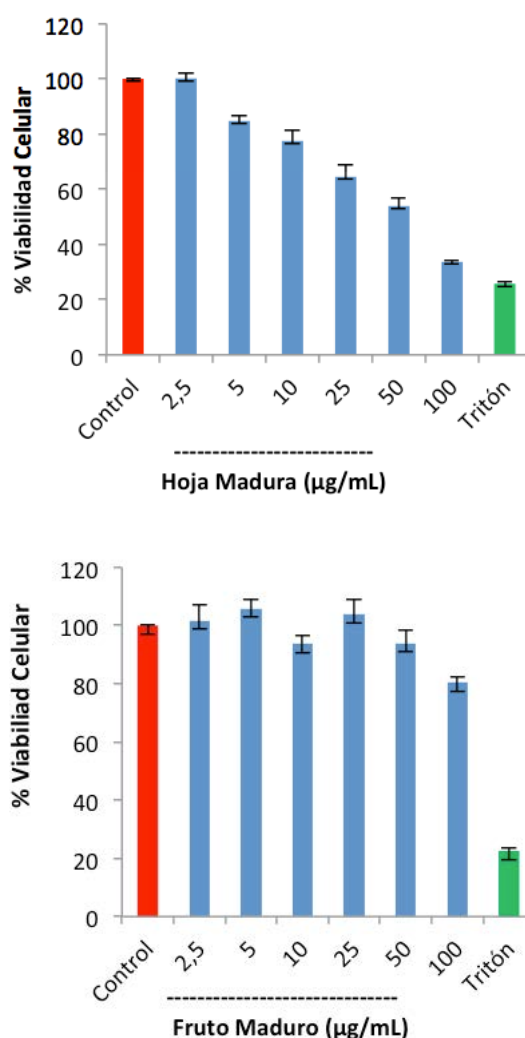


Figura 4.6. Efecto del tratamiento durante 24 horas de diferentes concentraciones de los extractos de las hojas y frutos maduros de *S. ebulus* sobre la viabilidad de las células U373 MG de astrocitoma humano.

Los resultados revelaron que ninguna de las concentraciones ensayadas para los frutos afectó de forma significativa la viabilidad de las células U373-MG comparado con las células control. Sin embargo, en el caso de las hojas se observó un decrecimiento en la viabilidad celular en función de la concentración ensayada. De esta manera, la toxicidad a la mayor concentración ensayada, 100 $\mu\text{g/mL}$, es casi igual a la determinada con el control negativo. Estos resultados podrían ser explicados debido a la presencia de cantidades residuales de RILs tóxicas en las hojas como se ha puesto de manifiesto en estudios previos de nuestro equipo de investigación. Así, mientras que en brotes recolectados en primavera, la proporción de ebulina-I es muy superior a la de la lectina dimérica no tóxica (SELId), en hojas maduras la proporción se iguala entre ambas y en hojas senescentes la presencia de ebulina-I es casi despreciable en comparación la SELId. Este hecho se puede relacionar con el rol dentro del sistema de defensa de la planta de las diferentes isoformas de ebulina (Rojo y cols., 2003). Así la ebu-I es una proteína altamente tóxica que se ha empleado en la fabricación de diversas inmunotoxinas por su toxicidad. Su IC_{50} depende del modelo celular ensayado. Así en reticulocito de conejo se ha determinado que este valor es de 0,15 nM (similar a la ricina, 0,10 nM), 0,09 nM en células cerebrales, 0,28 nM en hepatocito de rata y 64,3 nM en células HeLa (Tejero y cols., 2015).

Debido a estos resultados, las concentraciones escogidas para ensayar el efecto protector de los distintos extractos son de 5, 10, 25 $\mu\text{g/mL}$ para los frutos maduros y de 2,5, 5, 10 $\mu\text{g/mL}$ para las hojas maduras.

4.3.2. DETERMINACIÓN DEL EFECTO PROTECTOR FRENTE A DAÑO CELULAR INDUCIDO

En este estudio se pretende evaluar el efecto protector de los extractos seleccionados en el estudio de viabilidad celular, frente al daño celular causado durante treinta minutos por un agente altamente oxidante como es el peróxido de hidrógeno. Los resultados obtenidos aparecen representados gráficamente en la figura 4.6.:

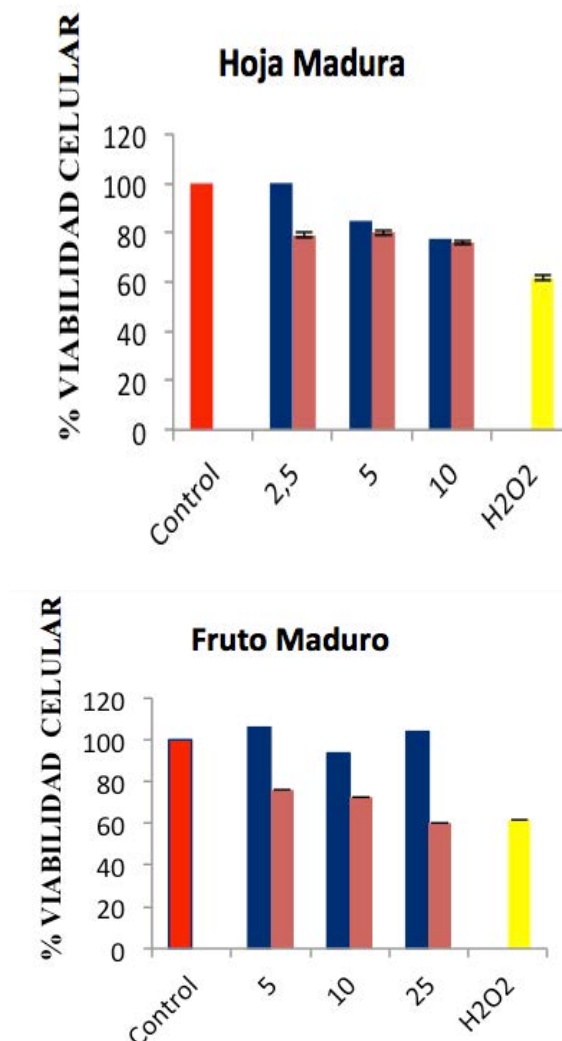


Figura 4.7. Efecto protector de extractos de hojas y frutos maduros de *S. ebulus* en un modelo de estrés oxidativo inducido por el peróxido de hidrógeno. En azul se indican los resultados de viabilidad celular del extracto y en naranja el resultado de estrés inducido por H₂O₂

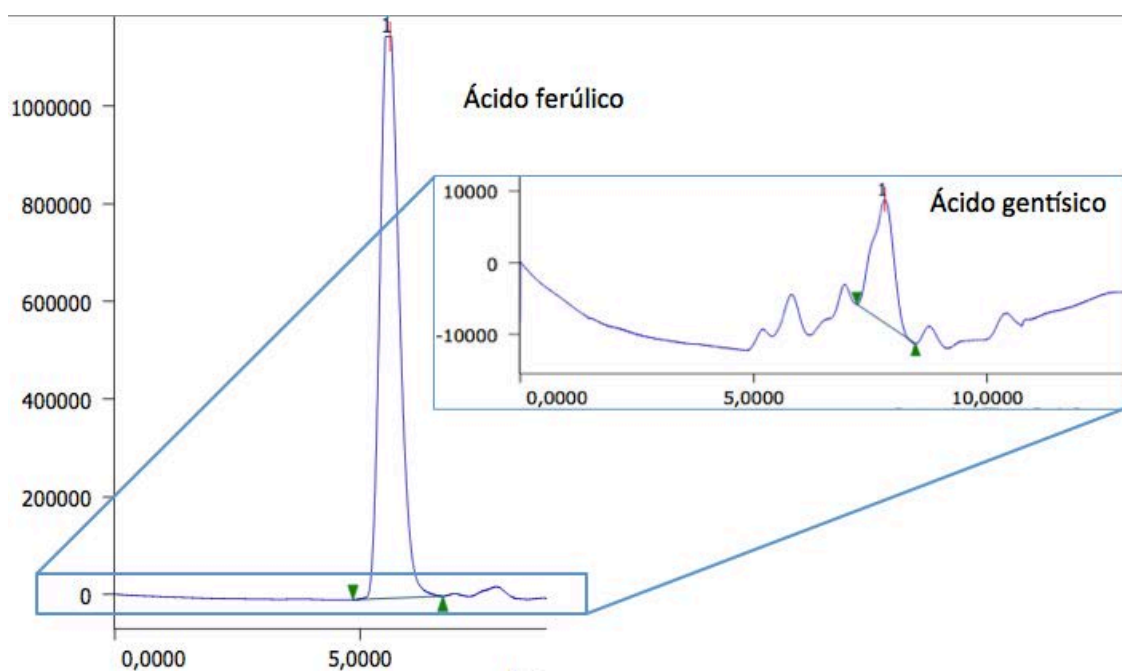
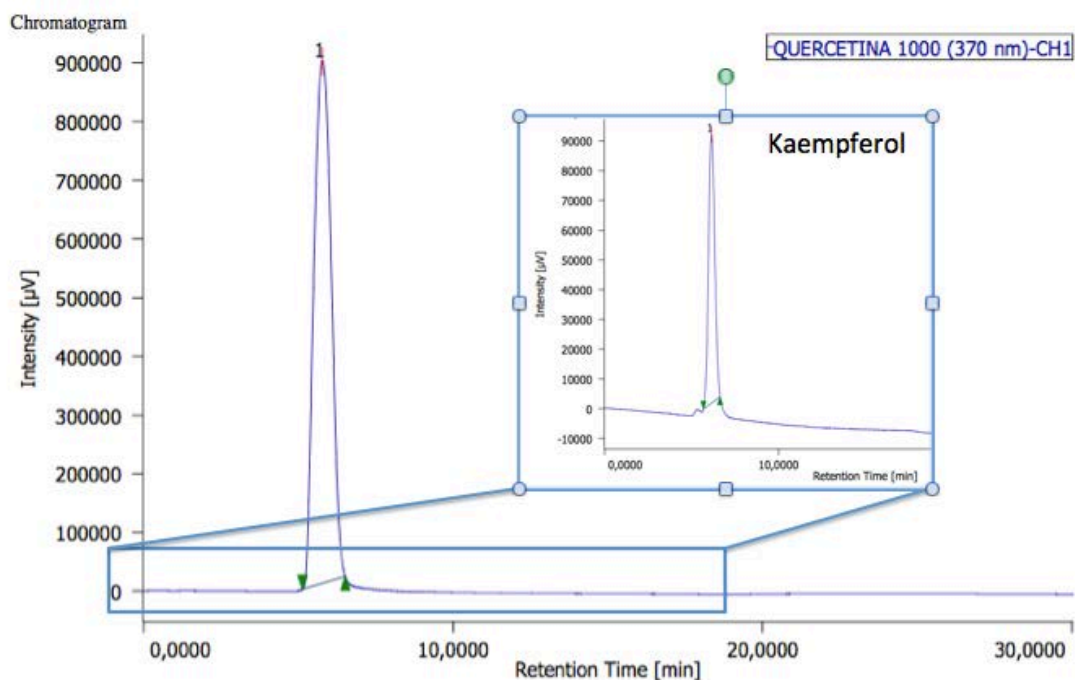
El ensayo de MTT reveló que el peróxido de hidrogeno causó una reducción de un 38% en la viabilidad celular comparado con las células control. El pretratamiento durante 24 horas con el extracto de frutos maduros de *S. ebulus* (5, 10, 25 µg/mL),

previo a la exposición a peróxido de hidrógeno 1 mM durante 30 minutos, incrementó de manera leve la viabilidad celular (Fig.4.6.). A la vista de los resultados, se puede afirmar que en el caso del extracto de frutos maduros, si bien no resulta toxico a nivel celular, tampoco ejerce un efecto protector frente al daño oxidativo directo provocado por el agente H₂O₂, especialmente a la mayor concentración ensayada (25 µg/mL)

En el caso del extracto de hojas maduras, no se observan variaciones significativas en el efecto protector frente al daño celular inducido entre las distintas concentraciones de extracto evaluadas, obteniéndose una viabilidad celular en las tres concentraciones próxima al 70%. Considerando el resultado de viabilidad celular obtenido especialmente a concentraciones bajas de extracto se puede afirmar que el extracto de hojas después de floración (maduras) es más adecuado para realizar los ensayos posteriores de elaboración y caracterización de formulaciones semisólidas. En cualquier caso, sería necesario asegurar la ausencia de ebulina-l.

4.4. ESTUDIOS DE CARACTERIZACIÓN CROMATOGRÁFICA

Tanto los patrones de referencia como los extractos se han analizado por HPLC de acuerdo a un método cromatográfico previamente implantado en nuestro equipo de investigación. En la figura 4.7. se muestran los cromatogramas obtenidos de alguno de los patrones analizados:



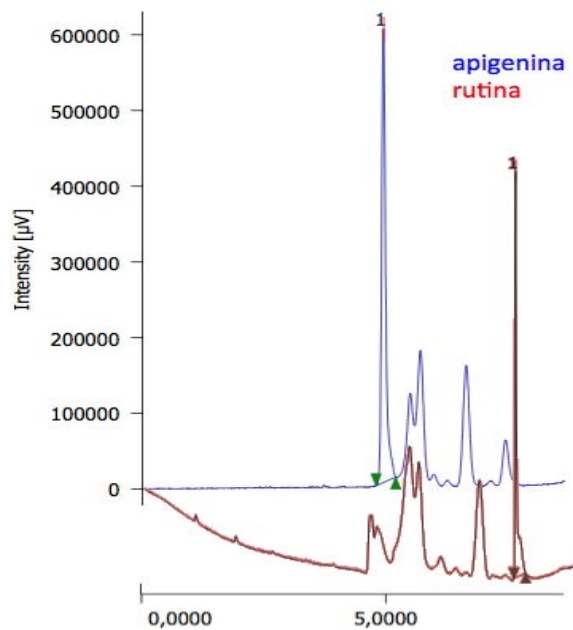


Figura 4.8. Detalle de los cromatogramas de los patrones de quercetina, kaempferol, ácido gentísico, ácido ferúlico, apigenina y rutina

Compuesto	Concentración (ppm)	t_r (min)	Long. de onda (nm)
Apigenina	235	4,925	375
Ac. cafeico	100	5,583	260
Ac. ferulico	100	5,617	260
Quercetina	500	5,775	375
Arbutina	312	5,860	375
Hesperetina	250	5,993	375
Kaempferol	1000	6,150	375
Crisoeriol	50	6,208	375
Ac. gentísico	100	7,817	260
Rutina	500	7,825	375

Tabla 4.8. Parámetros obtenidos para los patrones en las condiciones de análisis detalladas

En la siguiente figura se muestran los cromatogramas de los diferentes extractos evaluados (frutos verdes y maduros, hojas antes y después de floración) para poner de manifiesto su composición en compuestos fenólicos (flavonoides y ácidos fenólicos).

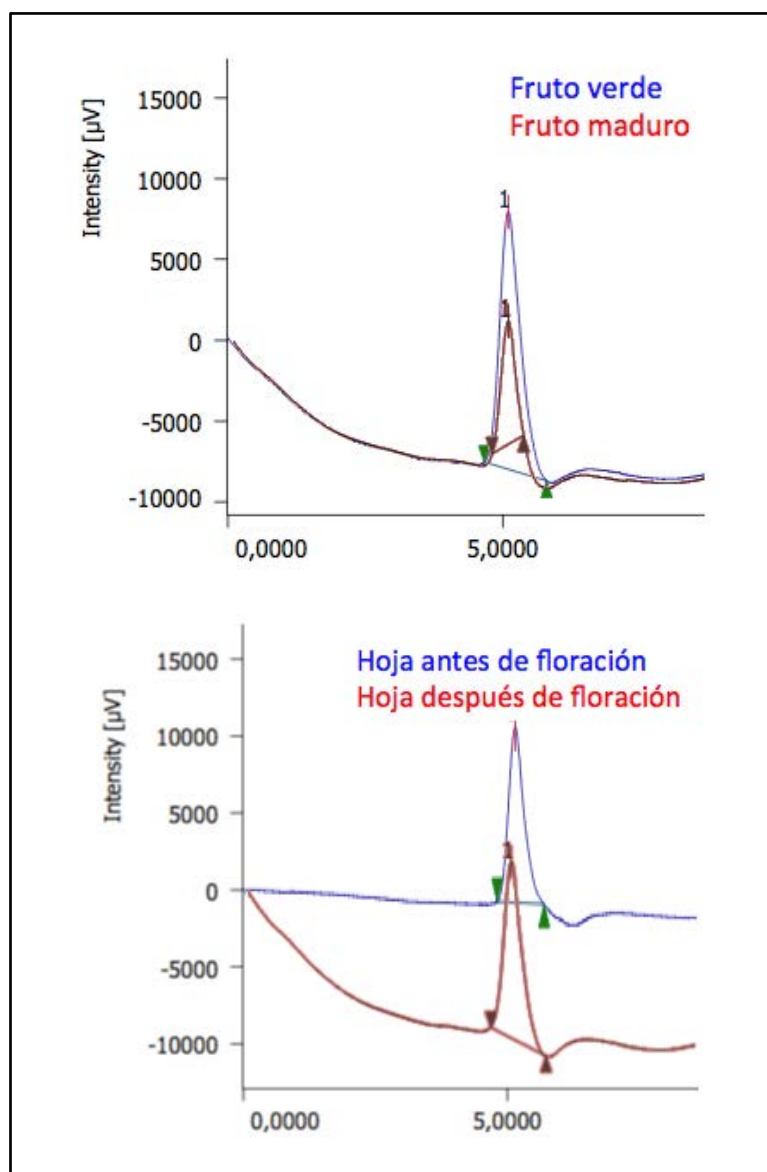


Figura 4.9. Cromatogramas de los extractos de frutos verdes y maduros, hojas antes y después de floración

A la vista de los resultados obtenidos, se han identificado distintos compuestos fenólicos (derivados del ácido cinámico, flavanoles o flavonoles), en los extractos acuosos ensayados de frutos y hojas de *S. ebulus*. Los principales polifenoles aislados han sido: quercetina, rutina y kaempferol. Los extractos de frutos verdes muestran un contenido muy superior en estos compuestos, casi el doble, que el resto de los extractos evaluados, en los que las diferencias encontradas entre ellos no son significativas.

4.5. OBTENCIÓN DE MICROPARTÍCULAS

4.5.1. OBTENCIÓN DE LAS MICROPARTÍCULAS

Se han preparado seis lotes de micropartículas de quitosano con extracto liofilizado de HM de *S. ebulus* mediante gelificación iónica y secado mediante atomización. Como variables del proceso de encapsulación se ha evaluado la influencia de la concentración de extracto (10-30% p/V) y la presencia (0,1-0,2% p/v) o ausencia de tripolifosfato sódico (TPP) como entrecruzante. El TPP es un agente reticulante no tóxico muy empleado en la industria farmacéutica para la preparación de microcápsulas y micropartículas en base quitosano mediante gelificación iónica. Esta técnica es altamente reproducible a nivel industrial permitiendo un fácil escalado ya que no requiere del uso de disolventes orgánicos, confiere una distribución de tamaños de partículas homogénea y permite modular la velocidad de liberación del sistema (Calderón y cols., 2013).

En la Tabla 4.9. se resumen las características de todas las formulaciones obtenidas, con las distintas concentraciones de extracto y del entrecruzante tripolifosfato (TPP).

Lote	CHS %(p/v)	Extracto liofilizado% (p/p)	TPP% (p/v)
M 1	0,1	10	0
M 2	0,1	10	0,1
M 3	0,1	10	0,2
M 4	0,1	30	0
M 5	0,1	30	0,1
M 6	0,1	30	0,2

Tabla 4.9. Condiciones de preparación de las micropartículas de quitosano (CHS) cargadas de extracto liofilizado de HM de *S. ebulus* y entrecruzadas con TPP.

Los resultados obtenidos en relación al rendimiento del proceso de atomización y a la eficiencia de encapsulación se muestran en la Tabla 4.10.

LOTE	RA %	E.E%
M 1	69,29	56,57
M 2	62,11	54,95
M 3	60,26	52,32
M 4	72,23	62,39
M 5	63,31	61,13
M 6	62,74	58,64

Tabla 4.10. Rendimiento de atomización (RA) y eficiencia de encapsulación (EE) de micropartículas de *S. ebulus* obtenidas por atomización.

El rendimiento de atomización varió entre un 60,23% (lote M3) y un 72,23% (lote M4). Se observó que la viscosidad de la solución que se atomiza influye en el rendimiento final del proceso y en la eficacia de encapsulación. En general, las soluciones más viscosas dieron lugar a rendimientos inferiores (lotes M3 y M6), obteniéndose rendimientos de atomización más altos en las formulaciones sin TPP (lotes M1 y M4). Existen varios estudios en los que se han obtenido rendimientos similares a los obtenidos en este trabajo o inferiores (Gavini y cols., 2008; Martinac y cols., 2005; Giunchedi y cols., 2002). Las pérdidas de producto se deben principalmente a la adhesión de material a las paredes del ciclón y del compartimento de secado del equipo (Pavanetto y cols., 1992). Además, existen pérdidas de las micropartículas más pequeñas y ligeras a través del sistema de aspiración (Martinac y cols., 2005). El rendimiento también es menor cuando los lotes atomizados son pequeños (Giunchedi y cols., 2002; Gavini y cols., 2006). La eficiencia térmica de la atomización está relacionada con la energía térmica de entrada y con la cantidad de calor utilizada para la evaporación. La eficiencia óptima de atomización se puede lograr consiguiendo un balance entre la cantidad de calor aportado y la cantidad de calor necesaria para la evaporación, que está relacionada con la cantidad de muestra empleada (He y cols., 1998). En cuanto a la eficiencia de encapsulación, los valores obtenidos fueron intermedios. Se han descrito en la bibliografía eficiencias de encapsulación más altas (>80%) para este método de encapsulación (Gavini y cols., 2008; Stulzer y cols., 2009; Giunchedi y cols., 1998), si comparamos con los datos resultantes, si bien estas eficacias obtenidas por otro autores usaban extractos distintos por lo que los resultados

son solo orientativos a la hora de realizar una comparación con los obtenidos en el presente estudio.

4.5.2. ESTUDIOS DE LIBERACIÓN IN VITRO

Los perfiles de liberación de las micropartículas de quitosano con extracto de HM de *S. ebulus* no se pudieron determinar ya que las concentraciones obtenidas en el medio en el tiempo establecido resultaron ser muy bajas, y siempre por debajo del límite de cuantificación del método analítico de Folin-Ciocalteu. Estos resultados podrían explicarse si se produjera una excesiva interacción entre el polímero y los compuestos del extracto, lo cual ralentizaría enormemente su liberación desde el sistema. Otra posible explicación sería la poca cantidad de extracto disponible en el compartimento donador. Estudios anteriores de nuestro equipo de investigación con extractos de hoja de olivo (*Olea europea* L.) encapsulados en micropartículas de quitosano-TPP, muestran que el tamaño medio de estos sistemas es 5 μ m, por lo que su incorporación de extracto es limitada (Acosta y cols., 2015).

Conclusiones:

El rendimiento y la eficacia de encapsulación del proceso de microencapsulación de extractos de HM de *S. ebulus* es similar a los obtenidos previamente por diversos autores con extractos similares. En relación a los estudios de liberación, se ha puesto de manifiesto que la cantidad de polifenoles que son capaces de llegar al medio de difusión se encuentran por debajo del límite de detección de la metodología analítica disponible. Dado que la dosis eficaz a incorporar en la formulación tópica final iba a estar muy por debajo del intervalo de dosis requerido, se ha decidido posponer la optimización del proceso de microencapsulación y la metodología analítica a fases posteriores del proyecto.

4.6. ESTUDIOS DE DIFUSIÓN DEL EXTRACTO SELECCIONADO (HM)

Para poder diseñar adecuadamente la formulación se llevó a cabo un estudio de la capacidad de difusión tanto del extracto crudo como del liofilizado. Para ello se emplearon dos tipos de membranas, una hidrófila (celofán para diálisis con un diámetro de poro de 12 kDa y que por tanto no limita la difusión del sistema) y otra lipófila (Polidimetilsiloxano Silmax[®] de 127 μm de grosor, no porosa).

4.6.1. DIFUSIÓN DE EXTRACTO ACUOSO DE (HM) A TRAVÉS DE MEMBRANA HIDRÓFILA

- Cantidad aplicada de muestra en el compartimento donador: 0,2 g \pm 0,0g
- Cantidades difundidas: 223,92 \pm 4,39 μg EAG.

Tiempo (h)	Celda 1 (%)	Celda 2 (%)	Celda 3 (%)	Media	S _{n-1}
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
1	3,064	3,794	3,001	3,286	0,441
2	11,139	12,514	12,377	12,010	0,757
4	27,167	28,049	26,945	27,387	0,584
6	35,706	35,300	35,679	35,562	0,227
8	40,182	38,807	40,120	39,703	0,777

Tabla 4.11. Cantidades acumuladas de extracto de hojas maduras de *S. ebulus*, expresado en equivalentes de ácido gálico (EAG), en membrana hidrófila en 8 horas.

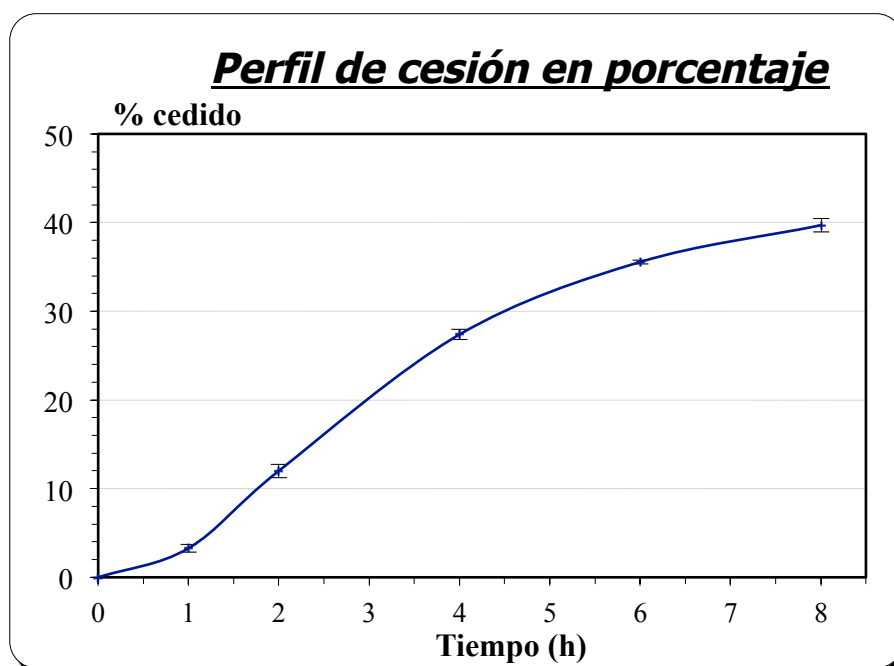


Figura 4.10. Perfil de cesión en membrana hidrófila del extracto de hojas maduras de *S. ebulus* en porcentaje respecto al tiempo.

El perfil de evolución del flujo intrínseco generado por el paquete estadístico SIMFIT fue el siguiente:

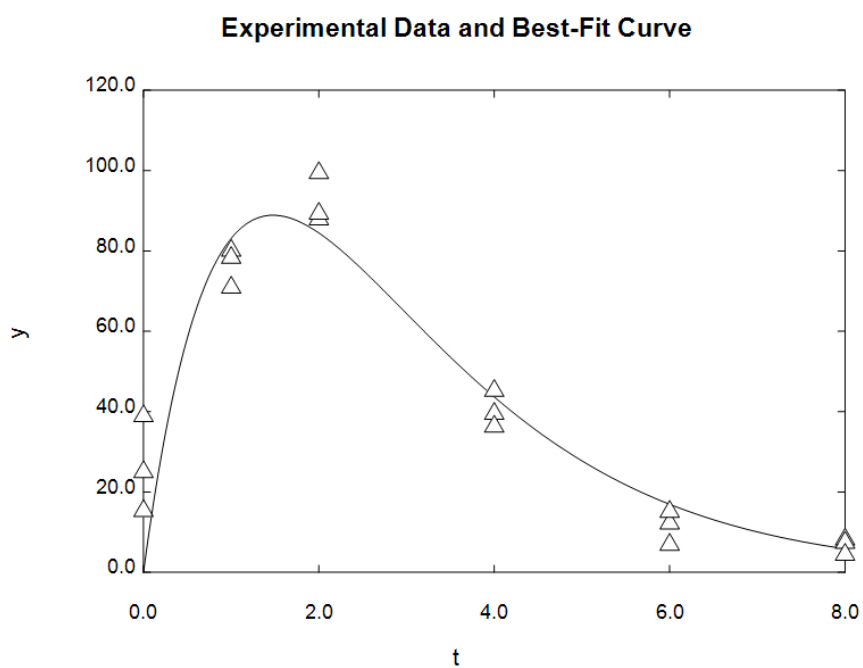


Figura 4.11. Evolución del flujo intrínseco en función del tiempo del extracto de HM de *S. ebulus* cedido a través de membrana hidrófila.

El ajuste matemático de dicho perfil llevado a cabo por el programa EXFIT del paquete SIMFIT fue el siguiente:

```

PACKAGE : SIMFIT PROGRAM : EXFIT
ACTION  : Wtd. least squares
MODEL   : Sum of 1 to n exponentials
AUTHOR  : W. G. Bardsley, University of Manchester, U.K.

Model fitted is A(n-1){exp[-k(n-1)t] - exp[-k(n)t]} +...+ etc.

For best-fit 2-exponential function

```

Parameter	Value	Std.Error	Lower95%cl	Upper95%cl	p
A(1)	2.3934E+03	1.8063E+05	-3.8262E+05	3.8741E+05	0.9896 *
A(2)	-2.3934E+03	(fixed)			
k(1)	6.4363E-01	2.5963E+00	-4.8902E+00	6.1775E+00	0.8076 *
k(2)	7.1205E-01	2.9776E+00	-5.6345E+00	7.0586E+00	0.8142 *
AUC	3.5728E+02				

```

AUC is the area under the curve from t = 0 to t = infinity
Initial time point (A) = 0.0000E+00
Final time point (B) = 8.0000E+00
Area over range (A,B) = 3.4699E+02
Average over range (A,B) = 4.3373E+01

Goodness of fit
Analysis of residuals: SSQ = 3.1132E+03
Average % coeff. of variation = 33.55%
R-squared, cc(theory,data)^2 = 0.8678
Largest Abs.rel.res. = 200.00%
Smallest Abs.rel.res. = 2.87%
Average Abs.rel.res. = 48.79%
Abs.rel.res. in range 0.1-0.2 = 22.22%
Abs.rel.res. in range 0.2-0.4 = 11.11%
Abs.rel.res. in range 0.4-0.8 = 11.11%
Abs.rel.res. > 0.8 = 16.67%
No. of negative residuals (m) = 9
No. of positive residuals (n) = 9
No. of runs observed (r) = 6
P(runs =< r : given m and n) = 0.0445 Reject at 5% sig. level
5% lower tail point = 6
1% lower tail point = 4
P(runs =< r : given m plus n) = 0.0717
P(signs =< least no. observed) = 1.0000
Durbin-Watson test statistic = 0.6811 <1.5, +ve serial correlation?
Shapiro-Wilks W statistic = 0.8560
Significance level of W = 0.0106 Reject normality
Akaike AIC (Schwarz SC) stats = 9.8755E+01 ( 1.0143E+02)

```

En función de estos datos y por desviación del modelo generado obtenemos un flujo intrínseco de $J = 78,05 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \text{h}$ y un coeficiente de permeación de $K_p = 0,09 \text{ cm/h}$.

4.6.2. DIFUSIÓN DE EXTRACTO ACUOSO DE (HM) A TRAVÉS DE MEMBRANA LIPÓFILA (PDMS)

- Cantidad aplicada de muestra en el compartimento donador: $0,2 \text{ g} \pm 0,00\text{g}$
- Cantidades difundidas: $5,50 \pm 0,43 \text{ EAG } \mu\text{g}$.

Tiempo (h)	Celda 1 (%)	Celda 2 (%)	Celda 3 (%)	Media	S _{n-1}
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
1	0,135	0,130	0,141	0,135	0,006
2	0,315	0,276	0,287	0,293	0,020
4	0,619	0,524	0,558	0,567	0,048
6	0,868	0,739	0,773	0,793	0,067
8	1,105	0,954	0,987	1,015	0,079

Tabla 4.12. Cantidades acumuladas de extracto de hojas maduras de *S. ebulus*, expresado en equivalentes de ácido gálico (EAG), en membrana lipófila en 8 horas.

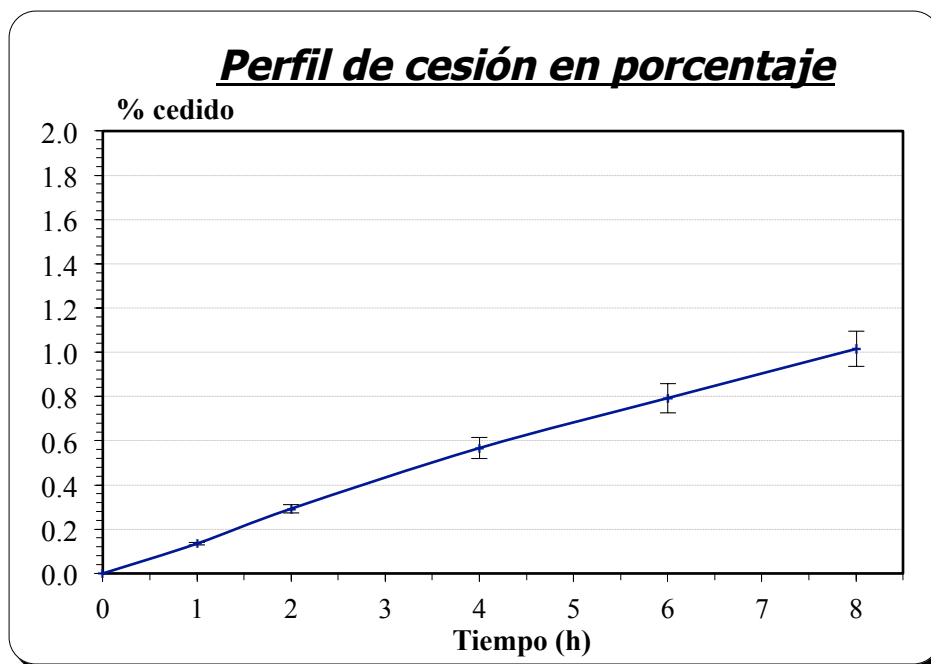


Figura 4.12. Perfil de cesión en membrana lipófila del extracto de hojas maduras de *S. ebulus* en porcentaje respecto al tiempo.

4.6.3. DIFUSIÓN DE EXTRACTO LIOFILIZADO DE (HM) A TRAVÉS DE MEMBRANA HIDRÓFILA

- Cantidad aplicada de muestra en el compartimento donador: $0,2 \pm 0,0$ g
- Cantidades difundidas: $372,68 \pm 28,95$ μ g EAG.

Tiempo (h)	Celda 1 (%)	Celda 2 (%)	Celda 3 (%)	Media	S _{n-1}
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
1	1,879	1,918	1,403	1,733	0,287
2	58,890	58,482	48,565	55,312	5,847
4	71,289	69,171	59,142	66,534	6,488
6	77,705	75,168	65,885	72,919	6,223
8	80,936	78,508	69,664	76,369	5,933

Tabla 4.13. Cantidades acumuladas de extracto liofilizado de hojas maduras de *S. ebulus* expresado en equivalentes de ácido gálico (EAG), en membrana hidrófila tras 8 horas.

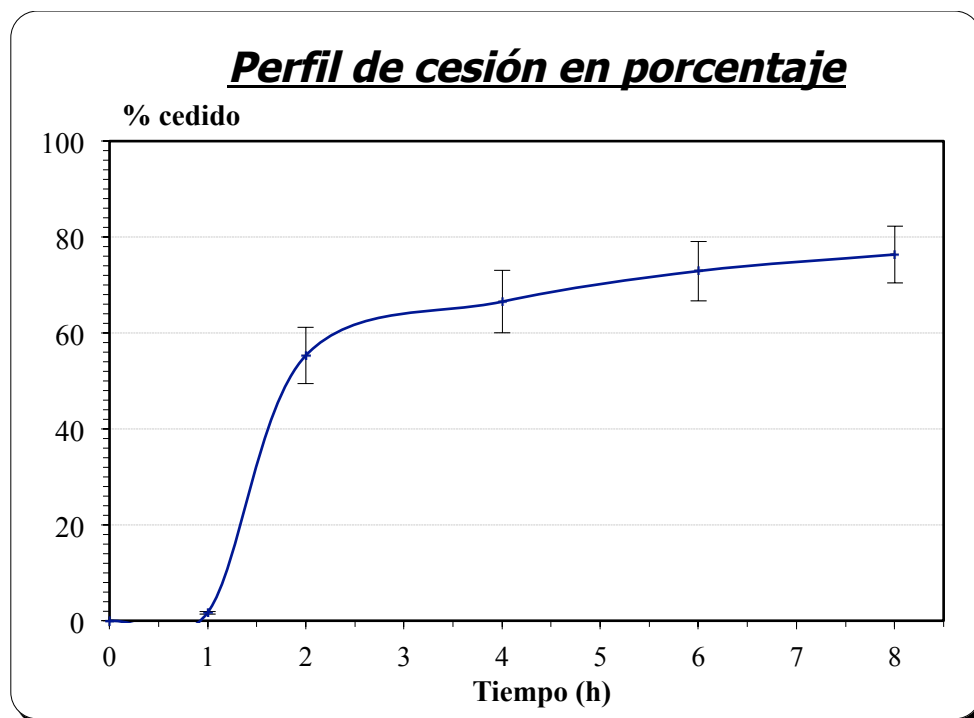


Figura 4.13. Perfil de cesión en membrana hidrófila del extracto liofilizado de hojas maduras de *S. ebulus* en porcentaje respecto al tiempo.

El perfil de evolución del flujo intrínseco generado por el paquete estadístico SIMFIT se representa en la siguiente figura:

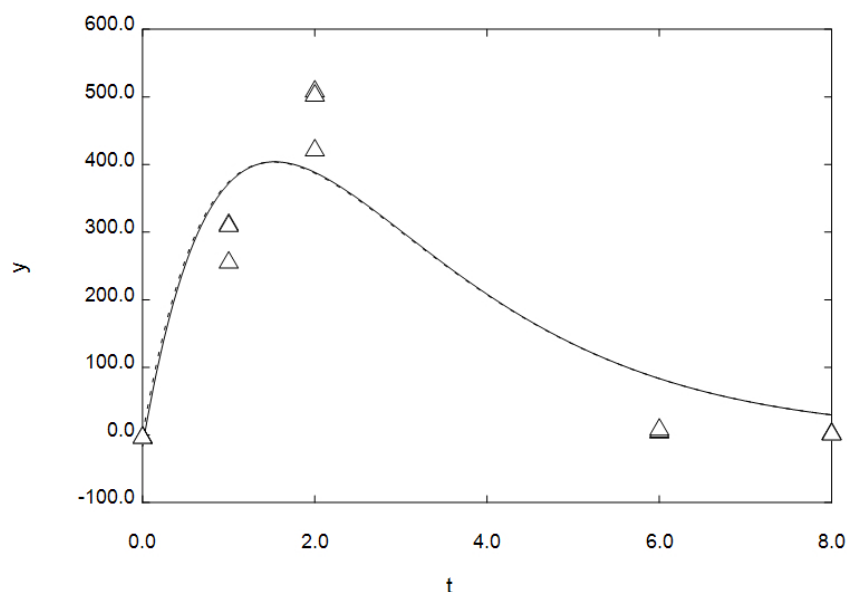


Figura 4.14. Evolución del flujo intrínseco en función del tiempo del extracto liofilizado de HM de *S. ebulus* cedido a través de membrana hidrófila.

El ajuste de dicho perfil llevado a cabo por el programa EXFIT del paquete SIMFIT fue el siguiente:

```

PACKAGE : SIMFIT PROGRAM : EXFIT
ACTION  : Wtd. least squares
MODEL   : Sum of 1 to n exponentials
AUTHOR  : W. G. Bardsley, University of Manchester, U.K.

Model fitted is A(n-1){exp[-k(n-1)t] - exp[-k(n)t]} +...+ etc.

For best-fit 2-exponential function

```

Parameter	Value	Std.Error	Lower95%cl	Upper95%cl	p
A(1)	1.6795E+04	3.9790E+06	-8.6527E+06	8.6863E+06	0.9967 *
A(2)	-1.6795E+04	(fixed)			
k(1)	6.3781E-01	5.0049E+00	-1.0267E+01	1.1542E+01	0.9007 *
k(2)	6.8089E-01	5.4961E+00	-1.1294E+01	1.2656E+01	0.9035 *

```

AUC 1.6659E+03
AUC is the area under the curve from t = 0 to t = infinity
Initial time point (A) = 0.0000E+00
Final time point (B) = 8.0000E+00
Area over range (A,B) = 1.6121E+03
Average over range (A,B) = 2.0151E+02

Goodness of fit
Analysis of residuals: SSQ = 6.9764E+04
Average % coeff. of variation = 48.16%
R-squared, cc(theory,data)^2 = 0.8957

```

```

Largest Abs.rel.res.      = 165.75%
Smallest Abs.rel.res.    = 0.00%
Average Abs.rel.res.     = 68.45%
Abs.rel.res. in range 0.1-0.2 = 13.33%
Abs.rel.res. in range 0.2-0.4 = 20.00%
Abs.rel.res. in range 0.4-0.8 = 0.00%
Abs.rel.res. > 0.8      = 40.00%
No. of negative residuals (m) = 9
No. of positive residuals (n) = 3
No. of runs observed (r)   = 3
P(runs =<= r : given m and n) = 0.0545
5% lower tail point       = 2
1% lower tail point       = 2
P(runs =<= r : given m plus n) = 0.0327
P(signs =<= least no. observed) = 0.1460
Durbin-Watson test statistic = 1.2284 <1.5, +ve serial correlation?
Shapiro-Wilks W statistic = 0.8981
Significance level of W    = 0.0892
Akaike AIC (Schwarz SC) stats = 1.3267E+02 ( 1.3480E+02)

```

En función de estos datos y por desviación del modelo generado obtenemos un flujo intrínseco de $J = 403,76 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \text{ h}$ y un coeficiente de permeación de $K_p = 0,55 \text{ cm/h}$

4.6.4. DIFUSIÓN DE EXTRACTO LIOFILIZADO DE HOJAS MADURAS DE *S. EBULUS* A TRAVÉS DE MEMBRANA LIPÓFILA (PDMS)

- Cantidad aplicada de muestra en el compartimento donador: $0,2 \pm 0,0 \text{ g}$
- Cantidad difundidas: $5,38 \pm 0,18 \mu\text{g EAG}$.

Tiempo (h)	Celda 1 (%)	Celda 2 (%)	Celda 3 (%)	Media	S_{n-1}
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
1	0,157	0,121	0,145	0,141	0,018
2	0,296	0,260	0,290	0,282	0,019
4	0,586	0,562	0,568	0,572	0,012
6	0,852	0,792	0,798	0,814	0,033
8	1,106	1,046	1,040	1,064	0,036

Tabla 4.14. Cantidades acumuladas de extracto liofilizado de hojas maduras de *S. ebulus* expresado en equivalentes de ácido gálico (EAG), en membrana lipófila tras 8 horas.

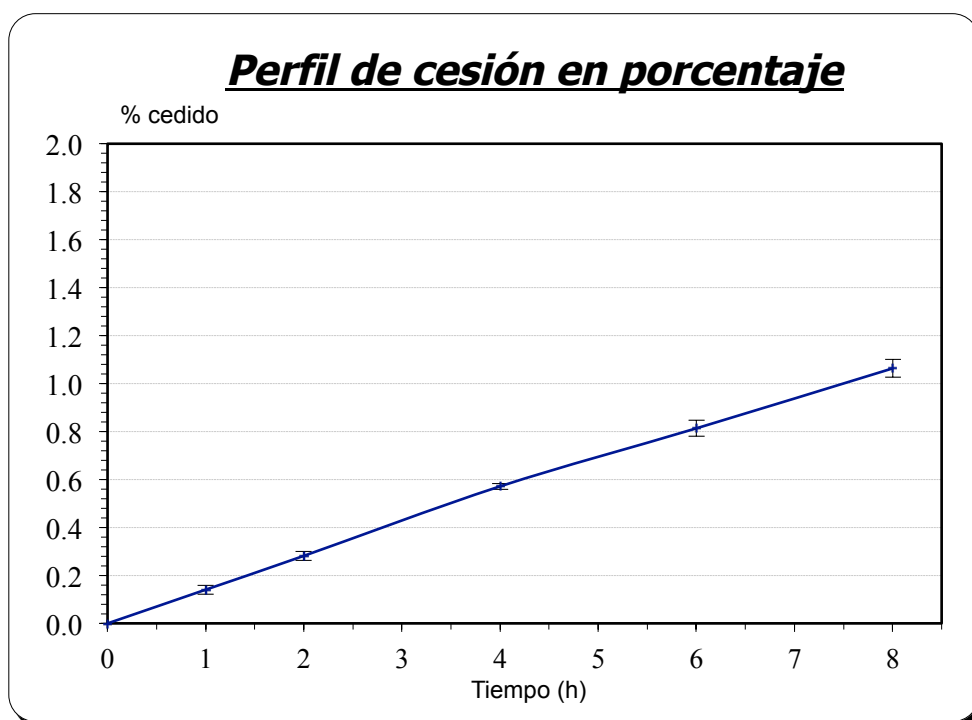


Figura 4.15. Perfil de cesión en membrana lipófila del extracto liofilizado de hojas maduras de *S. ebulus* en porcentaje respecto al tiempo.

4.6.5. ANÁLISIS COMPARATIVO DE RESULTADOS

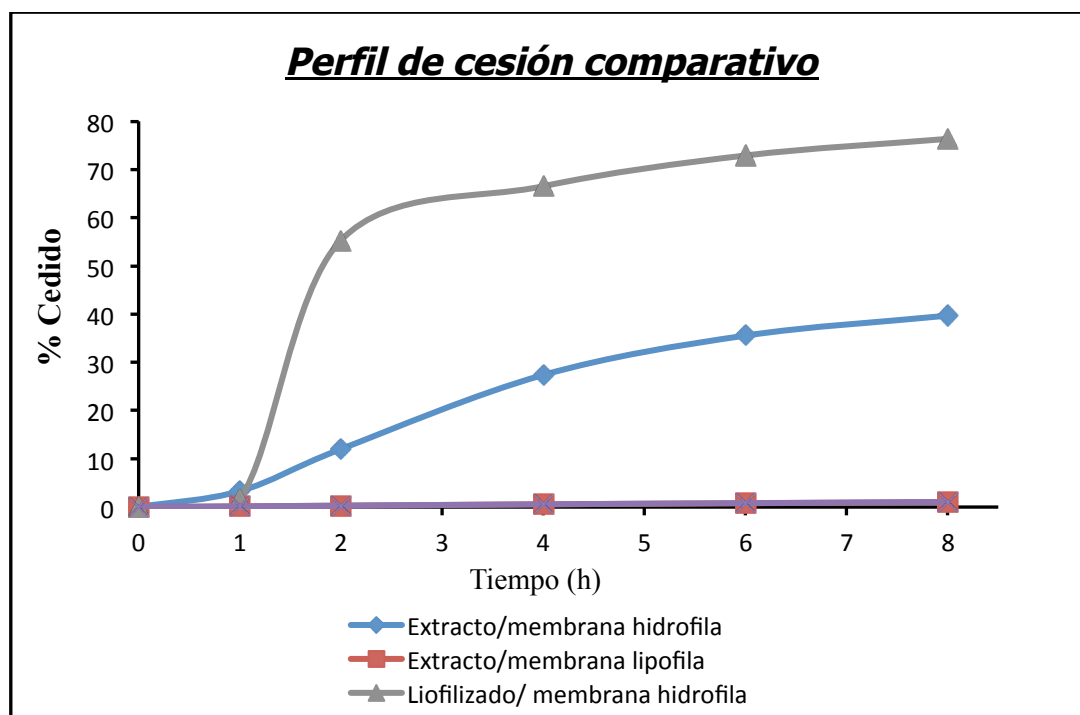


Figura 4.16. Perfiles de cesión de los distintos extractos en membrana hidrófila y lipófila durante ocho horas.

Como se puede apreciar en los perfiles de cesión obtenidos (figuras 4.16.), los extractos tanto crudos como liofilizados, son capaces de difundir fundamentalmente a través de la membrana hidrófila debido al marcado carácter hidrófilo de los compuestos que estamos analizando. En el caso de la membrana lipófila, se obtienen cesiones de alrededor de un 1% en el tiempo evaluado.

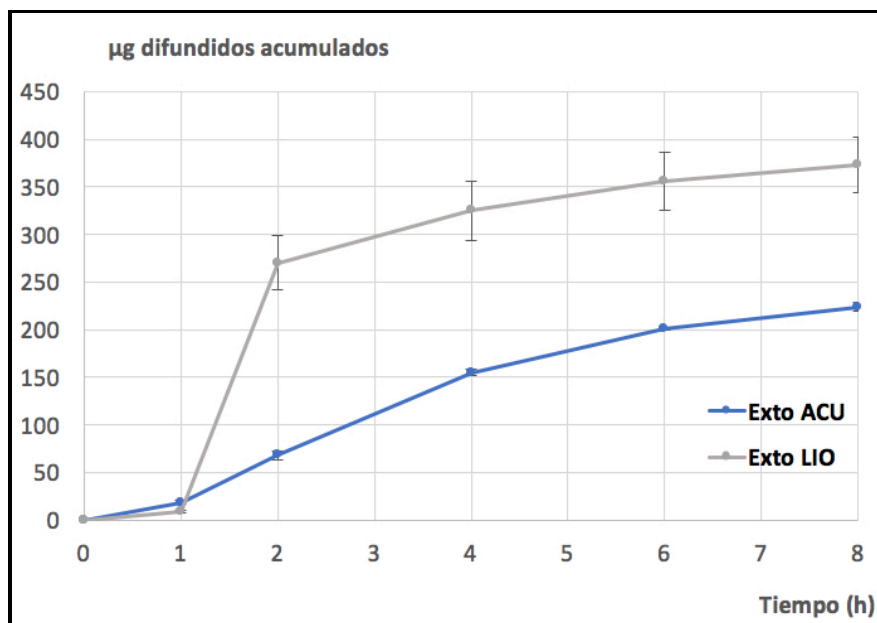


Figura 4.17. Comparativa de los microgramos difundidos acumulados a través de membrana hidrófila para el extracto crudo y liofilizado.

Comparando la difusión por membrana hidrófila de ambos extractos, se observa que en el liofilizado se produce un tiempo de latencia de una hora aproximadamente. Este tiempo de latencia se podría corresponder con la disolución de los compuestos fenólicos tras la reconstitución del liofilizado. Superada esa fase inicial, se produce un aumento brusco de las concentraciones, lo que se traduce en cesiones del orden de 50% en 2 horas, que contrasta con los niveles obtenidos en el extracto crudo en las mismas condiciones, en las que solo difundió un 10% aproximadamente en el mismo tiempo. Tras esa segunda fase de difusión rápida se estabiliza el proceso y se obtienen velocidades de difusión muy similares en ambos casos, si bien la difusión con extracto liofilizado alcanza concentraciones de casi el doble que el extracto crudo.

Conclusiones parciales

Los compuestos fenólicos difunden en las condiciones ensayadas en un porcentaje muy superior a través de la membrana hidrófila en comparación con la membrana lipófila. Por tanto, se selecciona dicha membrana para la evaluación de las formulaciones que se desarrollaran a lo largo del presente estudio.

La baja difusión al medio receptor de compuestos fenólicos a través de la membrana lipófila (< 2%), es un resultado prometedor en el diseño de formulaciones de acción tópica, al reducirse el aclaramiento sistémico y acumularse los componentes activos en tejido diana. No obstante, esta afirmación debería ser sustentada al menos en resultados de ensayos *in vitro* de absorción a través de piel.

4.7. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE GELES DE USO TÓPICO

Tras la elaboración descrita en el apartado de Material y métodos se obtuvo una serie de geles de color marrón, con olor fuerte, textura suave y gelatinosa más consistente para el gel con un 1,5% de gelificante tanto para el extracto acuoso como para el extracto liofilizado. Estas formulaciones tras un período de tiempo de seis meses a temperatura ambiente, siguen conservando las mismas características organolépticas anteriormente descritas: color, olor y textura, sin apreciarse fenómenos de separación de fases, desestructuración de la formulación o modificación de la consistencia.

4.7.1. GEL DE CARBOPOL 980 AL 1% A PARTIR DE EXTRACTO ACUOSO

4.7.1.1. Caracterización reológica mediante extensometría

Peso (g)	S ₁ (mm ²)	S ₂ (mm ²)	S ₃ (mm ²)	S _{media} ± DS (mm ²)
28	254,34	268,67	283,39	268,80 ± 14,52
78	572,27	593,66	593,66	586,52 ± 12,35
128	1224,80	1256,00	1287,60	1256,13 ± 31,40
178	1884,79	1923,45	1884,79	1897,67 ± 22,23
228	2779,10	2826,00	2779,10	2794,73 ± 27,08

Tabla 4.15. Datos experimentales de extensibilidad del gel de extracto acuoso de hojas maduras de *S. ebulus* al 1% Carbopol[®] 980

Informe del análisis de regresión de los datos extensiométricos y valor calculado del índice de extensibilidad (Ie) utilizando SIMFIT:

PACKAGE : SIMFIT PROGRAM : POLNOM
 ACTION : Best fit polynomial for calibration/evaluation
 MODEL : Model discrimination statistics up to degree 6
 AUTHOR : W. G. Bardsley, University of Manchester, U.K.

Title of current data: GEL EXTRACTO ACUOSO 1% CARBOPOL

Results for Unweighted fitting (all s = 1)

Parameter	Value	Std.Error	Lower95%cl	Upper95%cl	p
Intercept	-2.68765E+02	8.12927E+01	-4.44387E+02	-9.31432E+01	0.0057
Slope	1.27273E+01	5.55913E-01	1.15264E+01	1.39283E+01	0.0000

(R-squared = 0.9758, R = 0.9878, p = 0.0000)

Goodness of fit

```

Analysis of residuals:    SSQ = 3.0131E+05
Average % coeff. of variation =    11.19%
R-squared, cc(theory,data)^2 = 0.9758
Largest Abs.rel.res.    =    105.45%
Smallest Abs.rel.res.    =    3.76%
Average Abs.rel.res.    =    28.32%
Abs.rel.res. in range 0.1-0.2 =    20.00%
Abs.rel.res. in range 0.2-0.4 =    6.67%
Abs.rel.res. in range 0.4-0.8 =    0.00%
Abs.rel.res. > 0.8      =    20.00%
No. of negative residuals (m) =    9
No. of positive residuals (n) =    6
No. of runs observed (r)   =    3
P(runs =< r : given m and n) = 0.0030      Reject at 1% sig. level
5% lower tail point       =    4
1% lower tail point       =    3
P(runs =< r : given m plus n) = 0.0065
P(signs =< least no. observed) = 0.6072
Durbin-Watson test statistic = 0.6619 <1.5, +ve serial correlation?
Shapiro-Wilks W statistic = 0.7660
Significance level of W    = 0.0014  Reject normality
Akaike AIC (Schwarz SC) stats = 1.5262E+02 ( 1.5403E+02)

```

Values input from terminal

x-input	y-calculated	Lower95%cl	Upper95%cl
2.00000E+02	2.27670E+03	2.15550E+03	2.39790E+03

El extensograma de los resultados medios se muestra en la figura 4.18.:

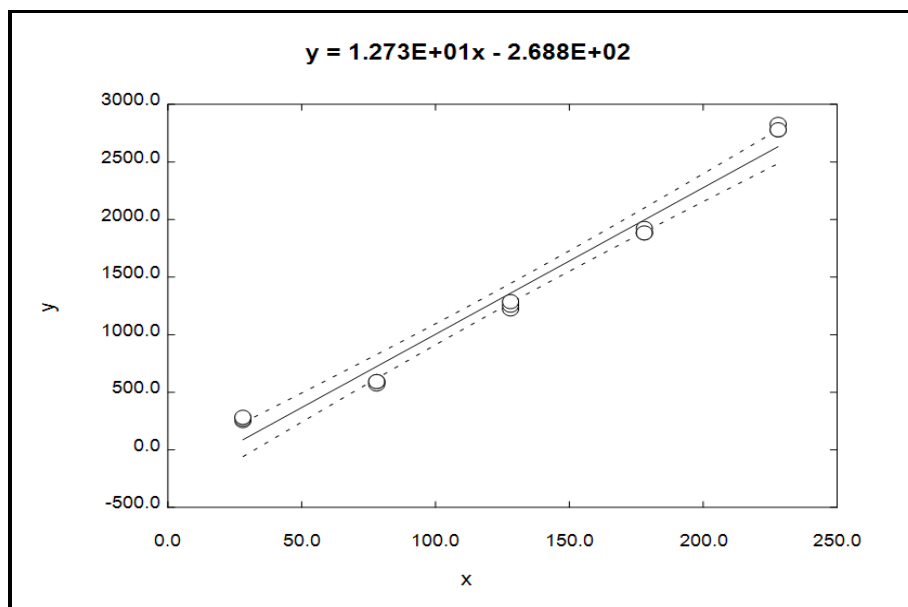


Figura 4.18. Extensograma del gel de extracto acuoso de hojas maduras de *S. ebulus* al 1% Carbopol®980: resultados y modelo generado con un I.C. (95 %).

Según los datos obtenidos mediante el análisis de regresión (SIMFIT), el índice de extensibilidad (I_e) calculado es de $2.276,7 \pm 121,2 \text{ mm}^2$ (I.C. 95 %).

4.7.1.2. Caracterización reológica mediante viscosimetría

Resultados del análisis de viscosimetría de gel de extracto acuoso de hojas maduras de *S. ebulus* al 1% Carbopol[®]980

Velocidad (rpm)	Torsión (%)	Viscosidad (Pa·s)	F. cizalla (D/cm ²)	Vel. cizalla (s ⁻¹)
0,0	0,0	0,000	0,0	0
2,5	1,3	0,511	25,5	5
5,0	1,5	0,295	29,5	10
7,5	1,6	0,210	31,4	15
10,0	1,7	0,167	33,4	20
12,5	1,8	0,141	35,4	25
15,0	1,9	0,124	37,3	30
17,5	2,0	0,112	39,3	35
20,0	2,0	0,098	39,3	40
17,5	1,9	0,107	37,3	35
15,0	1,8	0,118	35,4	30
12,5	1,7	0,134	33,4	25
10,0	1,6	0,157	31,4	20
7,5	1,5	0,196	29,5	15
5,0	1,2	0,236	23,6	10
2,5	1,0	0,393	19,6	5
0,0	0,4	0	7,9	0

Tabla 4.16. Datos experimentales de viscosidad del gel de extracto acuoso de hojas maduras de *S. ebulus* al 1% Carbopol[®]980.

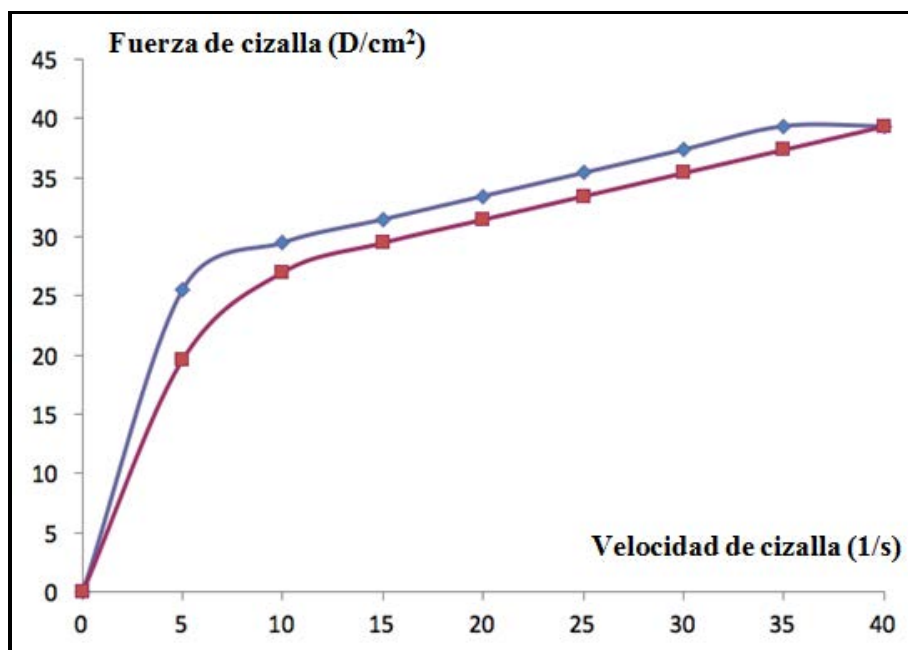


Figura 4.19. Representación gráfica de la fuerza de cizalla frente a la velocidad de cizalla del gel de extracto acuoso de hojas maduras de *S. ebulus* al 1% Carbopol® 980.

A partir de los resultados obtenidos se calculó el área bajo la curva (AUC) tanto de la rampa de subida como de la rampa de bajada para obtener finalmente la tixotropía. En este caso, la tixotropía media fue de $0,802 \pm 0,455$ Pa (I.C. 95 %).

Se realizó un ajuste por regresión lineal bi-logarítmica con los datos experimentales y se obtuvo un valor de coeficiente de consistencia, $m = 19,394 \pm 1,435$ Pa (I.C. 95 %) y un índice de comportamiento de flujo por debajo de 1 ($n = 0,223$).

4.7.1.3. Estudio de liberación de polifenoles por membrana hidrófila

- Cantidad aplicada de muestra en el compartimento donador: $0,066 \pm 0,004$ mg.
- Cantidad difundida: $367,01 \pm 48,98$ μ g EAG.

En la tabla 4.17. se muestran las cantidades de principio activo calculadas a partir de las señales obtenidas en el análisis de las muestras (Método Folin).

Tiempo (h)	Celda 1 (%)	Celda 2 (%)	Celda 3 (%)	Media	S _{n-1}
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
1	14,321	20,663	17,624	19,143	2,149
2	37,003	49,186	48,235	48,710	0,672
4	69,300	80,958	86,342	83,650	3,806
6	84,828	92,277	89,924	91,100	1,663
8	91,464	96,845	94,353	95,599	1,762

Tabla. 4.17. Cantidades acumuladas de polifenoles en compartimento receptor expresadas en equivalentes de ácido gálico (EAG) liberadas del gel de extracto acuoso de hojas maduras de *S. ebulus* al 1% Carbopol®980.

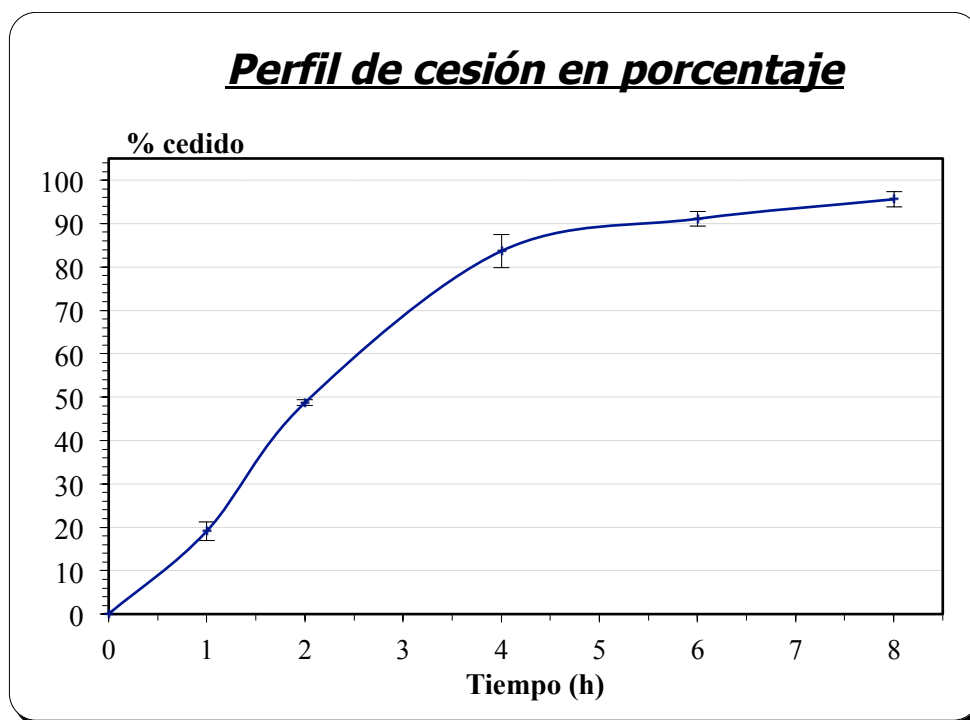


Figura 4.20. Perfil de cesión de polifenoles en compartimento receptor expresadas en porcentaje liberados del gel de extracto acuoso de hojas maduras de *S. ebulus* al 1% Carbopol®980

Calculados los perfiles de evolución de flujo intrínseco con respecto al tiempo, se genera el modelo matemático de ajuste siguiente (programa EXFIT - paquete SIMFIT):

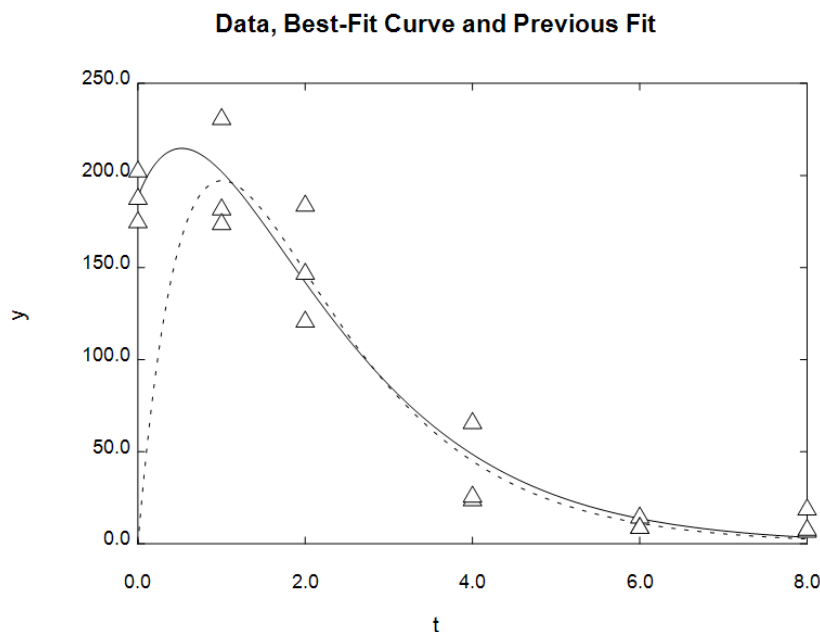


Figura 4.21. Evolución del flujo intrínseco en función del tiempo del gel de extracto acuoso de hojas maduras de *S. ebulus* al 1% Carbopol® 980.

PACKAGE : SIMFIT PROGRAM : EXFIT
ACTION : Wtd. least squares
MODEL : Sum of 1 to n exponentials
AUTHOR : W. G. Bardsley, University of Manchester, U.K.

Model fitted is $A(n-1)\{\exp[-k(n-1)t] - \exp[-k(n)t]\} + \dots + \text{etc.}$

For best-fit 2-exponential function

Parameter	Value	Std.Error	Lower95%cl	Upper95%cl	p
A(1)	9.1560E+02	6.0129E+03	-1.1901E+04	1.3732E+04	0.8810 *
A(2)	-9.1560E+02	(fixed)			
k(1)	7.2909E-01	1.4569E+00	-2.3761E+00	3.8343E+00	0.6240 *
k(2)	1.3207E+00	3.5504E+00	-6.2467E+00	8.8881E+00	0.7151 *
AUC	5.6255E+02				

AUC is the area under the curve from $t = 0$ to $t = \text{infinity}$

Initial time point (A) = 0.0000E+00

Final time point (B) = 8.0000E+00

Area over range (A,B) = 5.5889E+02

Average over range (A,B) = 6.9862E+01

Goodness of fit

Analysis of residuals: SSQ = 1.1355E+05

Average % coeff. of variation = 86.77%

R-squared, $cc(\text{theory}, \text{data})^2$ = 0.3513

Largest Abs.rel.res. = 200.00%

Smallest Abs.rel.res. = 0.15%

Average Abs.rel.res. = 68.98%

Abs.rel.res. in range 0.1-0.2 = 27.78%

Abs.rel.res. in range 0.2-0.4 = 16.67%

Abs.rel.res. in range 0.4-0.8 = 11.11%

Abs.rel.res. > 0.8 = 33.33%

No. of negative residuals (m) = 7

No. of positive residuals (n) = 11

```

No. of runs observed (r)          =          9
P(runs =< r : given m and n)      = 0.4842
5% lower tail point              =          5
1% lower tail point              =          4
P(runs =< r : given m plus n)    = 0.5000
P(signs =< least no. observed)   = 0.4807
Durbin-Watson test statistic     = 0.2987 <1.5, +ve serial correlation?
Shapiro-Wilks W statistic        = 0.6876
Significance level of W          = 0.0001 Reject normality
Akaike AIC (Schwarz SC) stats   = 1.6349E+02 ( 1.6616E+02)

```

El porcentaje medio de principio activo cedido tras 8 horas de exposición a la formulación en relación a las cantidades inicialmente dispuestas es de $95,59 \pm 1,76$. En función de estos datos y por desviación del modelo generado obtenemos un flujo intrínseco (J) de $197,22 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ y un coeficiente de permeación (K_p) de $0,28 \text{ cm/h}$.

4.7.2. GEL DE CARBOPOL 980 AL 1,5% A PARTIR DE EXTRACTO ACUOSO

4.7.2.1. Caracterización reológica mediante extensometría

Peso (g)	S ₁ (mm ²)	S ₂ (mm ²)	S ₃ (mm ²)	S _{media} ± DS (mm ²)
28	200,96	213,72	200,96	205,21 ± 7,37
78	934,35	961,63	907,46	934,48 ± 27,08
128	1163,57	1133,54	1133,54	1143,54 ± 17,34
178	1519,76	1554,50	1485,42	1519,89 ± 34,54
228	2289,06	2331,65	2246,87	2289,19 ± 42,39
278	2505,92	2505,92	2550,47	2520,77 ± 25,72
328	2640,74	2686,47	2640,74	2655,98 ± 26,40

Tabla 4.18. Datos experimentales de extensibilidad del gel de extracto acuoso de hojas maduras de *S. ebulus* al 1,5% Carbopol[®] 980

```

PACKAGE : SIMFIT PROGRAM : POLNOM
ACTION  : Best fit polynomial for calibration/evaluation
AUTHOR  : W. G. Bardsley, University of Manchester, U.K.
Title of current data: GEL EXTRACTO ACUOSO 1,5% CARBOPOL

```

Results for Unweighted fitting (all s = 1)

Parameter	Value	Std.Error	Lower95%cl	Upper95%cl	p
Intercept	3.47067E+01	6.66206E+01	-1.06523E+02	1.75936E+02	0.6095
Slope	9.15333E+00	3.80220E-01	8.34730E+00	9.95936E+00	0.0000

(R-squared = 0.9731, R = 0.9865, p = 0.0000)

Goodness of fit

```

Analysis of residuals:    SSQ = 3.0359E+05
Average % coeff. of variation =    9.60%
R-squared, cc(theory,data)^2 = 0.9731
Largest Abs.rel.res.    =    36.59%
Smallest Abs.rel.res.    =    1.14%
Average Abs.rel.res.    =    13.51%
Abs.rel.res. in range 0.1-0.2 =    11.11%
Abs.rel.res. in range 0.2-0.4 =    27.78%
Abs.rel.res. in range 0.4-0.8 =    0.00%
Abs.rel.res. > 0.8      =    0.00%
No. of negative residuals (m) =    12
No. of positive residuals (n) =    6
No. of runs observed (r)    =    5
P(runs =< r : given m and n) = 0.0276          Reject at 5% sig. level
5% lower tail point        =    5
1% lower tail point        =    4
P(runs =< r : given m plus n) = 0.0245
P(signs =< least no. observed) = 0.2379
Durbin-Watson test statistic = 0.9974 <1.5, +ve serial correlation?
Shapiro-Wilks W statistic  = 0.8323
Significance level of W     = 0.0045 Reject normality
Akaike AIC (Schwarz SC) stats = 1.7920E+02 ( 1.8098E+02)

```

Values input from terminal

x-input	y-calculated	Lower95%cl	Upper95%cl
2.00000E+02	1.86537E+03	1.78681E+03	1.94394E+03

El extensograma de los resultados medios se muestra en la figura 4.22.:

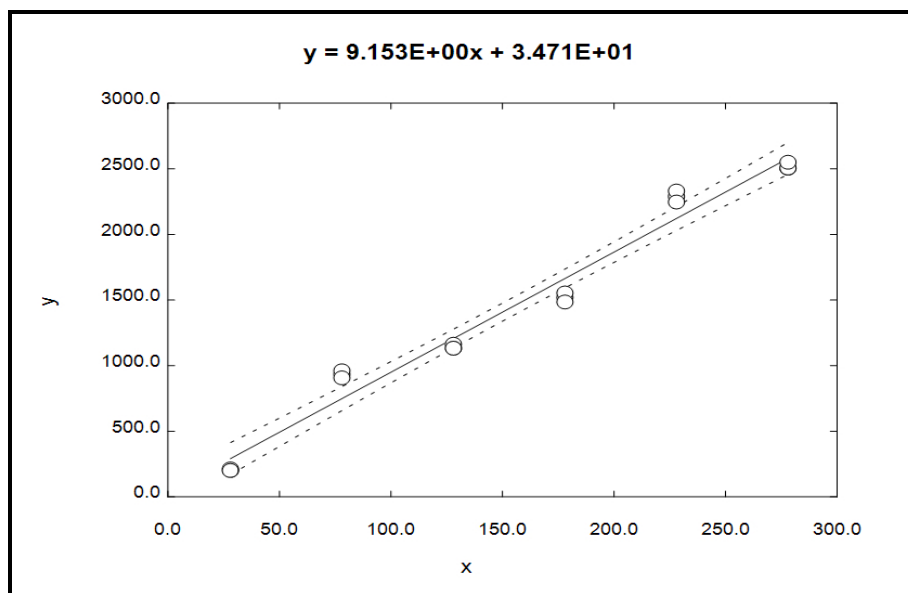


Figura 4.22. Extensograma del gel de extracto acuoso de HM de *S. ebulus* al 1,5% Carbopol®980: datos experimentales y modelo generado con un I.C. (95 %).

Según los datos obtenidos mediante el análisis de regresión (SIMFIT), el índice de extensibilidad (I_e) calculado es de $1.865,4 \pm 78,6 \text{ mm}^2$ (I.C.95 %).

4.7.2.2. Caracterización reológica mediante viscosimetría

Resultados del análisis de viscosimetría de gel de extracto acuoso de hojas maduras de *S. ebulus* al 1,5% Carbopol®980

Velocidad (rpm)	Torsión (%)	Viscosidad (Pa·s)	F. cizalla (D/cm ²)	Vel. cizalla (s ⁻¹)
0,0	0,0	0,000	0,0	0
2,5	8,9	3,497	174,9	5
5,0	10,0	1,965	196,5	10
7,5	10,9	1,428	214,2	15
10,0	11,7	1,149	229,9	20
12,5	12,3	0,967	241,7	25
15,0	12,8	0,838	251,5	30
17,5	13,3	0,747	261,3	35
20,0	13,5	0,663	265,2	40
17,5	12,7	0,713	249,5	35
15,0	12,1	0,792	237,7	30
12,5	11,4	0,896	224,0	25
10,0	10,7	1,051	210,2	20
7,5	9,9	1,297	194,5	15
5,0	8,9	1,749	174,9	10
2,5	7,6	2,986	149,3	5
0,0	3,8	0,000	0,0	0

Tabla 4.19. Datos experimentales de viscosidad del gel de extracto acuoso de hojas maduras de *S. ebulus* al 1,5% Carbopol®980.

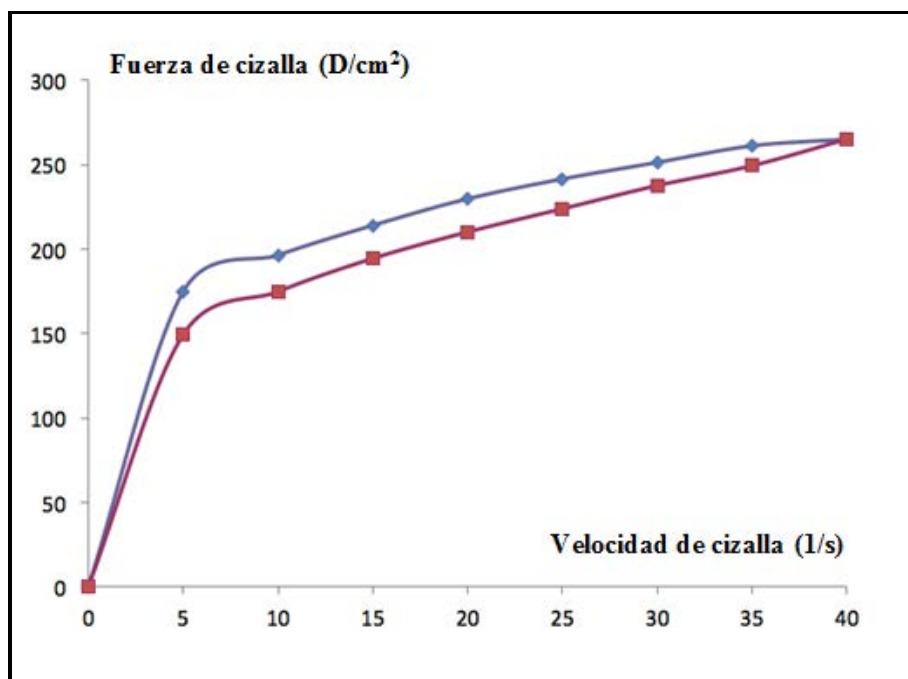


Figura 4.23. Representación gráfica de la fuerza de cizalla frente a la velocidad de cizalla del gel de extracto acuoso de hojas maduras de *S. ebulus* al 1,5% Carbopol® 980.

A partir de los resultados obtenidos se calculó la tixotropía y la consistencia media, $5,319 \pm 2,085$ Pa (I.C. 95 %) y $107,586 \pm 21,832$ Pa (I.C. 95 %) respectivamente, observándose un índice de comportamiento de flujo por debajo de 1 ($n=0,224$).

Comparando los dos geles de extracto crudo se observa que la viscosidad se va reduciendo con la fuerza de cizalla creciente, por lo que no podemos dar un valor de viscosidad puntual para caracterizar el sistema. Estos resultados sugieren que el gel de Carbopol® 980 sufre una ruptura parcial y reversible descrita por el modelo de Ostwald-de-Waele (Marcotte y cols., 2001).

Al comparar los valores de viscosidad diferencial a velocidad de cizalla constante (Ramírez-Moreno y cols. 2015, Lares y cols., 2006), en este caso 40 s^{-1} , el extremo de la rampa usada en el reograma, observamos un valor de $0,111 \pm 0,013$ para el gel de Carbopol® 980 al 1% y $0,589 \pm 0,102$ para el gel al 1,5% (media \pm IC, alfa 0,05). La conclusión principal es que un aumento en un 0,5% en la proporción de polímero, se traduce en un incremento en la viscosidad y la consistencia del orden de 5 veces, lo que va además acompañado de un aumento significativo en la tixotropía. También se demuestra que, en ambos casos, tenemos un comportamiento pseudoplástico.

4.7.2.3. Estudio de liberación de polifenoles por membrana hidrófila

- Cantidad aplicada de muestra en el compartimento donador: $0,0693 \pm 0,019$ mg.
- Cantidad difundida: $323,01 \pm 76,40$ μg EAG.

Tiempo (h)	Celda 1 (%)	Celda 2 (%)	Celda 3 (%)	Media	S _{n-1}
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
1	11,529	14,513	17,868	14,636	3,171
2	32,418	40,491	47,183	40,031	7,393
4	66,931	74,408	75,883	72,407	4,800
6	81,789	85,271	86,123	84,394	2,297
8	87,852	89,353	90,034	89,080	1,116

Tabla. 4.20. Cantidades acumuladas de polifenoles en compartimento receptor expresadas en equivalentes de ácido gálico (EAG) liberadas del gel de extracto acuoso de hojas maduras de *S. ebulus* al 1,5% Carbopol®980.

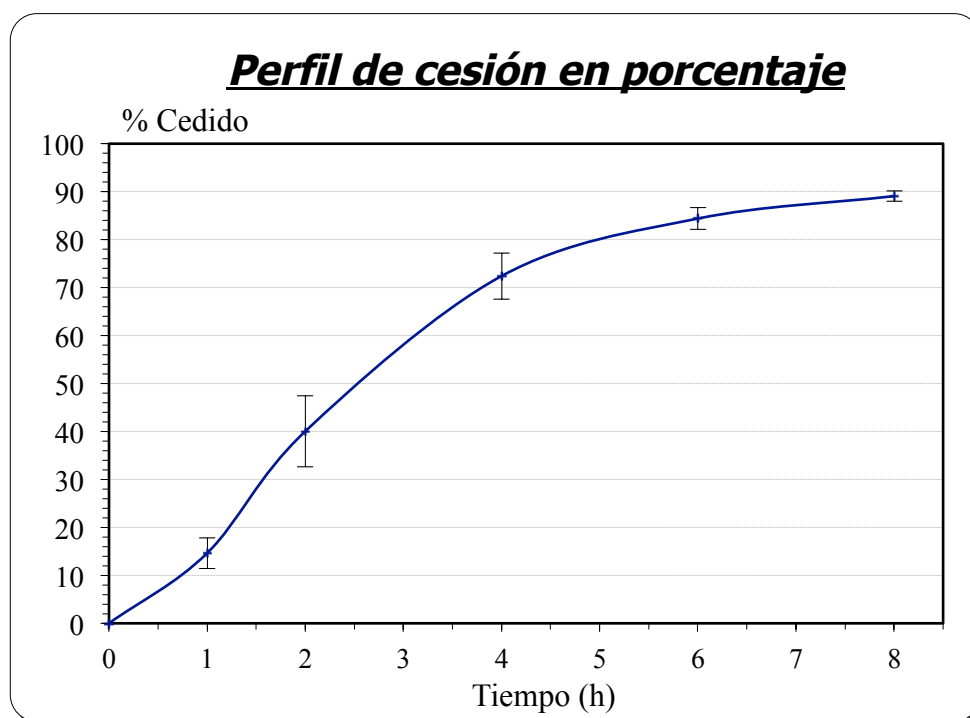


Figura 4.24. Perfil de cesión de polifenoles en compartimento receptor expresadas en porcentaje liberados del gel de extracto acuoso de hojas maduras de *S. ebulus* al 1,5% Carbopol®980

Para la determinación del flujo intrínseco, se representó la evolución del flujo en función del tiempo y se procedió a su ajuste con el paquete SIMFIT:

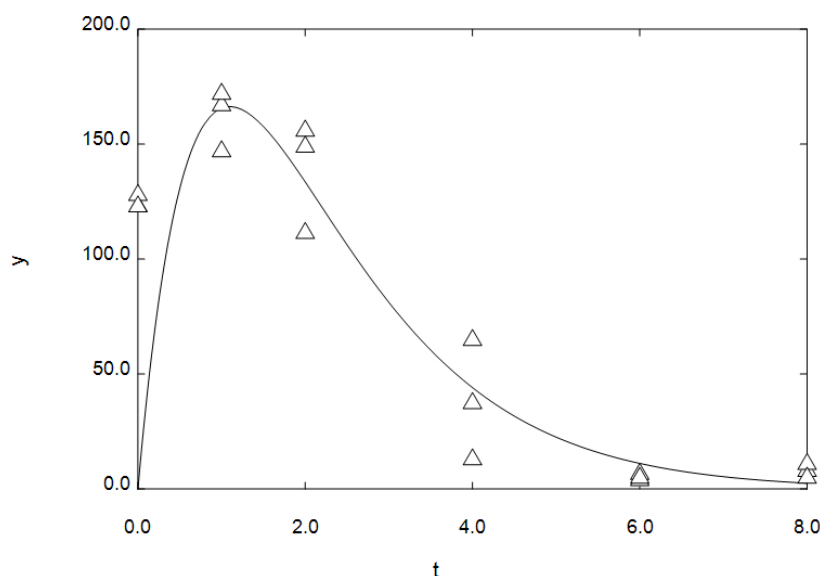


Figura 4.25. Evolución del flujo intrínseco en función del tiempo y modelo matemático generado del gel de extracto acuoso de hojas maduras de *S. ebulus* al 1,5% Carbopol® 980.

Ajuste de perfil de flujo intrínseco con respecto a t, informe SIMFIT:

```

PACKAGE : SIMFIT PROGRAM : EXFIT
ACTION  : Wtd. least squares
MODEL   : Sum of 1 to n exponentials
AUTHOR  : W. G. Bardsley, University of Manchester, U.K.
Model fitted is A(n-1){exp[-k(n-1)t] - exp[-k(n)t]} +...+ etc.

For best-fit 2-exponential function
A(1) 1.6528E+03 3.8351E+04 -8.0090E+04 8.3395E+04 0.9662 *
A(2) -1.6528E+03 (fixed)
k(1) 7.9118E-01 2.6663E+00 -4.8920E+00 6.4743E+00 0.7707 *
k(2) 1.0411E+00 3.9789E+00 -7.4398E+00 9.5219E+00 0.7972 *
AUC 5.0139E+02
AUC is the area under the curve from t = 0 to t = infinity
Initial time point (A) = 0.0000E+00
Final time point (B) = 8.0000E+00
Area over range (A,B) = 4.9805E+02
Average over range (A,B) = 6.2256E+01

Goodness of fit
Analysis of residuals: SSQ = 5.0658E+04
Average % coeff. of variation = 72.16%
R-squared, cc(theory,data)^2 = 0.5257
Largest Abs.rel.res. = 200.00%
Smallest Abs.rel.res. = 1.41%
Average Abs.rel.res. = 72.98%
Abs.rel.res. in range 0.1-0.2 = 27.78%
Abs.rel.res. in range 0.2-0.4 = 11.11%
Abs.rel.res. in range 0.4-0.8 = 11.11%
Abs.rel.res. > 0.8 = 38.89%

```

No. of negative residuals (m) = 7
 No. of positive residuals (n) = 11
 No. of runs observed (r) = 7
 P(runs \leq r : given m and n) = 0.1448
 5% lower tail point = 5
 1% lower tail point = 4
 P(runs \leq r : given m plus n) = 0.1662
 P(signs \leq least no. observed) = 0.4807
 Durbin-Watson test statistic = 0.4487 <1.5, +ve serial correlation?
 Shapiro-Wilks W statistic = 0.7201
 Significance level of W = 0.0001 Reject normality
 Akaike AIC (Schwarz SC) stats = 1.4896E+02 (1.5164E+02)

En función de estos datos y por derivación del modelo generado obtenemos un flujo intrínseco (J) de 166,39 $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \text{ h}$ y un coeficiente de permeación (Kp) de 0,22 cm/h.

Comparando la velocidad de liberación de compuestos fenólicos de ambas fórmulas, se observa un ligero retardo en el gel con 1,5% de agente polímero con respecto al de 1%. Este efecto se relaciona con el aumento de la consistencia del preparado. No obstante, cabe resaltar que aumentos de viscosidad de unas cinco veces no suponen un efecto retentivo significativo de los principios activos antioxidantes estudiados.

4.7.3. GEL DE CARBOPOL 980 AL 1% A PARTIR DE EXTRACTO LIOFILIZADO

4.7.3.1. Caracterización reológica mediante extensiometría

Resultados del análisis de extensibilidad del gel de extracto liofilizado de hojas maduras de *S. ebulus* al 1% Carbopol[®]980:

Peso (g)	S ₁ (mm ²)	S ₂ (mm ²)	S ₃ (mm ²)	S _{media} \pm DS (mm ²)
28	283,39	283,39	298,50	288,42 \pm 8,72
78	1103,91	1103,91	1133,54	1113,78 \pm 17,10
128	1923,45	1923,45	1962,50	1936,46 \pm 22,55
178	2122,64	2122,64	2205,07	2150,12 \pm 47,59
228	2640,74	2595,41	2686,47	2625,76 \pm 45,53
278	2826,00	2826,00	2826,00	2826,00 \pm 0,00

Tabla 4.21. Datos experimentales de extensibilidad del gel de extracto liofilizado de hojas maduras de *S. ebulus* al 1% Carbopol[®] 980

El análisis de regresión de dichos resultados y el índice de extensibilidad (I_e) calculado serían los siguientes:

PACKAGE : SIMFIT PROGRAM : POLNOM
ACTION : Best fit polynomial for calibration/evaluation
MODEL : Model discrimination statistics up to degree 6
AUTHOR : W. G. Bardsley, University of Manchester, U.K.

Title of current data: **GEL EXTRACTO LIOFILIZADO 1% CARBOPOL**

Results for Unweighted fitting (all $s = 1$)

Parameter	Value	Std.Error	Lower95%cl	Upper95%cl	p
Intercept	2.96838E+02	1.12721E+02	5.78810E+01	5.35795E+02	0.0181
Slope	9.99162E+00	6.43323E-01	8.62784E+00	1.13554E+01	0.0000

(R-squared = 0.9378, R = 0.9684, p = 0.0000)

Goodness of fit

Analysis of residuals: SSQ = 8.6912E+05
Average % coeff. of variation = 12.77%
R-squared, $cc(\text{theory}, \text{data})^2$ = 0.9378
Largest Abs.rel.res. = 68.31%
Smallest Abs.rel.res. = 0.78%
Average Abs.rel.res. = 17.51%
Abs.rel.res. in range 0.1-0.2 = 11.11%
Abs.rel.res. in range 0.2-0.4 = 5.56%
Abs.rel.res. in range 0.4-0.8 = 16.67%
Abs.rel.res. > 0.8 = 0.00%
No. of negative residuals (m) = 6
No. of positive residuals (n) = 12
No. of runs observed (r) = 3
P(runs \leq r : given m and n) = 0.0010 Reject at 1% sig. level
5% lower tail point = 5
1% lower tail point = 4
P(runs \leq r : given m plus n) = 0.0012
P(signs \leq least no. observed) = 0.2379
Durbin-Watson test statistic = 0.5134 < 1.5, +ve serial correlation?
Shapiro-Wilks W statistic = 0.8834
Significance level of W = 0.0298 Reject normality
Akaike AIC (Schwarz SC) stats = 1.9813E+02 (1.9991E+02)

Values input from terminal

x-input	y-calculated	Lower95%cl	Upper95%cl
2.00000E+02	2.29516E+03	2.16223E+03	2.42809E+03

El extensograma obtenido a partir de los datos extensiométricos medios, se recoge en la figura 4.26.

Según los datos obtenidos mediante el análisis de regresión (SIMFIT), el índice de extensibilidad (I_e) calculado es de $2295,1 \pm 132,9 \text{ mm}^2$ (I.C. 95 %).

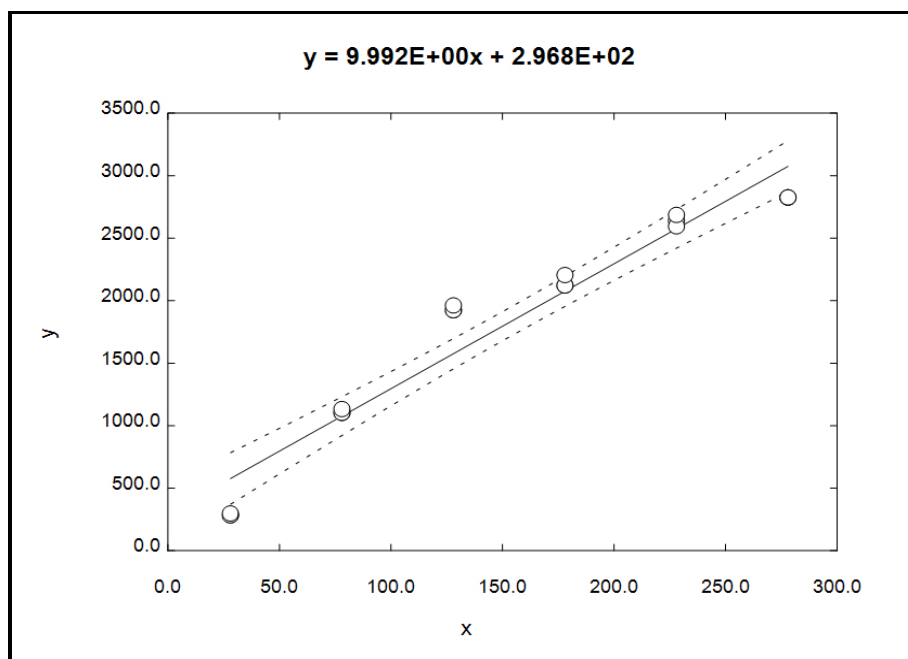


Figura 4.26. Extensograma del gel de extracto liofilizado de hojas maduras de *S. ebulus* al 1% Carbopol® 980. Datos medios \pm I.C. (95 %).

4.7.3.2. Caracterización reológica mediante viscosimetría

Velocidad (rpm)	Torsión (%)	Viscosidad (Pa·s)	F. cizalla (D/cm ²)	Vel. cizalla (s ⁻¹)
0,0	0,0	0,000	3,3	0
2,5	1,7	0,655	32,7	5,0
5,0	1,9	0,373	37,3	10,0
7,5	2,0	0,275	41,3	15,0
10,0	2,1	0,219	43,9	20,0
12,5	2,3	0,191	47,8	25,0
10,0	2,1	0,219	43,9	20,0
7,5	1,9	0,266	40,0	15,0
5,0	1,7	0,354	35,4	10,0
2,5	1,4	0,589	29,5	5,0
0,0	0,5	0,000	9,8	0,0

Tabla 4.22. Datos experimentales de viscosidad del gel de extracto liofilizado de hojas maduras de *S. ebulus* al 1% Carbopol® 980.

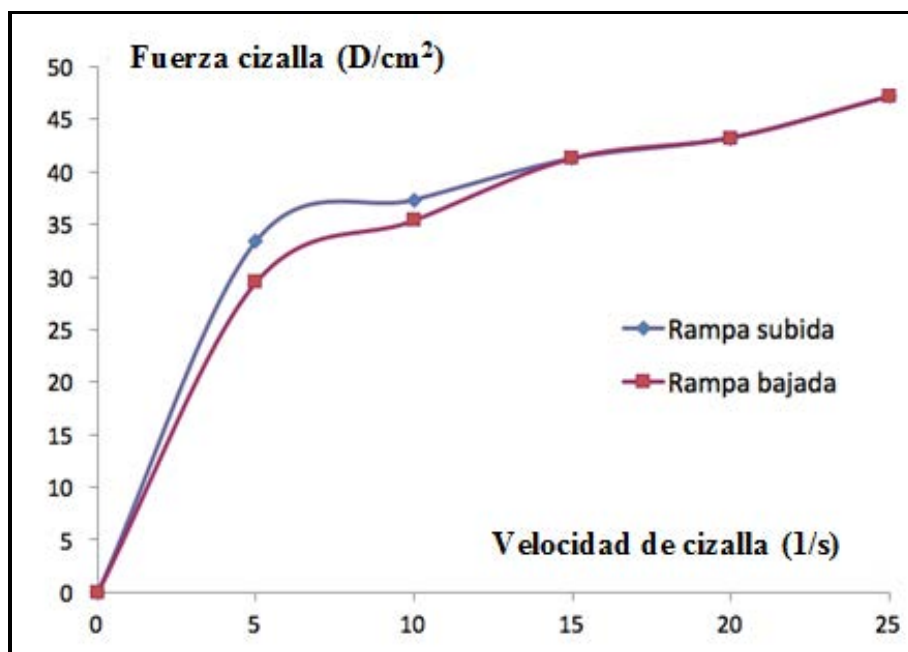


Figura 4.27. Fuerza de cizalla frente a la velocidad de cizalla del gel de extracto liofilizado de hojas maduras de *S. ebulus* al 1% Carbopol®980.

A partir de los resultados obtenidos se determinó la tixotropía media ($0,306 \pm 0,278$ Pa-I.C. 95%), la consistencia ($22,536 \pm 2,886$ Pa-I.C. 95%) y el índice n ($0,228 < 1$), lo que confirma un comportamiento pseudoplástico.

4.7.3.3. Estudio de liberación de polifenoles por membrana hidrófila

- Cantidad aplicada de muestra en el compartimento donador: $0,0844 \pm 0,031$ g
- Cantidad difundida: $336,93 \pm 2,16$ μ g EAG.

Tiempo (h)	Celda 1 (%)	Celda 2 (%)	Celda 3 (%)	Media	S _{n-1}
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
1	24,687	20,689	27,912	24,429	3,619
2	56,336	46,143	59,516	53,999	6,986
4	86,675	100,792	99,975	95,814	7,925
6	96,796	101,336	100,566	99,566	2,429
8	100,000	101,923	100,913	100,945	0,962

Tabla. 4.23. Cantidades acumuladas de polifenoles en compartimento receptor expresadas en equivalentes de ácido gálico (EAG) liberadas del gel de extracto liofilizado de hojas maduras de *S. ebulus* al 1% Carbopol®980.

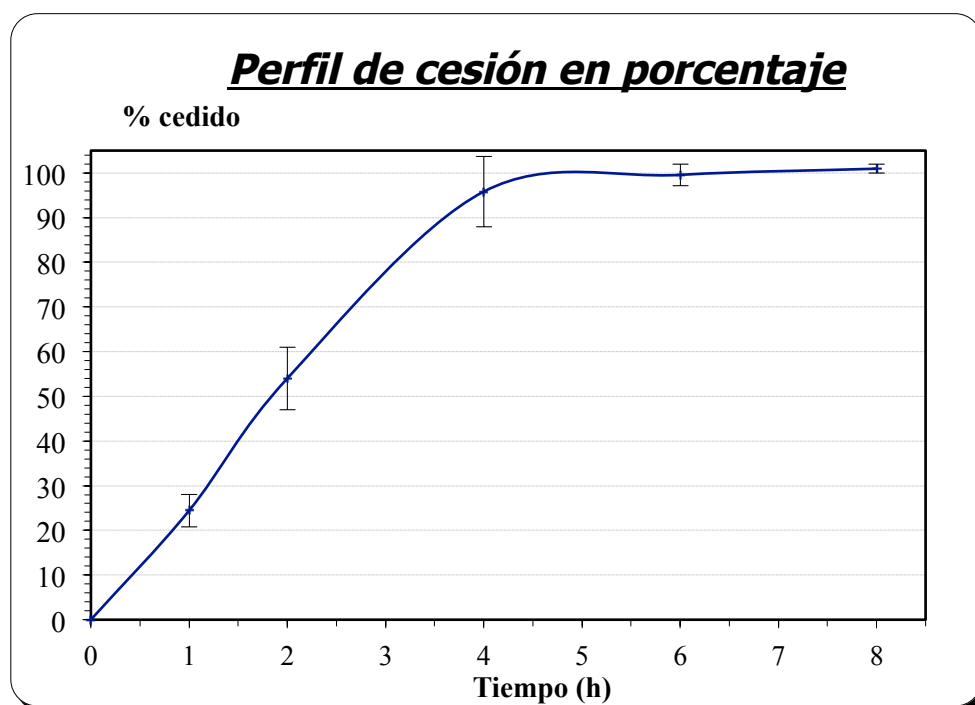


Figura 4.28. Perfil de cesión de polifenoles en compartimento receptor expresadas en porcentaje liberados del gel de extracto liofilizado de hojas maduras de *S. ebulus* al 1% Carbopol®980

El análisis de regresión de dichos resultados y el índice de extensibilidad (I_e) calculado serían los siguientes:

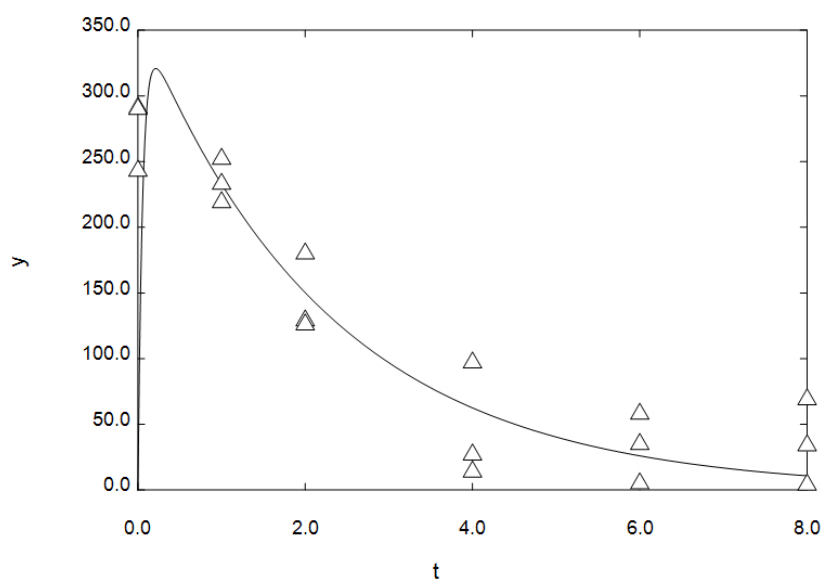


Figura 4.29. Evolución del flujo intrínseco en función del tiempo y del modelo matemático generado del gel de extracto liofilizado de hojas maduras de *S. ebulus* al 1% Carbopol®980.

PACKAGE : SIMFIT PROGRAM : EXFIT
ACTION : Wtd. least squares
MODEL : Sum of 1 to n exponentials
AUTHOR : W. G. Bardsley, University of Manchester, U.K.

Model fitted is $A(n-1)\{exp[-k(n-1)t] - exp[-k(n)t]\} + \dots + etc.$

For best-fit 2-exponential function

Parameter	Value	Std.Error	Lower95%cl	Upper95%cl	p
A(1)	3.6100E+02	4.2231E+02	-5.3913E+02	1.2611E+03	0.4061 *
A(2)	-3.6100E+02	(fixed)			
k(1)	4.3838E-01	4.5096E-01	-5.2282E-01	1.3996E+00	0.3464 *
k(2)	1.7947E+01	5.1764E+04	-1.1031E+05	1.1035E+05	0.9997 *
AUC	8.0338E+02				

AUC is the area under the curve from $t = 0$ to $t = \text{infinity}$

Initial time point (A) = 0.0000E+00

Final time point (B) = 8.0000E+00

Area over range (A,B) = 7.7868E+02

Average over range (A,B) = 9.7335E+01

Goodness of fit

Analysis of residuals: SSQ = 2.4414E+05

Average % coeff. of variation = 98.05%

R-squared, $cc(\text{theory}, \text{data})^2$ = 0.1340

Largest Abs.rel.res. = 200.00%

Smallest Abs.rel.res. = 0.91%

Average Abs.rel.res. = 80.09%

Abs.rel.res. in range 0.1-0.2 = 16.67%

Abs.rel.res. in range 0.2-0.4 = 5.56%

Abs.rel.res. in range 0.4-0.8 = 22.22%

Abs.rel.res. > 0.8 = 38.89%

No. of negative residuals (m) = 7

No. of positive residuals (n) = 11

No. of runs observed (r) = 11

$P(\text{runs} \leq r : \text{given } m \text{ and } n)$ = 0.8405

5% lower tail point = 5

1% lower tail point = 4

$P(\text{runs} \leq r : \text{given } m \text{ plus } n)$ = 0.8338

$P(\text{signs} \leq \text{least no. observed})$ = 0.4807

Durbin-Watson test statistic = 0.5067 < 1.5, +ve serial correlation?

Shapiro-Wilks W statistic = 0.7032

Significance level of W = 0.0001 Reject normality

Akaike AIC (Schwarz SC) stats = 1.7727E+02 (1.7994E+02)

En función de estos datos y por desviación del modelo generado obtenemos un flujo intrínseco J de 320,92 $\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ y un coeficiente de permeación K_p de 0,39 cm/h. En esta formulación con extracto liofilizado el porcentaje medio de principio activo cedido tras 8 horas de ensayo es de $100,94 \pm 0,96$ (I.C. 95 %), con respecto a la cantidad dispuesta en el compartimento donador. Se alcanza un estado estacionario claro a partir

de las 6 horas de ensayo, en las que el modelo matemático de ajuste no arroja datos de flujo significativamente distintos a cero.

4.7.4. GEL DE CARBOPOL 980 AL 1,5% A PARTIR DE EXTRACTO LIOFILIZADO

4.7.4.1. Caracterización reológica mediante extensometría

Resultados del análisis de extensibilidad del gel del extracto liofilizado de hojas maduras de *S. ebulus* al 1,5% Carbopol® 980:

Peso (g)	S ₁ (mm ²)	S ₂ (mm ²)	S ₃ (mm ²)	S _{media} ± DS (mm ²)
28	226,87	240,41	226,87	231,37± 7,82
78	551,27	530,66	551,27	544,39± 11,90
128	880,97	854,87	880,97	872,27 ± 15,07
178	1846,52	1808,64	1846,52	1833,90 ± 21,87
228	2001,95	1962,50	2001,95	1988,80 ± 22,77
278	2550,47	2595,41	2550,47	2565,45 ± 25,95
328	2826,00	2779,10	2826,00	2810,37 ± 27,08

Tabla 4.24. Datos experimentales de extensibilidad del gel de extracto liofilizado de hojas maduras de *S. ebulus* al 1,5% Carbopol® 980

Informe del análisis de regresión de los datos extensiométricos y valor calculado del índice de extensibilidad (Ie), utilizando SIMFIT:

PACKAGE : SIMFIT PROGRAM : POLNOM
ACTION : Best fit polynomial for calibration/evaluation
MODEL : Model discrimination statistics up to degree 6
AUTHOR : W. G. Bardsley, University of Manchester, U.K.

Title of current data: **GEL EXTRACTO LIOFILIZADO 1,5% CARBOPOL**

Results for Unweighted fitting (all s = 1)

Parameter	Value	Std. Error	Lower95%cl	Upper95%cl	p
Intercept	-1.43980E+02	7.75118E+01	-3.08297E+02	2.03378E+01	0.0817
Slope	9.69486E+00	4.42378E-01	8.75706E+00	1.06327E+01	0.0000

(R-squared = 0.9678, R = 0.9837, p = 0.0000)

Goodness of fit

Analysis of residuals: SSQ = 4.1097E+05

```

Average % coeff. of variation = 11.97%
R-squared, cc(theory,data)^2 = 0.9678
Largest Abs.rel.res. = 61.24%
Smallest Abs.rel.res. = 0.01%
Average Abs.rel.res. = 18.60%
Abs.rel.res. in range 0.1-0.2 = 33.33%
Abs.rel.res. in range 0.2-0.4 = 16.67%
Abs.rel.res. in range 0.4-0.8 = 16.67%
Abs.rel.res. > 0.8 = 0.00%
No. of negative residuals (m) = 11
No. of positive residuals (n) = 7
No. of runs observed (r) = 6
P(runs =< r : given m and n) = 0.0600
5% lower tail point = 5
1% lower tail point = 4
P(runs =< r : given m plus n) = 0.0717
P(signs =<least no. observed) = 0.4807
Durbin-Watson test statistic = 0.9875 <1.5, +ve serial correlation?
Shapiro-Wilks W statistic = 0.9422
Significance level of W = 0.3162
Akaike AIC (Schwarz SC) stats = 1.8465E+02 ( 1.8643E+02)

```

Values input from terminal

x-input	y-calculated	Lower95%cl	Upper95%cl
2.00000E+02	1.79499E+03	1.70358E+03	1.88640E+03

El extensograma obtenido a partir de los datos extensiométricos medios, se recoge en la siguiente figura.

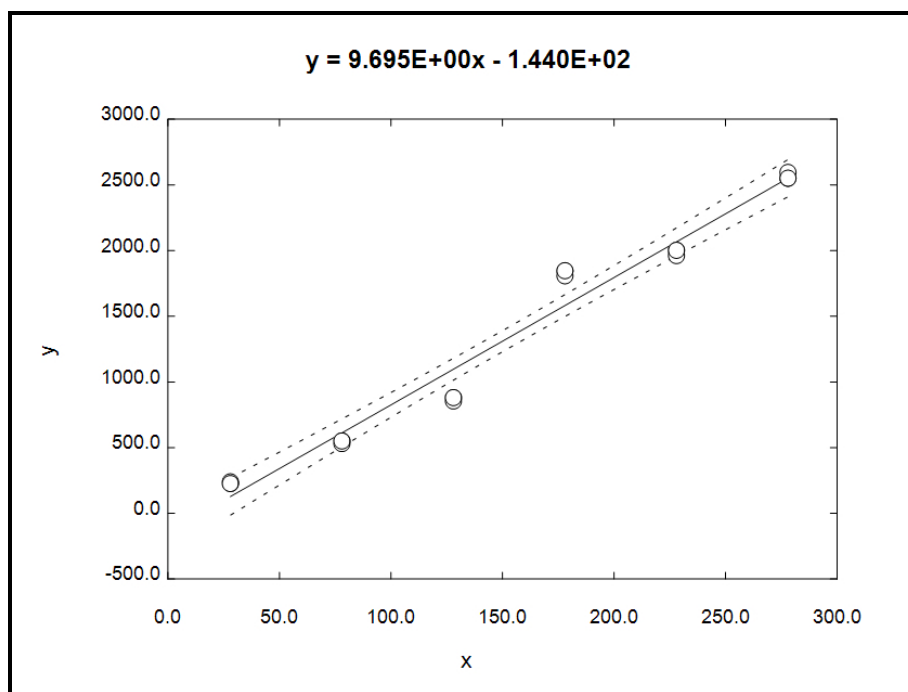


Figura 4.30. Extensograma del gel de extracto liofilizado de hojas maduras de *S. ebulus* al 1,5% Carbopol®980. Datos medios \pm I.C. (95 %).

Según los datos obtenidos mediante el análisis de regresión (SIMFIT), el índice de extensibilidad (Ie) calculado es de $1.795 \pm 91,41 \text{ mm}^2$ (I.C. 95 %).

4.7.4.2. Caracterización reográfica mediante viscosimetría

Velocidad (rpm)	Torsión (%)	Viscosidad (Pa·s)	F. cizalla (D/cm ²)	Vel. cizalla (s ⁻¹)
0,0	0,0	0,000	0,0	0
2,5	7,5	2,803	152,3	5,0
5,0	8,9	1,644	179,8	10,0
7,5	9,8	1,209	196,5	15,0
10,0	10,6	0,982	211,2	20,0
12,5	11,3	0,838	225,0	25,0
10,0	10,6	0,976	211,2	20,0
7,5	9,7	1,192	193,5	15,0
5,0	8,7	1,605	172,9	10,0
2,5	7,3	2,698	146,4	5,0
0,0	2,8	0,000	58,0	0,0

Tabla 4.25. Datos experimentales de viscosidad del gel de extracto liofilizado de hojas maduras de *S. ebulus* al 1,5% Carbopol[®] 980.

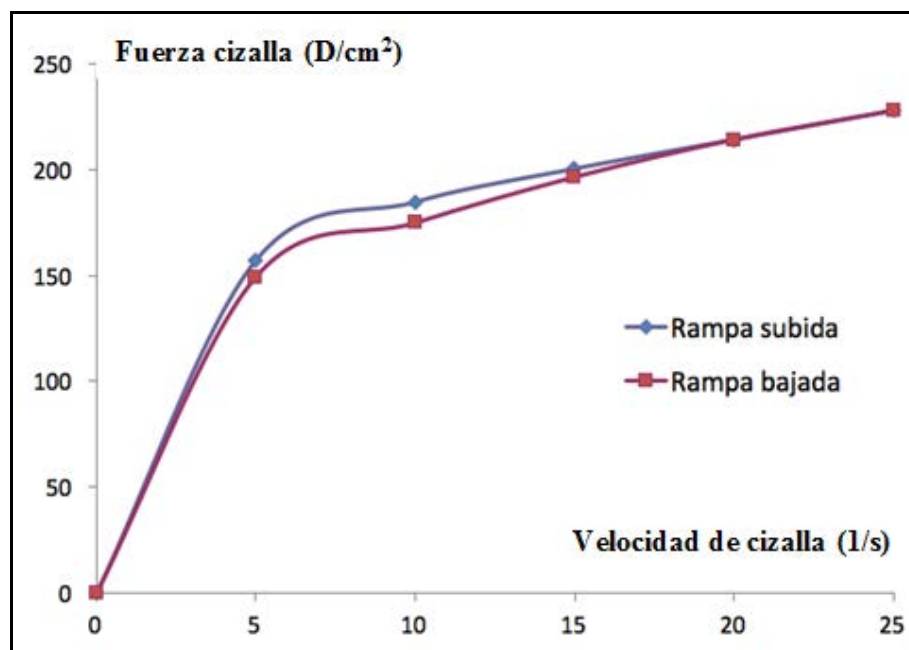


Figura 4.31. Representación gráfica de la fuerza de cizalla frente a la velocidad de cizalla del gel de extracto liofilizado de hojas maduras de *S. ebulus* al 1,5% Carbopol® 980.

A partir de los resultados obtenidos se determinó la tixotropía media ($0,579 \pm 0,442$ Pa-I.C. 95 %), la consistencia media ($93,455 \pm 16,830$ Pa-I.C. 95 %) y el índice de comportamiento de flujo (n) $0,25 (< 1)$. Al igual que en la comparación de los dos geles con extracto acuoso sin liofilizar, se observa un aumento de hasta 4 veces en la viscosidad con el incremento de 1 a 1,5% de gelificante, asociado a una disminución en la extensibilidad del sistema. No obstante, a diferencia de las fórmulas anteriores, si comparamos los dos geles preparados a partir de extracto liofilizado reconstituido, el incremento de polímero no se traduce en una modificación significativa de las propiedades de tixotropía.

4.7.4.3. Estudio de liberación de polifenoles por membrana hidrófila

- Cantidad aplicada de muestra en el compartimento donador: $0,078 \pm 0,025$ mg
- Cantidad difundida: $269,75 \pm 86,07$ μ g EAG.

Tiempo (h)	Celda 1 (%)	Celda 2 (%)	Celda 3 (%)	Media	S _{n-1}
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
1	17,206	19,136	19,658	18,666	1,292
2	48,482	48,111	48,652	48,415	0,276

4	90,281	84,673	80,446	85,133	4,934
6	92,614	95,826	92,463	93,634	1,899
8	97,579	99,328	96,137	97,681	1,598

Tabla. 4.26. Cantidades acumuladas de polifenoles en compartimento receptor expresadas en equivalentes de ácido gálico (EAG) liberadas del gel de extracto liofilizado de hojas maduras de *S. ebulus* al 1,5% Carbopol®980.

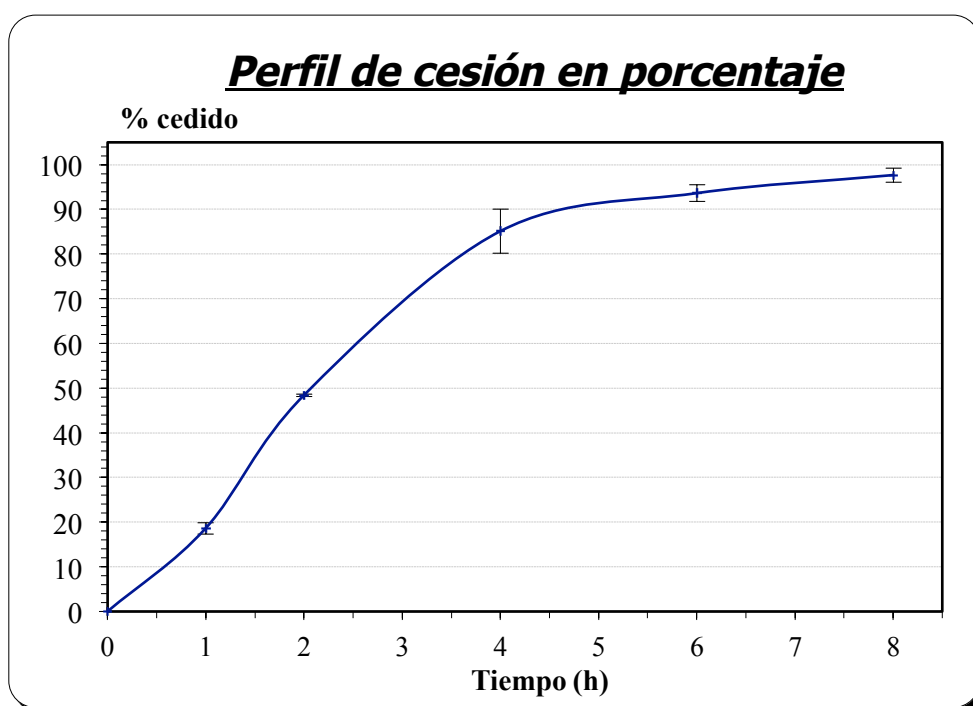


Figura 4.32. Perfil de cesión de polifenoles en compartimento receptor expresadas en porcentaje liberados del gel de extracto liofilizado de hojas maduras de *S. ebulus* al 1,5% Carbopol®980

El análisis de regresión de dichos resultados y el índice de extensibilidad (I_e) calculado serían los siguientes:

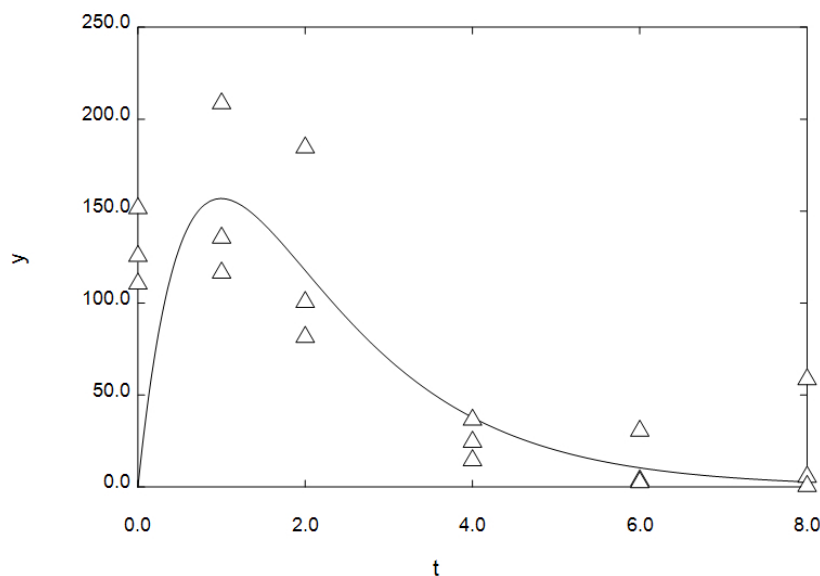


Figura 4.33. Evolución del flujo intrínseco en función del tiempo y del modelo matemático de ajuste del gel de extracto liofilizado de hojas maduras de *S. ebulus* al 1,5% Carbopol®980.

PACKAGE : SIMFIT PROGRAM : EXFIT
 ACTION : Wtd. least squares
 MODEL : Sum of 1 to n exponentials
 AUTHOR : W. G. Bardsley, University of Manchester, U.K.

Model fitted is $A(n-1)\{\exp[-k(n-1)t] - \exp[-k(n)t]\} + \dots + \text{etc.}$

For best-fit 2-exponential function

Parameter	Value	Std.Error	Lower95%cl	Upper95%cl	p
A(1)	5.5565E+02	2.1853E+03	-4.1022E+03	5.2135E+03	0.8027 *
A(2)	-5.5565E+02	(fixed)			
k(1)	6.6097E-01	9.8977E-01	-1.4487E+00	2.7706E+00	0.5144 *
k(2)	1.4524E+00	3.1664E+00	-5.2967E+00	8.2015E+00	0.6530 *
AUC	4.5809E+02				

AUC is the area under the curve from $t = 0$ to $t = \text{infinity}$

Initial time point (A) = 0.0000E+00

Final time point (B) = 8.0000E+00

Area over range (A,B) = 4.5384E+02

Average over range (A,B) = 5.6730E+01

Goodness of fit

Analysis of residuals: SSQ = 6.7368E+04

Average % coeff. of variation = 85.07%

R-squared, $cc(\text{theory}, \text{data})^2$ = 0.3674

Largest Abs.rel.res. = 200.00%

Smallest Abs.rel.res. = 0.44%

Average Abs.rel.res. = 80.32%

Abs.rel.res. in range 0.1-0.2 = 11.11%

Abs.rel.res. in range 0.2-0.4 = 27.78%

Abs.rel.res. in range 0.4-0.8 = 11.11%

Abs.rel.res. > 0.8 = 44.44%

No. of negative residuals (m) = 9

No. of positive residuals (n) = 9

No. of runs observed (r) = 10

```
P(runs =< r : given m and n) = 0.6008
5% lower tail point         =      6
1% lower tail point         =      4
P(runs =< r : given m plus n) = 0.6855
P(signs =< least no. observed) = 1.0000
Durbin-Watson test statistic = 0.5925 <1.5, +ve serial correlation?
Shapiro-Wilks W statistic   = 0.8600
Significance level of W      = 0.0122 Reject normality
Akaike AIC (Schwarz SC) stats = 1.5410E+02 ( 1.5677E+02)
```

En función de estos datos y por desviación del modelo generado obtenemos un flujo intrínseco, J de 156,89 $\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ y un coeficiente de permeación K_p de 0,25 cm/h

4.7.5. ANÁLISIS COMPARATIVO DE RESULTADOS

4.7.5.1. Caracterización reológica

Los resultados mostrados en las Figuras 4.34., 4.35. y 4.36 muestran de manera comparada los resultados de índice de extensibilidad, consistencia y tixotropía de las cuatro formulaciones desarrolladas.

En la figura 4.34. donde se representa el índice de extensibilidad, se puede observar que no influye el hecho de que sea extracto acuoso o liofilizado reconstituido ya que no existe diferencia significativa entre ellos. Además se observa que un incremento del 1 al 1,5% de CBP supone una disminución significativa en este parámetro (alfa: 0,05).

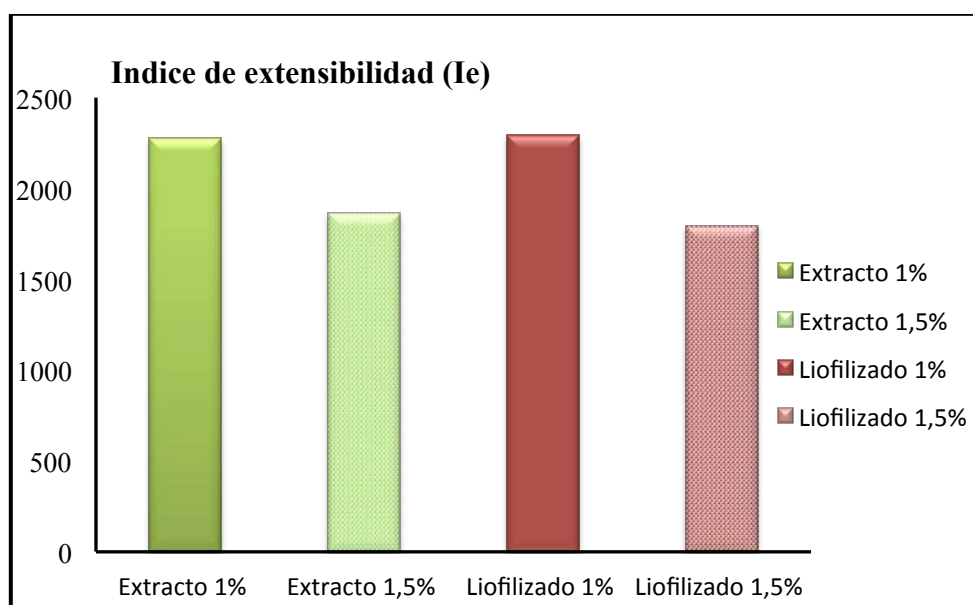


Figura 4.34. Representación gráfica del índice de extensibilidad. Datos medios \pm I.C. (95 %).

En relación a la consistencia (figura 4.35.) tenemos una consistencia muy semejante en el caso del extracto acuoso y liofilizado con el mismo contenido de gelificante, al mismo tiempo que se observa un aumento de 5 veces en la consistencia con un aumento de 0,5% de CBP.

Analizando los resultados de viscosimetría observamos mayor viscosidad en el extracto liofilizado y mayor aumento en su viscosidad al aumentar el contenido de polímero en comparación con el extracto acuoso.

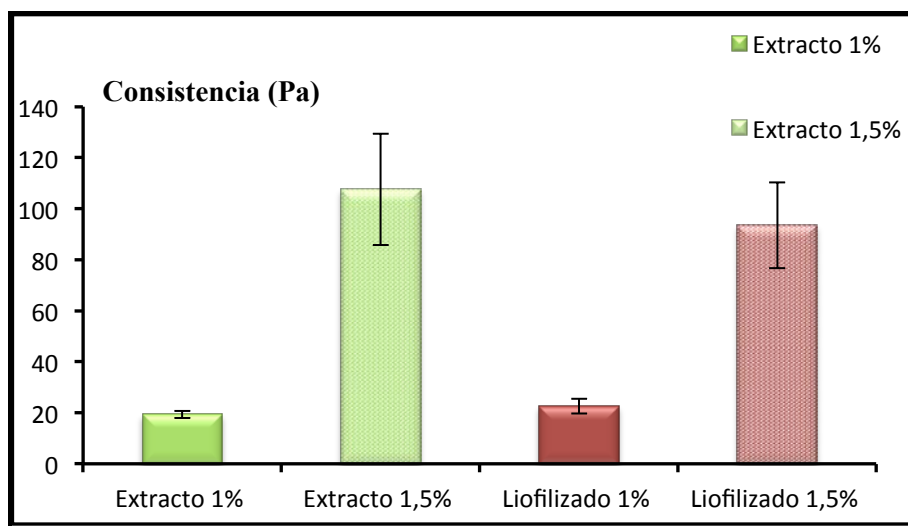


Figura 4.35. Representación gráfica de la consistencia. Datos medios \pm I.C. (95 %).

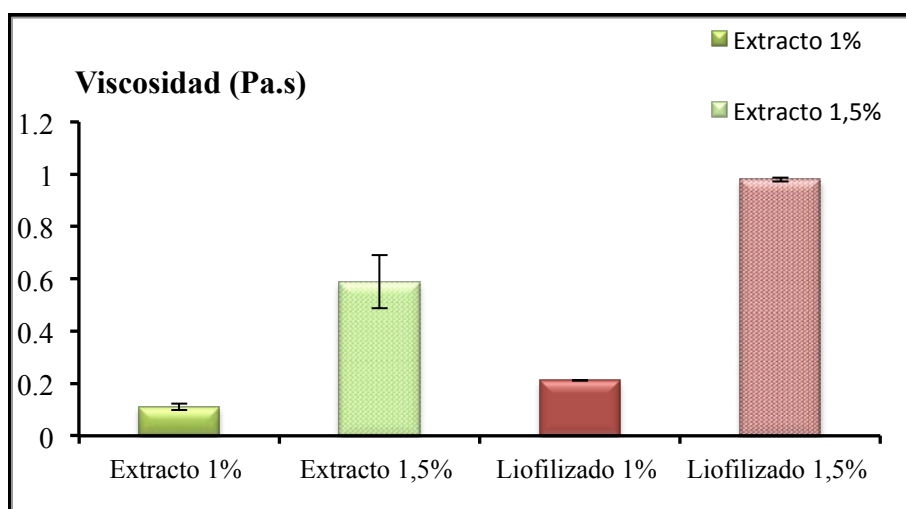


Figura 4.36. Representación gráfica de la viscosidad. Datos medios \pm I.C. (95 %)

El incremento de polímero en sólo un 0,5% se traduce en aumentos significativos de la viscosidad y la consistencia asociados a una marcada disminución en el índice de extensibilidad. No obstante, estas modificaciones cuantitativas de consistencia no suponen una alteración en cuanto al tipo de comportamiento observado en la estructura del gel, obteniéndose siempre un claro comportamiento pseudoplástico con un ligero componente tixotrópico. Estos resultados coinciden con los encontrados por diversos autores con distintos tipos de carbopol y usando distintas concentraciones y composiciones de base acuosa (Bonacucina, G. y cols. 2004, Kelessidis y cols. 2011, Roberts y Barnes, 2001).

4.7.5.2. Estudios de liberación de polifenoles

Los resultados obtenidos de porcentaje medio de cesión de polifenoles a partir de los geles preparados con extracto de hoja madura de *S. ebulus* fueron los siguientes:

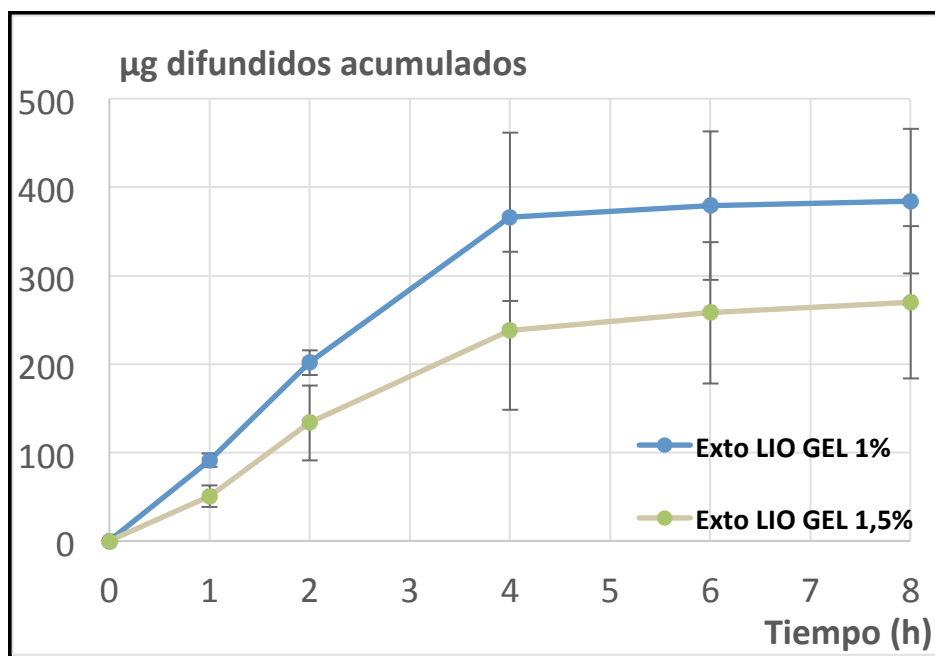


Figura 4.37. Comparativa de los microgramos difundidos acumulados para el extracto liofilizado en gel de Carbopol® 980 al 1,0% y 1,5%.

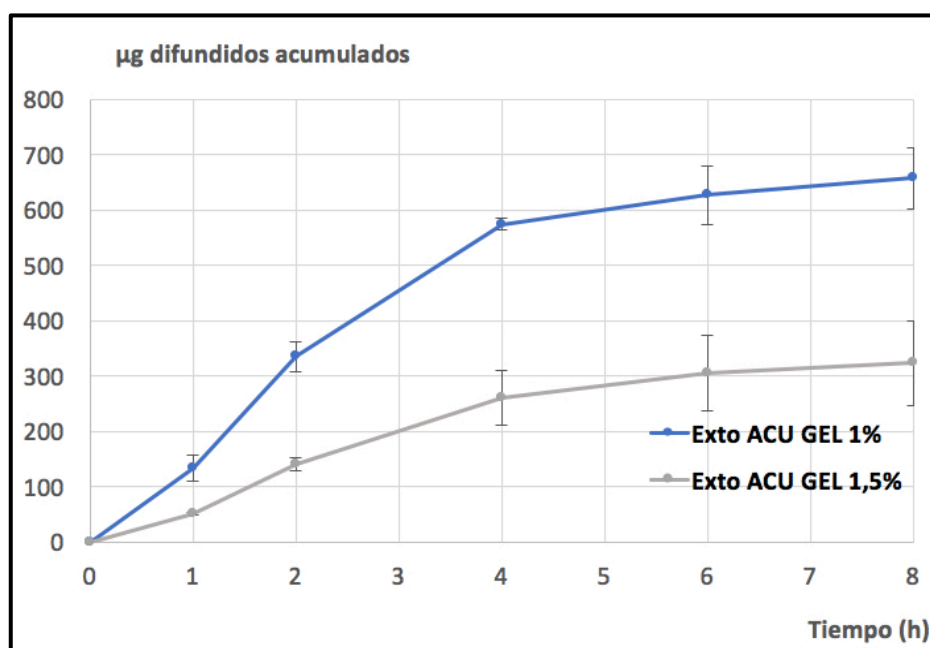


Figura 4.38. Comparativa de los microgramos difundidos acumulados para el extracto crudo en gel de Carbopol® 980 al 1,0% y 1,5%.

Según las dos representaciones gráficas anteriores, podemos observar que un aumento en la proporción de carbómero como gelificante se traduce en una disminución en la velocidad de cesión. No obstante, este efecto es más claro en los geles preparados a partir del extracto acuoso mientras que en los geles preparados a partir de extracto liofilizado reconstituído, las diferencias no son significativas debido a que la variabilidad es mayor. Este hecho puede ser debido a las características del extracto liofilizado y en el retardo que supone en la recuperación de sus características originales durante el proceso de reconstitución y gelificación.

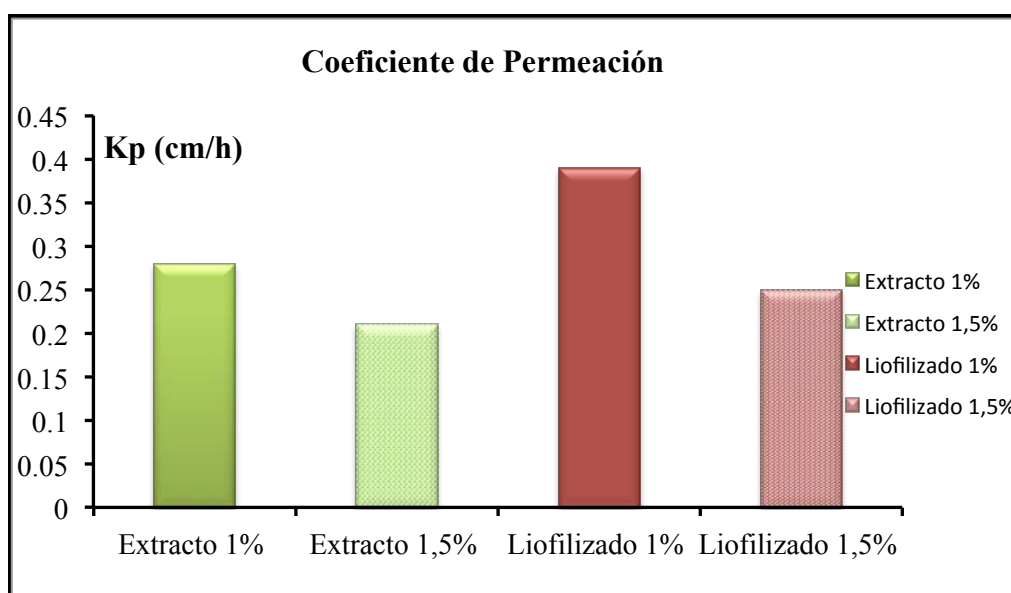


Figura 4.39. Representación gráfica del coeficiente de permeación K_p

En todas las formulaciones se observa una disminución del coeficiente de permeación K_p al aumentar el porcentaje de polímero, lo cual puede relacionarse a que existe un efecto de retención de la estructura gelificada sobre los compuestos fenólicos. Al comparar las velocidades de cesión de los geles de extracto acuoso y liofilizado se observa mayor velocidad en el extracto liofilizado reconstituído, lo que coincide con lo observado en los extractos puros sin gelificante. Estas observaciones complementan a los estudios de Lin y colaboradores (Lin y cols. 2000) con pilocarpina que interacciona con el gelificante por su carácter iónico y con los resultados obtenidos por autores como Tas y OzKan (Tas y cols. 2006) con formulaciones de un Carbopol muy similar sometiendo la estructura a liofilización.

5. CONCLUSIONES

5 CONCLUSIONES

1. La determinación de la riqueza en flavonoides totales en distintas muestras de *S. ebulus* L. muestra que los frutos maduros son los más ricos en este tipo de compuestos. El examen cromatográfico por HPLC pone de manifiesto la presencia de quercetina como principal componente de este tipo.
2. El estudio de la actividad antioxidante in vitro de los extractos obtenidos de los distintos extractos muestra una capacidad antioxidante elevada para las hojas verdes, seguida de frutos maduros y hojas maduras y finalmente, frutos verdes. La capacidad antioxidante observada no está relacionada directamente con el contenido en flavonoides totales de la correspondiente muestra. El estudio de la actividad antirradicalaria in vitro demuestra que las hojas presentan mayor capacidad captadora de radicales libres que los frutos, independientemente de su estado fenológico.
3. Los extractos de frutos maduros de *S. ebulus* L. no afectan a la viabilidad celular en ninguna de las concentraciones ensayadas. Por su parte, los extractos de hojas maduras ejercen una toxicidad concentración dependiente. Así a la máxima concentración evaluada, el extracto ejerce una toxicidad comparable al control negativo, el Tritón X-100.
4. Los frutos maduros ejercen en cultivos celulares, un efecto protector moderado frente al agente inductor de radicales libres, peróxido de hidrógeno. Dado que las hojas maduras ejercen un mayor efecto protector y teniendo en cuenta el resto de propiedades evaluadas, se selecciona dicho extracto como el más indicado para su formulación posterior.
5. Los compuestos fenólicos de extracto de hoja madura difunden en las condiciones ensayadas en un porcentaje muy superior a través de la membrana hidrófila en comparación con la membrana lipófila. La baja difusión al medio receptor de compuestos fenólicos a través de la membrana lipófila (< 2%), es un resultado prometedor en el diseño de formulaciones de acción tópica, al reducirse el

aclareamiento sistémico y acumularse los componentes activos en tejido diana. No obstante, este efecto debe ser corroborado en estudios *ex vivo*.

6. Comparando las propiedades de los geles elaborados a partir de extracto crudo de hoja madura con cantidades crecientes de polímero gelificante, se observa un marcado incremento de la viscosidad y una disminución significativa del índice de extensibilidad. En ambos casos se observa un comportamiento pseudoplástico con índices de comportamiento de flujo inferiores a 1, y un ligero grado de tixotropía, indicando una ruptura parcial reversible según el modelo de Ostwald-de Waele. Estos efectos se observan igualmente en los geles obtenidos a partir de extracto liofilizado.
7. Aumentos de consistencia de unas cinco veces provocados por un incremento en la proporción de gelificante, no suponen un efecto significativo de retención de los principios activos antioxidantes estudiados en la estructura del gel, con coeficientes de permeación ligeramente más bajos con la fórmula con mayor proporción de carbómero cuando se evalúan formulaciones con extracto crudo. Sin embargo, en formulaciones elaboradas con extracto liofilizado reconstituido, la velocidad de cesión disminuye drásticamente. Este hecho puede ser debido a las características del extracto liofilizado y en el retardo que supone en la recuperación de sus características originales durante el proceso de reconstitución y gelificación.
8. A partir de los estudios realizados, se ha optimizado una formulación en gel de uso tópico con prometedoras aplicaciones antioxidantes, con unas características farmacotécnicas adecuadas en cuanto a sus propiedades reológicas y de cesión de compuestos de acción antirradicalaria, a partir de un extracto vegetal de hojas maduras de *Sambucus ebulus* L.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abraham, N. G., Kappas, A. (2008). Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacological Reviews*, 60 (1), 79-127.
- Acosta, N., Jimenez, C., Borau, V., Heras, A. (1993). Extraction and characterization of chitin from crustaceans. *Biomass and Bioenergy*, 5(2), 145-153.
- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121-126.
- Afaq, F., Mukhtar, H. (2006). Botanical antioxidants in the prevention of photocarcinogenesis and photoaging. *Experimental Dermatology*, 15(9), 678-684.
- Agnihotri, S. A., Mallikarjuna, N. N., Aminabhavi, T. M. (2004). Recent advances on chitosan-based micro-and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 100(1), 5-28.
- Agulló, E., Mato, R., Tapia, C., Heras, A., San Román, J., Argüelles, W., Pastor, A. (2004). Quitina y Quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones. *Fondo editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú*, 157-169.
- Ahmadiani, A., Fereidoni, M., Semnianian, S., Kamalinejad, M., Saremi, S. (1998). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Sambucus ebulus rhizome extract in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 61(3), 229-235.
- Allemann, I. B., Baumann, L. (2008). Antioxidants used in skin care formulations. *Skin Therapy Letters*, 13(7), 5-9.
- Alvarez, Fontanet., E. (1995). Consecuencias del estrés oxidativo de la piel por radiaciones ultravioleta. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 14(1), 22-26.
- Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Ozyürek, M., Celik, S.E., Bektaşoglu, B., Berker, K.I., Ozyurt, D. (2007). Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, 12(7), 1496-1547.
- Aranaz, I., Mengíbar, M., Harris, R., Paños, I., Miralles, B., Acosta, N., Heras, Á. (2009). Functional characterization of chitin and chitosan. *Current Chemical Biology*, 3(2), 203-230.

- Aruoma, O. I. (2003). Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 523, 9-20.
- Babaei, E., Asghari, M. H., Mehdikhani, F., Moloudizargari, M., Ghobadi, E., Pouya, S. R. H. (2017). The healing effects of herbal preparations from *Sambucus ebulus* and *Urtica dioica* in full-thickness wound models. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(7), 421-427.
- Bains, J.S., Shaw, C.A. (1997). Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress mediated neuronal death. *Brain Research Reviews*, 25, 335–358.
- Ballester, M., & Honorem, V. A. (1996). Antioxidantes, radicales libres y salud: un enfoque químico-orgánico-físico. *Medicina Clínica*, 107(13), 509-515.
- Barañano, D. E., Rao, M., Ferris, C. D., & Snyder, S. H. (2002). Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(25), 16093-16098.
- Bardsley, W.G. The Simfit Reference Manual b. Disponible en: <http://www.simfit.man.ac.uk>.
- Baroni, A., Buommino, E., De Gregorio, V., Ruocco, E., Ruocco, V., Wolf, R. (2012). Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clinics in Dermatology*, 30(3), 257-262.
- Barry, B.W. (2001). Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14(2), 101-114.
- Basterrechea, J.E. (2013). Capacidad antioxidante y antirradicalaria, y nuevas lectinas SELblo y ebulina blo presentes en las inflorescencias del saúco enano (*Sambucus ebulus L*). *Tesis doctoral*. Universidad de Valladolid.
- Battelli, M. G., Citores, L., Buonamici, L., Ferreras, J. M., De Benito, F. M., Stirpe, F., Girbés, T. (1997). Toxicity and cytotoxicity of nigrin b, a two-chain ribosome-inactivating protein from *Sambucus nigra*: comparison with ricin. *Archives of Toxicology*, 71(6), 360-364.

- Battelli, M. G., Polito, L., Falà, F., Musiani, S., Tazzari, P. L., Stirpe, F., Bolognesi, A. (2004). Toxicity of xanthine oxidoreductase to malignant B-lymphocytes. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, 19(3-4), 120-129.
- Beckman, K. B., Ames, B. N. (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews*, 78(2), 547-581.
- Beladi-Mousavi, S. S., Hajibabaei, K., Tamadon, M. R., Rafieian-Kopaei, M. (2016). Relationship between free radicals and risk of kidney diseases; the role of antioxidants and their reaction mechanisms. *Annals of Research in Antioxidants*, 1(1), 102-109.
- Belonogov, R. N., Titova, N. M., Lapeshin, P. V., Ivanova, Y. R., Shevtsova, A. O., & Pokrovskii, A. A. (2009). Changes in the content of protein and lipid oxidative modification products in tumor tissue at different stages of lung cancer. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 147(5), 630-631.
- Benítez, J., Ferreras, J.M., Muñoz, R., Arias, Y., Iglesias, R., Córdoba-Díaz, M., del Villar, R., Gorbés, T. (2005). Cytotoxicity of an ebulin 1-anti-human CD105 immunotoxin on mouse fibroblasts (L929) and rat myoblasts (L6E9) cells expressing human CD105. *Medicinal Chemistry*, 1(1), 65-71
- Bennett, A. L., Ventura, H. O. (2017). Hypertension in Patients with Cardiac Transplantation. *Medical Clinics of North America*, 101(1), 53-64.
- Biesalski, H. K., Hemmes, C., Hopfenmuller, W., Schmid, C., & Gollnick, H. P. (1996). Effects of controlled exposure of sunlight on plasma and skin levels of β -carotene. *Free Radical Research*, 24(3), 215-224.
- Bodmeier, R., Oh, K. H., Pramar, Y. (1989). Preparation and evaluation of drug-containing chitosan beads. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 15(9), 1475-1494.
- Bonacucina, G., Martelli, S., Palmieri, G. F. (2004). Rheological, mucoadhesive and release properties of Carbopol gels in hydrophilic cosolvents. *International Journal of Pharmaceutics*, 282(1), 115-130.
- Bonita, J. S., Mandarano, M., Shuta, D., Vinson, J. (2007). Coffee and cardiovascular disease: in vitro, cellular, animal, and human studies. *Pharmacological Research*, 55(3), 187-198.

- Bouayed, J., Rammal, H., Dicko, A., Younos, C., & Soulimani, R. (2007). Chlorogenic acid, a polyphenol from *Prunus domestica* (Mirabelle), with coupled anxiolytic and antioxidant effects. *Journal of the Neurological Sciences*, 262(1), 77-84.
- Bouwstra, J.A., Honeywell-Nguyen, P.L., Gooris, G.S., Ponc, M. (2003). Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. *Progress in Lipid Research* 42(1), 1- 36.
- Brain, K. R., Walters, K. A., Watkinson, A. C. (1998). Investigation of skin permeation in vitro. *Drugs and the Pharmaceutical Sciences*, 91, 161-187.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Bronaugh, R. L., Stewart, R. F. (1985). Methods for in vitro percutaneous absorption studies IV: The flow-through diffusion cell. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 74(1), 64-67.
- Bronaugh, R., L. (1989). Determination of percutaneous absorption by in vitro techniques. En: Bronaugh, R.L., Maibach, H.I., editors. *Percutaneous Absorption, Mechanisms- Methodology, Drug delivery*, 8(1), 239-258.
- Bryan, N. S., Lancaster Jr, J. R. (2017). Nitric Oxide Signaling in Health and Disease. En: *Nitrite and Nitrate in Human Health and Disease*, 165-178.
- Bubulica, M. V., Chirigiu, L., Popescu, M., Simionescu, A., Anoaica, G., Popescu, A. (2012). Analysis of sterol compounds from *Sambucus ebulus*. *Chemistry of Natural Compounds*, 1-2.
- Buenestado, C., Suñé, J.M. (1973a). Extensibilidad y Granulometría de Pomadas-Suspensión. 3. Extensibilidad. *Galén Acta*, 26-43.
- Buenestado, C., Suñé, J.M. (1973b). Extensibilidad y Granulometría de Pomadas-Suspensión. 3. Extensibilidad. *Galén Acta*, 26-67.
- Buenestado, C., Suñé, J.M. (1972). Extensibilidad y Granulometría de Pomadas-Suspensión. 3. Extensibilidad: Resultados Experimentales. *Galén Acta*, 25, 193-214.

- Burke, K. E., Pinnell, D. M. (2015). Topical Vitamins E, C, and Ferulic Acid and Topical L-Selenomethionine. In *Cosmeceuticals and Active Cosmetics*, 197-314. Third Edition.
- Burton, G. W., Ingold, K. U., Cheeseman, K. H., Slater, T. F. (1990). Application of Deuterated A-Tocopherols to the Biokinetics and Bioavailability of Vitamin E. *Free Radical Research Communications*, 11(1-3), 99-107.
- Calderón, L., Harris, R., Cordoba-Diaz, M., Elorza, M., Elorza, B., Lenoir, J., Adriaens, E., Remon, J.P., Heras, A., Cordoba-Diaz, D. (2013). Nano and microparticulate chitosan-based systems for antiviral topical delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 48(1), 216-222.
- Cao, G., Alessio, H. M., Cutler, R. G. (1993). Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 14(3), 303-311.
- Carnevali, S., Petruzzelli, S., Longoni, B., Vanacore, R., Barale, R., Cipollini, M., Scatena, F., Paggiaro, P., Celi, A., Giuntini, C. (2003). Cigarette smoke extract induces oxidative stress and apoptosis in human lung fibroblasts. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 284(6), 955-963.
- Carocho, M., and Ferreira, I.C. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15-25.
- Ceriello, A., Motz, E. (2004). Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24(5), 816-823.
- Chakravarti, B., Maurya, R., Siddiqui, J. A., Bid, H. K., Rajendran, S. M., Yadav, P. P., Konwar, R. (2012). In vitro anti-breast cancer activity of ethanolic extract of *Wrightia tomentosa*: role of pro-apoptotic effects of oleanolic acid and urosolic acid. *Journal of Ethnopharmacology*, 142(1), 72-79.
- Chance, B., Sies, H., & Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews*, 59(3), 527-605.

- Chawla, A., Taylor, K. M. G., Newton, J. M., & Johnson, M. C. R. (1994). Production of spray dried salbutamol sulphate for use in dry powder aerosol formulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 108(3), 233-240
- Chen, L., Hu, J. Y., Wang, S. Q. (2012). The role of antioxidants in photoprotection: a critical review. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 67(5), 1013-1024.
- Cheng, Y., Zak, O., Aisen, P., Harrison, S. C., & Walz, T. (2004). Structure of the human transferrin receptor-transferrin complex. *Cell*, 116(4), 565-576.
- Citores, L., Ferreras, J. M., Muñoz, R., Benítez, J., Jiménez, P., & Girbés, T. (2002). Targeting cancer cells with transferrin conjugates containing the non-toxic type 2 ribosome-inactivating proteins nigrin b or ebulin l. *Cancer letters*, 184(1), 29-35.
- Citores, L., Munoz, R., De Benito, F. M., Iglesias, R., Ferreras, J. M., & Girbes, T. (1996). Differential sensitivity of HELA cells to the type 2 ribosome-inactivating proteins ebulin l, nigrin b and nigrin f as compared with ricin. *Celular and Molecular Biology (Noisy-le-Grand, France)*, 42(4), 473-476.
- Clark, J. F., & Sharp, F. R. (2006). Bilirubin oxidation products (BOXes) and their role in cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 26(10), 1223-1233.
- Coceani, N., Colombo, I., & Grassi, M. (2003). Acyclovir permeation through rat skin: mathematical modeling and in vitro experiments. *International Journal of Pharmaceutics*, 254(2), 197-210.
- Contreras, G. O., Mier, G. M., Zúñiga, A., Ceccatelli, A. P. (2004). Antioxidantes y aterosclerosis. *Revista de Endocrinología y Nutrición*, 12(4), 199-206.
- Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M., Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal*, 17(10), 1195-1214.
- Córdoba-Díaz, M., Nova, M., Elorza, B., Córdoba-Díaz, D., Chantres, J. R., Córdoba-Borrego, M. (2000). Validation protocol of automated in-line flow-through diffusion equipment for in vitro permeation studies. *Journal of Controlled Release*, 69(3), 357-367.

- Corrado, P.D., Bovi, R., Ciliento, L., Gaudio, A., Di Maro, S., Aceto, M., Lorito, R., Rao. (2005). Inducible expression of a *Phytolacca heterotepala* ribosome-inactivating protein leads to enhanced resistance against major fungal pathogens in tobacco. *Phytopathology*. 95 (2), 206–215.
- Cross, C.E., Halliwell, B., Borish, E.T., Pryor, W.A., Ames, B.N., Saul, R.L., McCord, J.M., Harman, D. (1987). Oxygen radicals and human disease. *Annals of Internal Medicine*, 107(4), 526-545.
- Csányi, G., Miller, J. F. J. (2014). Oxidative Stress in Cardiovascular Disease. 6002-6008.
- Dabrowska, C.C., Mir, M.S.M. (2009). Vitaminas y antioxidantes. *Madrid: Sanidad y Ediciones*, 2-34.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., Milzani, A. (2006). Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical Chemistry*, 52(4), 601-623.
- Daniels, T.R., Bernabeu, E., Rodríguez, J.A., Patel, S., Kozman, M., Chiappetta, D.A., Holler, E., Ljubimova, J.Y, Helguera, G., Penichet, M.L. (2012). The transferrin receptor and the targeted delivery of therapeutic agents against cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1820(3), 291-317.
- Dávalos, A., Gómez-Cordovés, C., Bartolomé, B. (2004). Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC– fluorescein) assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(1), 48-54.
- De Benito, F. M., Citores, L., Iglesias, R., Ferreras, J. M., Soriano, F., Arias, J., Mendez, E., Girbés, T. (1995). Ebulitins: a new family of type 1 ribosome-inactivating proteins (rRNA N-glycosidases) from leaves of *Sambucus ebulus* L. that coexist with the type 2 ribosome-inactivating protein ebulin 1. *FEBS letters*, 360(3), 299-302.
- De Benito, F.M., Citores, L., Iglesias, R., Ferreras, J.M., Soriano, F. (1995). Ebulitins: A new family of type 1 ribosome-inactivating proteins (rRNAN-glycosidases) from leaves of *Sambucus ebulus* L. that coexist with the type 2 ribosome-inactivating protein ebulin 1. *FEBS Lett.* 360(3), 299-302.
- Deshane, J., Wright, M., & Agarwal, A. (2005). Heme oxygenase-1 expression in disease states. *Acta Biochimica Polonica*, 52(2), 273-284.

- Deshpande, N. N., Sorescu, D., Seshiah, P., Ushio-Fukai, M., Akers, M., Yin, Q., Griendling, K. K. (2002). Mechanism of hydrogen peroxide-induced cell cycle arrest in vascular smooth muscle. *Antioxidants and Redox Signaling*, 4(5), 845-854.
- Deshpande, N.N., Sorescu, D., Seshiah, P., Ushio-Fukai, M., Akers, M., Yin, Q., Griendling, K.K. (2002). Mechanism of hydrogen peroxide-induced cell cycle arrest in vascular smooth muscle. *Antioxid Redox Signal*. 4:845-854.
- Devasagayam, T. P. A., Tilak, J. C., Bloor, K. K., Sane, K. S., Ghaskadbi, S. S., Lele, R. D. (2004). Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *Journal of The Association of Physicians of India*, 52(10), 794-804.
- Dhawan, S., Singla, A. K., Sinha, V. R. (2004). Evaluation of mucoadhesive properties of chitosan microspheres prepared by different methods. *American association of pharmaceutical scientists Pharmscitech*, 5(4), 122-128.
- Dimitrios, B. (2006). Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends in Food Science Technology*. 17(9), 505-512.
- Ding, M., Feng, R., Wang, S.Y., Bowman, L., Lu, Y., Qian, Y., Castranova, V., Jiang, B.H., Shi, X. (2006). Cyanidin-3-glucoside, a natural product derived from blackberry, exhibits chemopreventive and chemotherapeutic activity. *Journal of Biological Chemistry*, 281(25). 17359- 17368.
- Dumont, M., Beal, M. F. (2011). Neuroprotective strategies involving ROS in Alzheimer disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(5), 1014-1026.
- Durrheim, H., Flynn, G. L., Higuchi, W. I., Behl, C. R. (1980). Permeation of hairless mouse skin I: Experimental methods and comparison with human epidermal permeation by alkanols. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 69(7), 781-786
- Dyer, A. M., Hinchcliffe, M., Watts, P., Castile, J., Jabbal-Gill, I., Nankervis, R., Smith, A., Illum, L. (2002). Nasal delivery of insulin using novel chitosan based formulations: a comparative study in two animal models between simple chitosan formulations and chitosan nanoparticles. *Pharmaceutical Research*. 19(7), 998-1008.
- Ebrahimzadeh, M. A., Enayatifard, R., Khalili, M., Ghaffarloo, M., Saeedi, M., Yazdani Charati, J. (2014). Correlation between sun protection factor and antioxidant

- activity, phenol and flavonoid contents of some medicinal plants. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 13(3), 1041-1047.
- Ebrahimzadeh, M. A., Rafati, M. R., Damchi, M., Golpur, M., Fathiazad, F. (2014). Treatment of paederus dermatitis with Sambucus ebulus Lotion. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 13(3), 1065-1071.
 - Ebrahimzadeh, M.A., Mahmoudi, M., Karami, M., Saeedi, S., Ahmadi, A.H., Salimi, E. (2007). Separation of active and toxic portions in *Sambucus ebulus*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(22), 4171-4173.
 - Ebrahimzadeh, M.A., Mahmoudi, M., Salimi, E. (2006). Antiinflammatory activity of Sambucus ebulus hexane extracts. *Fitoterapia*, 77(2), 146-148.
 - Ebrahimzadeh, M.A., Nabavi, S.F., Nabavi, S.M. (2009). Antioxidant activities of methanol extract of *Sambucus ebulus* L. flower. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 12(5), 447-450.
 - El Maghraby, G.M., Barry, B.W. Williams, A.C. (2008). Liposomes and skin: from drug delivery to model membranes. *European Journal of Pharmaceuticals Sciences* 34, 203-222.
 - Elbirt, K. K., Bonkovsky, H. L. (1998). Heme oxygenase: recent advances in understanding its regulation and role. *Proceedings of the Association of American Physicians*, 111(5), 438-447.
 - Elias, J.J. (1989). The microscopic structure of the epidermis and its derivatives, En: Bronaugh, R.L., Maibach, H.I. (Eds), *Percutaneous Absorption, Mechanisms-Methodology- Drug Delivery*, 3- 12.
 - Epstein, H. (2009). Cosmeceuticals and polyphenols. *Clinics in dermatology*. 27(5), 475-478.
 - Fang, Y. Z., Yang, S., Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18(10), 872-879.
 - Fang, Y.Z., Yang, S., Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition*, 18, 872-879.

- Faria, A., Monteiro, R., Mateus, N., Azevedo, I., Calhau, C. (2007). Effect of pomegranate (*Punica granatum*) juice intake on hepatic oxidative stress. *European Journal of Nutrition*, 46(5), 271-278.
- Farmacopea Europea. Consejo de Europa, 9ªEd.2017.
- Farombi, E. O., Surh, Y. (2006). Heme oxygenase-1 as a potential therapeutic target for hepatoprotection. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 39(5), 479.
- Fattman, C. L., Schaefer, L. M., Oury, T. D. (2003). Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radical Biology and Medicine*, 35(3), 236-256.
- Fawcett, D.W., Bloom, J.R. (2002). Fawcett's concise histology. H. Arnold.
- Fenton, H. J. (1894). Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 65, 899-910.
- Ferreras, J.M., Citores, L., Iglesias, R., Jiménez, P., Girbés, T. (2011). Use of ribosome-inactivating proteins from *Sambucus* for the construction of immunotoxins and conjugates for cancer therapy. *Toxins*, 3(5), 420-441.
- Floyd, R.A., Hensley, K. (2002). Oxidative stress in brain aging: implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. *Neurobiology of aging*, 23(5), 795-807.
- Folkman, J. (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature medicine*, 1(1), 27-30.
- Folkman, J. (1996). Terapias del futuro: Cáncer y suministro sanguíneo. *Investigación y ciencia*, (242), 101-104.
- Font-Quer, P. (1999). *Plantas Medicinales: El Dioscorides Renovado*. Península, Barcelona.
- Foresti, R., Motterlini, R. (1999). The heme oxygenase pathway and its interaction with nitric oxide in the control of cellular homeostasis. *Free Radical Research*, 31(6), 459-475.
- Formulario Nacional PN/L/CP/003/00.
- Franz, T. J. (1975). Percutaneous absorption. On the relevance of in vitro data. *Journal of Investigative Dermatology*, 64(3), 190-195.

- Frei, B. (1994). Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *The American Journal of Medicine*, 97(3), 5-13.
- Fu, F. J., Mi, F. L., Wong, T. B., Shyu, S.S. (2001). Characteristic and controlled release of anticancer drug loaded poly (D, L-lactide) microparticles prepared by spray drying technique. *Journal of Microencapsulation*, 18(6), 733-747.
- Fujita, M., Tsuruta, R., Kasaoka, S., Fujimoto, K., Tanaka, R., Oda, Y., Nanba, M., Igarashi, M., Yuasa, M., Maekawa, T. (2009). In vivo real-time measurement of superoxide anion radical with a novel electrochemical sensor. *Free Radical Biology and Medicine*, 47(7), 1039-1048.
- Fukai, T., Folz, R. J., Landmesser, U., Harrison, D. G. (2002). Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease. *Cardiovascular research*, 55(2), 239-249.
- Galcerán, J. G., Amenós, A. M. (2000). Fenómenos oxidativos en la fisiopatología vascular. *Hipertensión y Riesgo Vascular*, 17(1), 17-21.
- Gandhi, S, Abramov, A.Y. (2012). Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 428010.
- Gavini, E., Hegge, A. B., Rassa, G., Sanna, V., Testa, C., Pirisino, G., Karlesen, J., Giunchedi, P. (2006). Nasal administration of carbamazepine using chitosan microspheres: in vitro/in vivo studies. *International journal of pharmaceutics*, 307(1), 9-15.
- Gavini, E., Rassa, G., Muzzarelli, C., Cossu, M., Giunchedi, P. (2008). Spray-dried microspheres based on methylpyrrolidinone chitosan as new carrier for nasal administration of metoclopramide. *European journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 68(2), 245-252.
- Genchi, G., Sinicropi, M. S., Carocci, A., Lauria, G., Catalano, A. (2017). Mercury Exposure and Heart Diseases. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(1), 74.
- Georgé, S., Brat, P., Alter, P., Amiot, M. J. (2005). Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5), 1370-1373.

- Ghannadi, A.R., Ghassemi-Dehkordi, N. (1997). Pharmacognostical Investigations on *Sambucus ebulus L.* and *Sambucus nigra L.* *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 7(1), 55-65.
- Gholami, S. H., Rahimi-Esboei, B., Ebrahimzadeh, M. A., Pourhajibagher, M. (2013). In vitro effect of *Sambucus ebulus* on scolices of Hydatid cysts. *European review for medical and pharmacological sciences*, 17(13), 1760-1765.
- Ghosh, N., Ghosh, R., Mandal, S. C. (2011). Antioxidant protection: a promising therapeutic intervention in neurodegenerative disease. *Free radical research*, 45(8), 888-905.
- Gilgun-Sherki, Y., Melamed, E., Offen, D. (2001). Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology*, 40(8), 959-975.
- Girbés T. (2009). Mecanismos de acción de las lectinas antinutrientes con actividad antirribosómica ricina, volkensina, nigrina y ebulina y aplicaciones terapéuticas de nigrina y ebulina. *Tesis doctoral*. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.
- Girbés, T., Jiménez, P. (2010). *Cuaderno de Prácticas de Fundamentos de Alimentación y Nutrición*. Facultad de Medicina. Universidad de Valladolid.
- Girbés, T., Citores, L., Ferreras, J.M., Rojo, M.A., Iglesias, R., Muñoz, R., Arias, F.J., Calonge, M., García, J.R., Méndez, E. (1993a) Isolation and partial characterization of nigrin b, a non-toxic novel type 2 ribosome-inactivating protein from the bark of *Sambucus nigra L.* *Plant molecular biology*, 22(6), 1181-1186.
- Girbes, T., Citores, L., Iglesias, R., Ferreras, J. M., Munoz, R., Rojo, M. A., Arias, F.J., García, J.R., Méndez, E., Calonge, M. (1993). Ebulin 1, a nontoxic novel type 2 ribosome-inactivating protein from *Sambucus ebulus L.* leaves. *Journal of Biological Chemistry*, 268(24), 18195-18199.
- Girbes, T., de Torre, C., Iglesias, R., Ferreras, J. M., Mendez, E. (1996). RIP for viruses. *Nature*, 379(6568), 777.

- Girbés, T., Ferreras, J. M., Arias, F. J., Stirpe, F. (2004). Description, distribution, activity and phylogenetic relationship of ribosome-inactivating proteins in plants, fungi and bacteria. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 4(5), 461-476.
- Giunchedi, P., Genta, I., Conti, B., Muzzarelli, R.A. A., Conte, U. (1998). Preparation and characterization of ampicillin loaded methylpyrrolidinone chitosan and chitosan microspheres. *Biomaterials*, 19(1), 157-161.
- Giunchedi, P., Juliano, C., Gavini, E., Cossu, M., Sorrenti, M. (2002). Formulation and in vivo evaluation of chlorhexidine buccal tablets prepared using drug-loaded chitosan microspheres. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 53(2), 233-239.
- González-Mangado, N., J. Morera Prat. (2001). Oxidación celular y fármacos mucoactivos antioxidantes. *Archivos de Bronconeumología*, 37(10), 407-409.
- Grimm, S., Hoehn, A., Davies, K. J., Grune, T. (2011). Protein oxidative modifications in the ageing brain: consequence for the onset of neurodegenerative disease. *Free radical research*, 45(1), 73-88.
- Guarrera, P. M. (1999). Traditional antihelmintic, antiparasitic and repellent uses of plants in Central Italy. *Journal of ethnopharmacology*, 68(1), 183-192.
- Guerra, J. E. (2001). Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *Anales de Medicina Interna*, 18(6), 326-335.
- Gutiérrez, R. (2011). Estudios de difusión a través de piel de formulaciones liposómicas de aciclovir. *Tesis doctoral*, Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.
- Gutteridge, J. M., Halliwell, B. (1989). Iron toxicity and oxygen radicals. *Bailliere's Clinical Haematology*, 2(2), 195-256.
- Guy, R., H., Hadgraft, J. (1999). Mathematical models of percutaneous absorption, En: Bronaugh, R.L., Msibach, H. I, editors. *Percutaneous Absorption, Drugs Cosmetics Mechanisms Methodology*, 229-233.
- Haber, F., Weiss J. (1934). The catalytic compensation of hydrogen peroxide by iron salts. *Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 147(861), 332-351.

- Hadgraft, J. (2001). Skin, the final frontier. *International Journal of Pharmaceutics*, 224(1), 1-18.
- Halliwell B. (1991). Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *The American journal of medicine*, 91(3), 14-22.
- Halliwell B. (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system. *Journal of neurochemistry*, 59(5), 1609-1623.
- Halliwell B. (1997). Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutrition reviews*, 55(1), 44-49.
- Halliwell B. (2001). Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs & Aging*, 18(9), 685-716.
- Halliwell B. (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of Neurochemistry*, 97(6), 1634-1658.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 186, 1-85.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M. (1997). Lipid peroxidation in brain homogenates: the role of iron and hydroxyl radicals. *Journal of neurochemistry*, 69:1330-1331.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M. (1999). Free radicals in biology and medicine. 3^o ed. Oxford, UK: *Oxford University Press*.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M. (2007). Free radicals in biology and medicine. Oxford; New York, *Oxford University Press*.
- Halliwell, B., Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British journal of pharmacology*, 142(2), 231-255.
- Hanahan, D., Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 86(3), 353-64.
- Harrison, D. J., Knutson, K. (1995). Accurate determination of skin flux from flow-through diffusion cell data. *Pharmaceutical research*, 12(12), 2003-2011.

- He, P., Davis, S. S., Illum, L. (1999). Chitosan microspheres prepared by spray drying. *International journal of pharmaceutics*, 187(1), 53-65.
- Helander, I. M., Nurmiäho-Lassila, E. L., Ahvenainen, R., Rhoades, J., Roller, S. (2001). Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *International journal of food microbiology*, 71(2), 235-244.
- Hirano, S., Seino, H., Akiyama, Y., Nonaka, I. (1990). Chitosan: a biocompatible material for oral and intravenous administrations. *Biomedical polymers*, 283-290.
- Howell, R. R., Wyngaarden, J. B. (1960). On the mechanism of peroxidation of uric acids by hemoproteins. *journal biological chemistry*. 235:3544-3550.
- Humbert, P. G., Haftek, M., Creidi, P., Lapière, C., Nusgens, B., Richard, A., Schmitt, D., Rougier, A., Zahouani, H. (2003). Topical ascorbic acid on photoaged skin. Clinical, topographical and ultrastructural evaluation: double-blind study vs. placebo. *Experimental dermatology*, 12(3), 237-244.
- Huo, L., Lu, R., Li, P., Liao, Y., Chen, R., Deng, C., Li, Y. (2011). “Antioxidant activity, total phenolic, and total flavonoid of extracts from the stems of *jasminum nervosum* Lour”. *Grasas y aceites*, 62 (2), 149-154.
- Illum, L. (1998). Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharmaceutical research*, 15(9), 1326-1331.
- Illum, L., Farraj, N. F., Davis, S. S. (1994). Chitosan as a novel nasal delivery system for peptide drugs. *Pharmaceutical research*, 11(8), 1186-1189.
- Ivanova, D., Tasinov, O., Kiselova-Kaneva, Y. (2014). Improved lipid profile and increased serum antioxidant capacity in healthy volunteers after *Sambucus ebulus* L. fruit infusion consumption. *International journal of food sciences and nutrition*, 65(6), 740-744.
- Jabbari, M., Hashempour, M. H., Razavi, S. Z. E., Shahraki, H. R., Kamalinejad, M., Emtiazy, M. (2016). Efficacy and short-term safety of topical Dwarf Elder (*Sambucus ebulus* L.) versus diclofenac for knee osteoarthritis: A randomized, double-blind, active-controlled trial. *Journal of ethnopharmacology*, 188, 80-86.

- Jensen, S. R., Nielsen, B. J. (1973). Cyanogenic glucosides in *Sambucus nigra* L. *Acta Chemica Scandinavica*, 27(7), 2661-2662.
- Jiang, M., Qureshi, S., Midha, K., Skelly, J. (1988). In vitro evaluation of percutaneous absorption of an Acyclovir product using intact and tape-stripped human skin. *Journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, 1(3), 102-107.
- Jiménez, P., Córdoba Díaz, D., Córdoba Díaz, M., Aracil, M., Girbés, T. (2012). Las toxinas Shiga de *Escherichia coli* y su convergencia enzimática con ricina, ebulina y nigrina (y II). *Industria farmacéutica*. 173, 76-82.
- Jiménez, P., Gayoso, M., Tejero, J., Cabrero, P., Córdoba, Díaz D., Basterrechea, J.E., Girbés, T. (2013). Toxicity in mice of lectin ebulin f present in dwarf elderberry (*Sambucus Ebulus* L.). *Toxicon*. 61, 26-29.
- Jiménez, P., Tejero, J., Córdoba-Díaz, D., Quinto, E. J., Garrosa, M., Gayoso, M. J., Girbés, T. (2015). Ebulin from dwarf elder (*Sambucus ebulus* L.): a mini-review. *Toxins*, 7(3), 648-658.
- Jones, D. P. (2008). Radical-free biology of oxidative stress. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 295(4), C849-C868.
- Juan, M. E., Planas, J. M., Ruiz-Gutierrez, V., Daniel, H., Wenzel, U. (2008). Antiproliferative and apoptosis-inducing effects of maslinic and oleanolic acids, two pentacyclic triterpenes from olives, on HT-29 colon cancer cells. *British journal of nutrition*, 100(01), 36-43.
- Juang, H. H. (2004). Modulation of iron on mitochondrial aconitase expression in human prostatic carcinoma cells. *Molecular and cellular biochemistry*, 265(1), 185-194.
- Kaack, K., Fretté, X.C., Christensen, L.P., Landbo, A.K., Meyer, A.S. (2008). Selection of elderberry (*Sambucus nigra* L.) genotypes best suited for the preparation of juice. *European Food Research and Technology*, 226(4), 843-855.
- Kaizaki, A., Tanaka, S., Ishige, K., Numazawa, S., Yoshida, T. (2006). The neuroprotective effect of hemeoxygenase (HO) on oxidative stress in HO-1 siRNAtransfected HT22 cells. *Brain research*, 1108(1), 39-44.

- Kanner, J., German, J. B., Kinsella, J. E., Hultin, H. O. (1987). Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 25(4), 317-364.
- Kapturczak, M. H., Wasserfall, C., Brusko, T., Campbell-Thompson, M., Ellis, T. M., Atkinson, M. A., Agarwal, A. (2004). Heme oxygenase-1 modulates early inflammatory responses: evidence from the heme oxygenase-1-deficient mouse. *The American journal of pathology*, 165(3), 1045-1053.
- Keith, R. F., Elliot, F. (1979). The preparation and use of isolated cells for metabolic studies. *Technical metabolism research*, 204, 1-20.
- Kelessidis, V. C., Poulakakis, E., Chatzistamou, V. (2011). Use of Carbopol 980 and carboxymethyl cellulose polymers as rheology modifiers of sodium-bentonite water dispersions. *Applied Clay Science*, 54(1), 63-69.
- Kikuchi, G., Yoshida, T., Noguchi, M. (2005). Heme oxygenase and heme degradation. *Biochemical and biophysical research communications*, 338(1), 558-567.
- Kim, H.P., Ryter, S.W., Choi, A.M. (2006). CO as a cellular signaling molecule. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 46, 411-449.
- Kim, H.P., Wang, X., Galbiati, F., Ryter, S.W., Choi, A.M. (2004). Caveolae compartmentalization of heme oxygenase-1 in endothelial cells. *The FASEB Journal*, 18(10), 1080-1089.
- Kusic, B., Miric, D., Dragojevic, I., Rasic, J., Popovic, L. (2016). Role of myeloperoxidase in patients with chronic kidney disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 1069743.
- Ko, J. A., Park, H. J., Hwang, S. J., Park, J. B., Lee, J. S. (2002). Preparation and characterization of chitosan microparticles intended for controlled drug delivery. *International journal of pharmaceutics*, 249(1), 165-174.
- Koleng, J. J., McGinity, J. W., Wilber, W. R. (2006). Carbomer. *Handbook of Pharmaceutical Excipients. 5th ed. Washington, DC: American Pharmaceutical Association*, 111-115.
- Konat, G.W., Wiggins, R.C. (1985). Effects of reactive oxygen species on myelin membrane proteins. *Journal of neurochemistry*, 45(4), 1113-1118.

- Kostennikova, Z. A. (1983). UV spectrophotometric quantitative determination of flavonoid in calendula tincture. *Farmatsiya*, 33(6), 83-6.
- Kregel, K. C., Zhang, H. J. (2007). An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 292(1), R18-R36.
- Kumar, M. R., Muzzarelli, R., Muzzarelli, C., Sashiwa, H., Domb, A. J. (2004). Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chemical reviews*, 104(12), 6017-6084.
- Lankin, Z., Tikhaze, A. K. (2017). Role of Oxidative Stress in the Genesis of Atherosclerosis and Diabetes Mellitus: A Personal Look Back on 50 Years of Research. *Current Aging Science*. 10(1), 18-25.
- Lares, M., Pérez, E. (2006). Determination of the mineral fraction and rheological properties of microwave modified starch from *Canna edulis*. *Plant Foods for Human Nutrition*, 61, 109e113.
- Lauer, A.C. (1999). Percutaneous drug delivery to the hair follicle, En: Bronaugh, R.L., Maibach, H.I. (Eds), *Percutaneous Absorption, Drugs Cosmetics Mechanisms Methodology*, 427-449.
- Lee, J., Koo, N., Min, D. B. (2004) . Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 3(1), 21-33.
- Lin, H. R., & Sung, K. C. (2000). Carbopol/pluronic phase change solutions for ophthalmic drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 69(3), 379-388.
- Lin, J. Y., Selim, M. A., Shea, C. R., Grichnik, J. M., Omar, M. M., Monteiro-Riviere, N. A., Pinnell, S. R. (2003). UV photoprotection by combination topical antioxidants vitamin C and vitamin E. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 48(6), 866-874.
- Liu, S., Tobias, R., McClure, S., Styba, G., Shi, Q., Jackowski, G. (1997). Removal of endotoxin from recombinant protein preparations. *Clinical biochemistry*, 30(6), 455-463.

- Liu, Z.H., Li, Z.Q. (2008). Tissue Culture of Stem Segment of *Sambucus williamsii* [J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 6, 24.
- Lord, J. M., Roberts, L. M., Robertus, J. D. (1994). Ricin: structure, mode of action, and some current applications. *FASEB Journal*, 8(2), 201-208.
- Maines, M. D., Ewing, J. F., Huang, T. J., Panahian, N. (2001). Nuclear localization of biliverdin reductase in the rat kidney: response to nephrotoxins that induce heme oxygenase-1. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 296(3), 1091-1097.
- Maines, M.D. (2005). The heme oxygenase system: update 2005. *Antioxidants & redox signaling*, 7(11-12), 1761-1766.
- Manguro, L.O.A., Ugi, I., Lemen, P. (2004). Further flavonol glycosides of *Embelia schimperi* leaves. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*, 18(1), 51-57.
- Marcotte, M., Taherian, H., & Ramaswamy, H. (2001). Rheological properties of selected hydrocolloids as a function of concentration and temperature. *Food Research International*, 34, 695-703.
- Martin, L., Jacomet, S., Thiebault, S. (2008). Plant economy during the Neolithic in a mountain context: the case of “Le Chenet des Pierres” in the French Alps (Bozel-Savoie, France). *Vegetation History and Archaeobotany*, 17 (1), 113–122.
- Martinac, A., Filipović-Grčić, J., Voinovich, D., Perissutti, B., Franceschinis, E. (2005). Development and bioadhesive properties of chitosan-ethylcellulose microspheres for nasal delivery. *International journal of pharmaceutics*, 291(1), 69-77.
- Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., Giovannini, C. (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *The Journal of nutritional biochemistry*, 16(10), 577-586.
- Masuda, T., Shimazawa, M., Hara, H. (2017). Retinal Diseases Associated with Oxidative Stress and the Effects of a Free Radical Scavenger (Edaravone). *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 9208489.
- Matter, K., Balda, M. S. (2003). Functional analysis of tight junctions. *Methods*, 30(3), 228-234.

- Mayne, S.T. (2003). Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *The Journal of nutrition*, 133(3), 933S-940S.
- Mazur, J. E. (1984). Tests of an equivalence rule for fixed and variable reinforcer delays. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 10(4), 426.
- McCabe, M.J., Nicotera, P., Orrenius, S. (1992). Calcium-Dependent Cell Death Role of the Endonuclease, Protein Kinase C, and Chromatin Conformation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 663(1), 269-278.
- McCord, J.M. (2002). Superoxide dismutase in aging and disease: an overview. *Methods in enzymology*, 349, 331-341.
- Medina, I., Gallardo, J.M., Gonzalez, M.J., Lois, S., Hedges, N. (2007). Effect of molecular structure of phenolic families as hydroxycinnamic acids and catechins on their antioxidant effectiveness in minced fish muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(10), 3889-3895.
- Mi, F. L., Shyu, S. S., Lee, S. T., Wong, T. B. (1999). Kinetic study of chitosan-tripolyphosphate complex reaction and acid-resistive properties of the chitosan-tripolyphosphate gel beads prepared by in-liquid curing method. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 37(14), 1551-1564.
- Mikulic-Petkovsek, M., Ivancic, A., Todorovic, B., Veberic, R., Stampar, F. (2015). Fruit phenolic composition of different elderberry species and hybrids. *Journal of Food Science*, 80(10), C2180-C2190
- Miles, A.M., Bohle, D.S., Glassbrenner, P.A., Hansert, B., Wink, D.A., Grisham, M.B. (1996). Modulation of superoxide-dependent oxidation and hydroxylation reactions by nitric oxide. *Journal of Biological Chemistry*, 271(1), 40-47.
- Min, K.J., Yang, M.S., Kim, S.U., Jou, I., Joe, E.H. (2006). Astrocytes induce hemeoxygenase- 1 expression in microglia: a feasible mechanism for preventing excessive brain inflammation. *Journal of Neuroscience*, 26(6), 1880-1887.

- Minamino, T., Christou, H., Hsieh, C.M., Liu, Y., Dhawan, V., Abraham, N.G., Perrella, M.A., Mitsialis, S.A., Kourembanas, S. (2001). Targeted expression of heme oxygenase-1 prevents the pulmonary inflammatory and vascular responses to hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(15), 8798-8803.
- Mitra, S., Deshmukh, A., Sachdeva, R., Lu, J., Mehta, J.L. (2011). Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis implications in antioxidant therapy. *American Journal Medical Sciences*, 342(2):135-42
- Monboisse, J.C., Gardes-Albert, M., Randoux, A., Borel, J.P., Ferradini, C. (1988). Collagen degradation by superoxide anion in pulse and gamma radiolysis. *Biochimica et Biophysica*, 965(1), 29-35.
- Moncada, S., Palmer, R. M. (1991). Biosynthesis and actions of nitric oxide. *Seminars in Perinatology*.15, 16-19.
- Morlon-Guyot, J., Helmy, M., Lombard-Frasca, S., Pignol, D., Piéroni, G., Beaumelle, B. (2003). Identification of the ricin lipase site and implication in cytotoxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 278(19), 17006-17011.
- Morris, C.R., Suh, J.H., Hagar, W., Larkin, S., Bland, D.A., Steinberg, M.H., Vichinsky, E.P., Shigenaga, M., Ames, B., Kuypers, F.A., Klings, E.S. (2008). Erythrocyte glutamine depletion, altered redox environment, and pulmonary hypertension in sickle cell disease. *Blood*. 111(1), 402–410.
- Morse, D., Choi, A.M. (2005). Heme oxygenase-1: from bench to bedside. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 172(6), 660-670.
- Mossman, K. L. (1983). Quantitative radiation dose-response relationships for normal tissues in man. II. Response of the salivary glands during radiotherapy. *Radiation research*, 95(2), 392-398.
- Muñoz, R, Arias, Y., Ferreras, J.M., Jiménez, P., Langa, C., Rojo, M.A., Gayoso, M.J., Córdoba-Díaz, D., Bernabéu, C., Girbés, T. (2013). In vitro and in vivo effects of an anti-mouse endoglin (CD105)-immunotoxin on the early stages of mouse B16MEL4A5 melanoma tumours. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 62(3), 541-51.

- Muñoz, R., Arias, Y., Ferreras, J.M., Rojo, A., Jiménez, P., Girbés, T. (2001). Sensitivity of several cancer cell lines to ricin and the novel type 2 ribosome-inactivating protein nigrin b. *Cancer Lett.* 167, 163-169.
- Muriel, P., Gordillo, K. R. (2016). Role of Oxidative Stress in Liver Health and Disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 1-2.
- Muzzarelli, R. A. (2009). Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. *Carbohydrate Polymers*, 77(1), 1-9.
- Naczki, M., Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054(1), 95-111.
- Naval, M. V., Gómez-Serranillos, M. P., Carretero, M. E., De Arce, C. (2006). Value of high-performance liquid chromatographic analysis of amino acids in the determination of Panax ginseng radix extract effect in cultured neurons. *Journal of chromatography A*, 1121(2), 242-247.
- Nguyen, V., Bonds, D.V, Prokai, L. (2008). Measurement of hydroxyl-radical formation in the rat striatum by in vivo microdialysis and GC-MS. *Chromatographia*, 68, 57-62.
- Nichols, J. A., Katiyar, S. K. (2010). Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Archives of dermatological research*, 302(2), 71-83.
- Nie, G., Chen, G., Sheftel, A.D., Pantopoulos, K., Ponka, P. (2006). In vivo tumor growth is inhibited by cytosolic iron deprivation caused by the expression of mitochondrial ferritin. *Blood*, 108(1), 2428-2434.
- Nieto, F. J., Iribarren, C., Gross, M. D., Comstock, G. W., Cutler, R. G.(2000). Uric acid and serum antioxidant capacity: a reaction to atherosclerosis? *Atherosclerosis*, 148(2), 131-139.
- Niki, E. (2012). Do antioxidants impair signaling by reactive oxygen species and lipid oxidation products? *FEBS letters*, 586(21), 3767-3770.
- Niki, E., Yoshida, Y., Saito, Y., Noguchi, N. (2005). Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochemical and biophysical research communications*, 338(1), 668-676.

- No, H. K., Meyers, S. P. (2000). Application of chitosan for treatment of wastewaters. In *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 1-27.
- Okuyama, K., Noguchi, K., Kanenari, M., Egawa, T., Osawa, K., Ogawa, K. (2000). Structural diversity of chitosan and its complexes. *Carbohydrate Polymers*, 41(3), 237-247.
- Olivero, R. J. (2011). Digestibilidad de los compuestos termooxidados y su influencia sobre la defensa antioxidante intestinal en rata, efectos del ayuno u grado de alteración del aceite de fritura. *Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia, Universidad de Alcalá*.
- Olsnes, S. (2004). The history of ricin, abrin and related toxins. *Toxicon*, 44(4), 361-370.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Prior, R. L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(10), 4619-4626.
- Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., Deemer, E. K. (2002). Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(11), 3122-3128.
- Palombo, P., Fabrizi, G., Ruocco, V., Ruocco, E., Fluhr, J., Roberts, R., Morganti, P. (2007). Beneficial long-term effects of combined oral/topical antioxidant treatment with the carotenoids lutein and zeaxanthin on human skin: a double-blind, placebo-controlled study. *Skin pharmacology and physiology*. 20(4), 199-210.
- Pamplona, R., Constantini, D. (2011). Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 301(4), R843-R863.
- Pascal, J. M. (2000). *Crystal Structures of Ebulin, a Non-toxic Ribosome-inactivating Protein*.
- Pascal, J.M., Day, P.J., Monzingo, A.F., Ernst, S.R., Robertus, J.D., Iglesias, R., Pérez, Y., Ferreras, J.M., Citores, L., Girbés T. (2001). 2.8-Å crystal structure of a nontoxic type-II ribosome-inactivating protein, ebulin I. *Proteins*, 43, 319-326.

- Pavanetto, F., Conti, B., Genta, I., Giunchedi, P. (1992). Solvent evaporation, solvent extraction and spray drying for polylactide microsphere preparation. *International Journal of Pharmaceutics*, 84(2), 151-159.
- Pavanetto, F., Genta, I., Giunchedi, P., Conti, B., Conte, U. (1994). Spray-dried albumin microspheres for the intra-articular delivery of dexamethasone. *Journal of microencapsulation*, 11(4), 445-454.
- Peter, M. G. (1995). Applications and environmental aspects of chitin and chitosan. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*, 32(4), 629-640.
- Peumans, W.J., Van Damme, E.J. (1995). Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology*, 109(2), 347-52.
- Pham-Huy, L. A., He, H., Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal Biomedical*, 4(2), 89-96.
- Pieri, V., Schwaiger, S., Ellmerer, E. P., Stuppner, H. (2009). Iridoid glycosides from the leaves of *Sambucus ebulus*. *Journal of natural products*, 72(10), 1798-1803.
- Pinnell, S. R. (2003). Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 48(1), 1-22.
- Poirier, J., Cohen, I., Bernaudin, J.F. (1985). Histología de la piel y sus anexos, En: Cuadernos de histología 3, 537-565.
- Poljsak, B. (2011). "Strategies for reducing or preventing the generation of oxidative stress." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 194586, 15 pages.
- Postlethwait, E.M., Langford, S.D., Jacobson, L.M., Bidani, A. (1995). NO₂ reactive absorption substrates in rat pulmonary surface lining fluids. *Free Radical Biology and Medicine*, 19(5), 553-563.
- Powers, S.K., Lennon, S.L. (1999). Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proceedings of the Nutrition Society*, 58(04), 1025-1033.
- Pryor, W.A. (2000). Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(1), 141-164.

- Puri, M., Kaur, I., Perugini, M.A., Gupta, R. C. (2012). Ribosome-inactivating proteins: current status and biomedical applications. *Drug discovery today*, 17(13), 774-783.
- Raeisi, S., Ghorbanihaghjo, A., Argani, H., Dastmalchi, S., Ghasemi, B., Ghazizadeh, T., Kafil, H. S. (2017). The Effects of Valsartan on Renal Klotho Expression and Oxidative stress in Alleviation of Cyclosporine Nephrotoxicity. *Transplantation*.
- Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., Dhama, K. (2014). Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *BioMed research international*, 761264, 19 pages.
- Rahimi-Esboei, B., Ebrahimzadeh, M.A., Gholami, S.H., Falah-Omrani, V. (2013). Anti-giardial activity of Sambucus ebulus. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 17(2), 2047–2050.
- Ramírez-Moreno, E., Cordoba-Díaz, M., de Cortes Sánchez-Mata, M., Marqués, C.D., Goñi, I. (2015) The addition of cladodes (*Opuntia ficus indica* L. Miller) to instant maize flour improves physicochemical and nutritional properties of maize tortillas. *LWT - Food Science and Technology*, 62 (1), pp. 675-681.
- Ranaldi, G., Marigliano, I., Vespignani, I., Perozzi, G., Sambuy, Y. (2002). The effect of chitosan and other polycations on tight junction permeability in the human intestinal Caco-2 cell line. *The Journal of nutritional biochemistry*, 13(3), 157-167.
- Rao, K.S. (2009). Free radical induced oxidative damage to DNA: relation to brain aging and neurological disorders. *Indian Journal Biochemical Biophysics*, 46, 9-15.
- Real Farmacopea Española (RFE).5ª Edición 2015
- Rhee, M. H., Park, H. J., Cho, J. Y. (2009). *Salicornia herbacea*: Botanical, chemical and pharmacological review of halophyte marsh plant. *Journal Medical Plants Research*, 3(8), 548-555.
- Rivett, A. J. (1986). Regulation of intracellular protein turnover. Covalent modification as a mechanism of marking proteins for degradation. *Current topics in cellular regulation*, 28, 291-337.
- Roberts, G. P., Barnes, H. A. (2001). New measurements of the flow-curves for Carbopol dispersions without slip artefacts. *Rheologica Acta*, 40(5), 499-503.

- Rodino, S., Butu, A., Butu, M., Cornea, P. C. (2015). Comparative studies on antibacterial activity of licorice, elderberry and dandelion. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 10(3), 947-955.
- Rodríguez, J.L., Valdés, O., Alemán, A. (2006). Evaluación de la actividad antioxidante de cinco hierbas aromáticas, Instituto de investigaciones para la industria alimenticia. *Ciencia y Tecnología Alimentos*, 16(1), 650-664.
- Rojo, M.A., Citores, L., Arias, F.J., Ferreras, J.M., Jiménez, P., Girbés, T. (2003). Molecular cloning of a cDNA coding for the D-galactose-binding dimeric lectin of dwarf elder (*Sambucus ebulus* L.) leaves. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 35, 1061-1065.
- Rottoli, M., Castiglioni, E. (2009). Prehistory of plant growing and collecting in northern Italy, based on seed remains from the early Neolithic and Chalcolithic (c.5600-2100 cal BC). *Vegetation History and Archaeobotany*. 18, 91-103.
- Ruiz-Téllez, T., Devesa, J. A. (2007). *Lonicera* L. Flora Iberica: plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. Edited by S. Castroviejo, C. Benedí, E. Rico, J. Güemes, and A. Herrero. Real Jardín Botánico (Consejo Superior de Investigaciones Científicas), Madrid, 15, 168-187.
- Ryter, S.W., Morse, D., Choi, A.M. (2004). Carbon monoxide: to boldly go where NO has gone before. *Science Signaling*, 6-10.
- Ryter, S.W., Otterbein, L.E., Morse, D., Choi, A.M. (2002). Heme oxygenase/carbon monoxide signaling pathways: regulation and functional significance. *Molecular and cellular biochemistry*, 234(1), 249-263.
- Sadilova, E., Carle, R., Stintzing, F. C. (2007). Thermal degradation of anthocyanins and its impact on color and in vitro antioxidant capacity. *Molecular and cellular biochemistry*, 234(1), 249-263.
- Saeedi Saravi, S. S., Shokrzadeh, M., Shirazi, F. H. (2013). Cytotoxicity of *Sambucus ebulus* on cancer cell lines and protective effects of vitamins C and E against its cytotoxicity on normal cell lines. *African Journal of Biotechnology*, 12(21), 3360-3365.
- Saeedi Saravi, S.S., Shokrzadeh M. (2009b). Histopathological and Biochemical Disorders Following Administration of *Sambucus ebulus* Extract on Mice and Rats and

- Preventive Effects of Vitamins C and E on Renal and Hepatic Disorders. *Pharmacognosy Magazine*, 5, 131-135.
- Saeedi Saravi, S.S., Shokrzadeh, M. (2009a). Anti-inflammatory, toxic effects, biochemical and pathological analysis in presence or lack of vitamins C and E, and cytotoxicity of n-hexane, methanolic and ethyl acetate extracts of *Sambucus ebulus*. *Toxicology Letters*, 189S, 166-167.
 - Salehzadeh, A., Asadpour, L., Naeemi, A. S., Houshmand, E. (2014). Antimicrobial activity of methanolic extracts of *Sambucus ebulus* and *Urtica dioica* against clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 11(5), 38-40
 - Salinas, J. G., and González, J. A. M. (2004). Producción de radicales libres derivados del oxígeno y el daño al hepatocito. *Medicina Interna de México*, 20(4), 287-295.
 - Salvayre, R., Negre-Salvayre, A., Camaré, C. (2016). Oxidative theory of atherosclerosis and antioxidants. *Biochimie*, 125, 281-296.
 - Sauermann, K., Jaspers, S., Koop, U., Wenck, H. (2004). Topically applied vitamin C increases the density of dermal papillae in aged human skin. *BMC dermatology*, 4(1), 13.
 - Schaefer, H., Redelmeier, T.E. (1996a). Composition and structure of the stratum corneum, En: *Skin Barrier, Principles of Percutaneous Absorption*, Karger, Basel, 43 - 86.
 - Schaefer, H., Redelmeier, T.E. (1996b). Structure and dynamics of the skin barrier, En: *Skin Barrier, Principles of Percutaneous Absorption*, Karger, Basel. 1-42.
 - Schaefer, H., Redelmeier, T.E. (1996c). Factores effecting percutaneous absorption, En: *Skin Barrier, Principles of Percutaneous Absorption*. Karger, Basel. 153 – 212.
 - Schaefer, H., Redelmeier, T.E. (1996d). Prediction and measurement of percutaneous absorption, En: *Skin Barrier, Principles of Percutaneous Absorption*, Karger, Basel, 1996d, 118 – 152.
 - Schaefer, H., Redelmeier, T.E. (1996e). The Practical application of techniques to measure percutaneous absorption En: *Skin Barrier, Principles of Percutaneous Absorption*, Karger, Basel. 213-262.

- Schafer, F. Q., Buettner, G. R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology Medicine*, 30(11), 1191-1212.
- Schieber, M., Chandel, N. S. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology*. 24(10), R453-R462
- Schwaiger, S., Zeller, I., Pölzelbauer, P., Frotschnig, S., Laufer, G., Messner, B., Pieri, V., Stuppner, H., Bernhard, D. (2011). Identification and pharmacological characterization of the anti-inflammatory principal of the leaves of dwarf elder (*Sambucus ebulus L.*). *Journal Ethnopharmacology*, 133(2), 704-709
- Sheikh, I.A., Ali, R., A Dar, T., Amjad Kamal, M. (2012). An overview on potential neuroprotective compounds for management of Alzheimer's disease. *CNS Neurolal Disorders Drug Targets*, 11(8), 1006-1011.
- Shibahara, S., Nakayama, M., Kitamuro, T., Udono-Fujimori, R., Takahashi, K. (2003). Repression of heme oxygenase-1 expression as a defense strategy in humans. *Experimental Biology Medicine*, 228(5), 472-473
- Shindo, Y., Hashimoto, T. (1997). Time course of changes in antioxidant enzymes in human skin fibroblasts after UVA irradiation. *Journal of dermatological science*, 14(3), 225-232.
- Shindo, Y., Witt, E., Han, D., Epstein, W., Packer, L. (1994). Enzymic and non-enzymic antioxidants in epidermis and dermis of human skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 102(1), 122-124.
- Shokrzadeh, M., S. Saeedi Saravi. (2010). The chemistry, pharmacology and clinical properties of *Sambucus ebulus*: A review. *Journal of Medicinal Plants Research*. 4(2), 95-103.
- Shokrzadeh, M., Saravi, S. S., Mirzayi, M. (2009). Cytotoxic effects of ethyl acetate extract of *Sambucus ebulus* compared with etoposide on normal and cancer cell lines. *Pharmacognosy Magazine*, 5(20), 316.
- Shu, X. Z., Zhu, K. J. (2000). A novel approach to prepare tripolyphosphate/chitosan complex beads for controlled release drug delivery. *International Journal Pharmceutics*, 201(1), 51-58.

- Sies, H. (1986). Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chemie*, 25, 1058-1071.
- Sies, H. (2013). ed. Oxidative stress. Elsevier.
- Sies, H., Stahl, W., Sundquist, A. R. (1992). Antioxidant functions of vitamins. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 669(1), 7-20.
- Sies, H., Stahl, W., Sevanian, A. (2005). Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. *Journal Nutrition*, 135:969-972.
- Singh, M., Mugler, K., Hailoo, D.W., Burke, S., Nemesure, B., Torkko, K., Shroyer, K.R. (2011). Differential expression of transferrin receptor (TfR) in a spectrum of normal to malignant breast tissues: implications for *in situ* and invasive carcinoma. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 19, 417-423.
- Singleton, V.L; Rossi J.A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16 (3) 144-158.
- Sinha, V. R., Singla, A. K., Wadhawan, S., Kaushik, R., Kumria, R., Bansal, K., Dhawan, S. (2004). Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *International Journal Pharmaceutics*, 274(1), 1-33.
- Smith, J. M., Dornish, M. Wood, E. J. (2005). Involvement of protein kinase C in chitosan glutamate-mediated tight junction disruption. *Biomaterials*, 26(16), 3269-3276.
- Stirpe, F. (2013). Ribosome-inactivating proteins: From toxins to useful proteins. *Toxicon*. 1, 67:12-6
- Stulzer, H. K., Tagliari, M. P., Parize, A. L., Silva, M. A. S., Laranjeira, M. C. M. (2009). Evaluation of cross-linked chitosan microparticles containing acyclovir obtained by spray-drying. *Materials Science and Engineering: C*, 29(2), 387-392.
- Süntar, I.P., Akkol, E.K., Yalçın, F.N., Koca, U., Keleş, H., Yesilada, E. (2010). Wound healing potential of *Sambucus ebulus* L. leaves and isolation of an active component, quercetin 3-O-glucoside. *Journal Ethnopharmacology*, 129 (1):106-114.
- Suñe, J. M., Cerezo, A. (1967). Reología en pomadas: I. Revisión de métodos para su estudio. *Ars. Pharmaceutica*, VIII:5-6.

- Svinth, M., Steighardt, J., Hernandez, R., Suh, J.K., Kelly, C., Day, P., Lord, M., Girbes, T., Robertus, J.D. (1998). Differences in cytotoxicity of native and engineered RIPs can be used to assess their ability to reach the cytoplasm. *Biochemical and biophysical research communications*, 249(3), 637-642.
- Takahashi, S., Abe, T., Gotoh, J., Fukuuchi, Y. (2002). Substrate-dependence of reduction of MTT: a tetrazolium dye differs in cultured astroglia and neurons. *Neurochemistry international*, 40(5), 441-448.
- Takebe, G., Yarimizu, J., Saito, Y., Hayashi, T., Nakamura, H., Yodoi, J., ... Takahashi, K. (2002). A comparative study on the hydroperoxide and thiol specificity of the glutathione peroxidase family and selenoprotein P. *Journal Biology Chemistry*, 277(43), 41254-41258.
- Tandogan, B., Ulusu, N. N. (2006). Kinetic mechanism and molecular properties of glutathione reductase. *Journal pharmaceutical science*, 31, 230-237.
- Tas, C., Ozkan, C. K., Savaser, A., Ozkan, Y., Tasdemir, U., & Altunay, H. (2006). Nasal absorption of metoclopramide from different Carbopol® 981 based formulations: In vitro, ex vivo and in vivo evaluation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 64(2), 246-254.
- Tasinov, O., Kiselova-Kaneva, Y., Ivanova, D. (2013). Sambucus ebulus-from traditional medicine to recent studies. *Scripta Scientifica Medica*, 45(2), 36-42.
- Tejero, J., Jiménez, P., Quinto, E. J., Cordoba-Diaz, D., Garrosa, M., Cordoba-Diaz, M., Gayoso, M. J., Girbés, T. (2015). Elderberries: A source of ribosome-inactivating proteins with lectin activity. *Molecules*, 20(2), 2364-2387.
- Tenhunen, R., Marver, H. S., Schmid, R. (1968). The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 61(2), 748-755.
- Thanan, R., Oikawa, S., Hiraku, Y., Ohnishi, S., Ma, N., Pinlaor, S., Murata, M. (2014). Oxidative stress and its significant roles in neurodegenerative diseases and cancer. *International journal of molecular sciences*, 16(1), 193-217.

- Tomer, D. P., McLeman, L. D., Ohmine, S., Scherer, P. M., Murray, B. K., O'Neill, K. L. (2007). Comparison of the total oxyradical scavenging capacity and oxygen radical absorbance capacity antioxidant assays. *Journal of medicinal food*, 10(2), 337-344.
- Trabandt, A., Gay, R. E., Gay, S. (1992). Oncogene activation in rheumatoid synovium. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 100(7-12), 861-875.
- Trachootham, D., Lu, W., Ogasawara, M. A., Valle, N. R. D., Huang, P. (2008). Redox regulation of cell survival. *Antioxidants & redox signaling*, 10(8), 1343-1374.
- Tuzlacı, E., Tolon, E. (2000). Turkish folk medicinal plants, part III: Şile (İstanbul). *Fitoterapia*. 71(6), 673-685.
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C. J., Telser, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular Cell Biochemistry*, 266(1-2), 37-56
- Valko, M., Jomova, K., Rhodes, C. J., Kuča, K., Musílek, K. (2016). Redox-and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Archives of Toxicology*. 90(1), 1-37.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal Biochemistry Cell Biology*, 39(1), 44-84.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. M., Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico Biological Interaction*, 160(1), 1-40.
- Van Damme, E.J., Barre, A., Rougé, P., Van Leuven, F., Peumans, W.J. (1996). Characterization and molecular cloning of Sambucus nigra agglutinin V (nigrin b), a GalNAc-specific type-2 ribosome-inactivating protein from the bark of elderberry (*Sambucus nigra*). *European Journal Biochemistry*, 237(2), 505-513.
- Vicente-Vicente, L., Casanova, A. G., Hernández-Sánchez, M. T., Pescador, M., López-Hernández, F. J., Morales, A. I. (2016). A systematic meta-analysis on the efficacy of pre-clinically tested nephroprotectants at preventing aminoglycoside nephrotoxicity. *Toxicology*, 377, 14-24.

- Vila-Jato JL. (2001). Formas de administración sobre la piel y las mucosas. Tecnología Farmacéutica. *Formas Farmacéuticas. Vol. II. Madrid: Editorial Síntesis*, 305-343.
- Villarino, N. F., Landoni, M. F. (2006). Administración transdérmica de fármacos: Una alternativa terapéutica. *Analecta Veterinaria*. 26.
- Wang, J. Y., Wen, L. L., Huang, Y. N., Chen, Y. T., Ku, M. C. (2006). Dual effects of antioxidants in neurodegeneration: direct neuroprotection against oxidative stress and indirect protection via suppression of gliamediated inflammation. *Current Pharmaceutical Design*. 12(27), 3521-3533
- Wang, X., Wang, Y., Kim, H. P., Nakahira, K., Ryter, S. W., Choi, A. M. (2007). Carbon monoxide protects against hyperoxia-induced endothelial cell apoptosis by inhibiting reactive oxygen species formation. *Journal of Biological Chemistry*, 282(3), 1718-1726
- Ward, P. D., Tippin, T. K., Thakker, D. R. (2000). Enhancing paracellular permeability by modulating epithelial tight junctions. *Pharmaceutical science technology today*, 3(10), 346-358.
- Wertz, P.W., van den Bergh B. (1998). The physical, chemical and functional properties of lipids in the skin and other biological barriers. *Chemistry and Physics of Lipids*. 91, 85-96.
- Willcox, J. K., Ash, S. L., Catignani, G. L. (2004). Antioxidants and prevention of chronic disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(4), 275-295
- Wu, X., Gu, L., Prior, R.L., McKay, S. (2004). Characterization of anthocyanins and procyanidins in some cultivars of Ribes, Aronia and Sambucus and their antioxidant capacity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 7846– 7856.
- Xiantao, W. A. N. G., Martindale, J. L., Yusen, L. I. U., Holbrook, N. J. (1998). The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival. *Biochemical Journal*, 333(2), 291-300.
- Xu, B., Chang, S. K. (2008). Antioxidant capacity of seed coat, dehulled bean, and whole black soybeans in relation to their distributions of total phenolics, phenolic acids, anthocyanins, and isoflavones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(18), 8365-8373.

- Yang, X. H., Pan, Y., Zhan, X. L., Zhang, B. L., Guo, L. L., Jin, H. M. (2016). Epigallocatechin-3-gallate Attenuates Renal Damage by Suppressing Oxidative Stress in Diabetic db/db Mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-14.
- Yesilada, E. (1995). Evaluation of the anti-inflammatory activity of the Turkish medicinal plant *Sambucus ebulus*. *Chemistry Natural Compounds*, 33(5), 539-540.
- Yesilada, E., Gurbuz, I., Shibata, H. (1999). Screening of Turkish antiulcerogenic folk remedies for anti-Helicobacter pylori activity. *Journal Ethnopharmacology*, 66, 289-293.
- Yesilada, E., Gürbüz, İ., Toker, G. (2014). Anti-ulcerogenic activity and isolation of the active principles from *Sambucus ebulus* L. leaves. *Journal Ethnopharmacology*, 153(2), 478-483.
- Young, A. J., Lowe, G. M. (2001). Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Archives biochemistry biophysics*. 385(1), 20-27.
- Young, B., Heath, J.W., Stevens, A., Lowe, J.S., Wheather, P.R., Burkitt, H.G. (2000). Wheater's functional histology; a text and colour atlas. Edinburgh: Churchill Livingstone.
- Zadák, Z., Hyspler, R., Tichá, A., Hronek, M., Fikrová, P., Rathouská, J., Stetina, R. (2009). Antioxidants and vitamins in clinical conditions. *Physiological Research*, 58, 13-17.
- Zahmanov, G., Alipieva, K., Denev, P., Todorov, D., Hinkov, A., Shishkov, S., Georgiev, M. I. (2015). Flavonoid glycosides profiling in dwarf elder fruits (*Sambucus ebulus* L.) and evaluation of their antioxidant and anti-herpes simplex activities. *Industrial Crops and Products*, 63, 58-64.
- Zelko, I. N., Mariani, T. J., Folz, R. J. (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(3), 337-349.
- Zgoulli, S., Grek, V., Barre, G., Goffinet, G., Thonart, P. H., Zinner, S. (1999). Microencapsulation of erythromycin and clarithromycin using a spray-drying technique. *Journal of Microencapsulation*, 16(5), 565-571.

ANEXOS

ANEXO I: ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Nomenclatura de las principales especies reactivas de oxígeno (EROs).....	25
Tabla 2. Principales funciones de los antioxidantes	31
Tabla 1.3. Sistemas antioxidantes no enzimáticos.....	35
Tabla 1.4. Estructura química de los principales compuestos fenólicos.....	40
Tabla 1.5. Clasificación taxonómica de <i>Sambucus ebulus</i> L.....	55
Tabla 1.6. RILs de <i>Sambucus ebulus</i> L.....	75
Tabla 1.7. Lectinas no RILs de <i>Sambucus ebulus</i> L.....	78
Tabla 3.1. Descripción de las diferentes partes del <i>S. ebulus</i> L recolectadas.....	88
Tabla 3.2. Descripción matemática del estado no estacionario en un experimento de difusión in vitro en celdas de difusión de flujo continuo	149
Tabla 4.1. Resultados de la determinación con Folin de los dos extractos.....	161
Tabla 4.2. Humedad perdida respecto de la masa total.....	161
Tabla 4.3. Contenido de flavonoides totales de extractos de las distintas partes de <i>S. ebulus</i>	162
Tabla 4.4. CUPRAC. Capacidad antioxidante de las diferentes partes de <i>S. ebulus</i>	164
Tabla 4.5. Fenoles Totales de las diferentes partes de <i>S. ebulus</i>	165
Tabla 4.6. Capacidad antirradicalaria de las diferentes partes de <i>S. ebulus</i>	167
Tabla 4.7. Capacidad de captación de radicales de oxígeno	168
Tabla 4.8. Parámetros obtenidos para los patrones.....	176
Tabla 4.9. Condiciones de preparación de las micropartículas de quitosano (CHS) cargadas de extracto liofilizado de HM de <i>S. ebulus</i> y entrecruzadas con TPP.	178
Tabla 4.10. Rendimiento de atomización (RA) y eficiencia de encapsulación (EE) de micropartículas de <i>S. ebulus</i> obtenidas por atomización.	179
Tabla 4.11. Cantidades acumuladas de extracto de hojas maduras de <i>S. ebulus</i> , expresado en equivalentes de ácido gálico (EAG), en membrana hidrófila en 8 horas.....	181
Tabla 4.12. Cantidades acumuladas de extracto de hojas maduras de <i>S. ebulus</i> , expresado en equivalentes de ácido gálico (EAG), en membrana lipófila en 8 horas.....	184
Tabla 4.13. Cantidades acumuladas de extracto liofilizado de hojas maduras de <i>S. ebulus</i> expresado en equivalentes de ácido gálico (EAG), en membrana hidrófila tras 8 horas.....	185

Tabla 4.14. Cantidades acumuladas de extracto liofilizado de hojas maduras de <i>S. ebulus</i> expresado en equivalentes de ácido gálico (EAG), en membrana lipófila tras 8 horas.	187
Tabla 4.15. Datos experimentales de extensibilidad del gel de extracto acuoso de hojas maduras de <i>S. ebulus</i> al 1% Carbopol® 980.....	191
Tabla 4.16. Datos experimentales de viscosidad del gel de extracto acuoso de hojas maduras de <i>S. ebulus</i> al 1% Carbopol®980.	193
Tabla. 4.17. Cantidades acumuladas de polifenoles en compartimento receptor expresadas en equivalentes de ácido gálico (EAG) liberadas del gel de extracto acuoso de hojas maduras de <i>S. ebulus</i> al 1% Carbopol®980.	195
Tabla 4.18. Datos experimentales de extensibilidad del gel de extracto acuoso de hojas maduras de <i>S. ebulus</i> al 1,5% Carbopol® 980.....	197
Tabla 4.19. Datos experimentales de viscosidad del gel de extracto acuoso de hojas maduras de <i>S. ebulus</i> al 1,5% Carbopol®980.	199
Tabla. 4.20. Cantidades acumuladas de polifenoles en compartimento receptor expresadas en equivalentes de ácido gálico (EAG) liberadas del gel de extracto acuoso de hojas maduras de <i>S. ebulus</i> al 1,5% Carbopol®980.	201
Tabla 4.21. Datos experimentales de extensibilidad del gel de extracto liofilizado de hojas maduras de <i>S. ebulus</i> al 1% Carbopol® 980.....	203
Tabla 4.22. Datos experimentales de viscosidad del gel de extracto liofilizado de hojas maduras de <i>S. ebulus</i> al 1% Carbopol®980.	205
Tabla. 4.23. Cantidades acumuladas de polifenoles en compartimento receptor expresadas en equivalentes de ácido gálico (EAG) liberadas del gel de extracto liofilizado de hojas maduras de <i>S. ebulus</i> al 1% Carbopol®980.	206
Tabla 4.24. Datos experimentales de extensibilidad del gel de extracto liofilizado de hojas maduras de <i>S. ebulus</i> al 1,5% Carbopol® 980.....	209
Tabla 4.25. Datos experimentales de viscosidad del gel de extracto liofilizado de hojas maduras de <i>S. ebulus</i> al 1,5% Carbopol®980.	211
Tabla. 4.26. Cantidades acumuladas de polifenoles en compartimento receptor expresadas en equivalentes de ácido gálico (EAG) liberadas del gel de extracto liofilizado de hojas maduras de <i>S. ebulus</i> al 1,5% Carbopol®980.	212

ANEXO II: ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Concepto de estrés oxidativo.....	22
Figura 1.2. El desequilibrio entre antioxidantes y prooxidantes.....	25
Figura 1.3. Sistemas antioxidantes enzimáticos.....	31
Figura 1.4. Interacción de la HO-1, en el sistema para la detoxificación de especies reactivas de oxígeno.....	35
Figura 1.5. Síntesis de glutatión reducido y oxidado.	37
Figura 1.6. Esquema de la generación exógena de radicales libres y efectos adversos del estrés oxidativo en la patogénesis de enfermedades.	45
Figura 1.7. Estructura de la piel.....	46
Figura 1.8. Mecanismos de fotoenvejecimiento.....	51
Figura 1.9. <i>Sambucus ebulus</i> L.	56
Figura 1.10. Detalle de un macizo de plantas de yezgo de la rivera del Alberche.....	57
Figura 1.11. Distribución de <i>S. ebulus</i> en la península Ibérica.....	57
Figura 1.12. Distribución geográfica de <i>Sambucus ebulus</i>	58
Figura 1.13. Principales estructuras químicas identificadas en <i>S. ebulus</i> L.....	61
Figura 1.14. Mecanismo de reacción antioxidante de los compuestos fenólicos.....	62
Figura 1.15. Flavonoides y estilbenos	64
Figura 1.16. Estructura de clorhidratos de cianidín-glucósidos.....	64
Figura 1.17. Degradación de cianidinas en función del pH.....	65
Figura 1.18. Degradación de los cianidín-glucósidos por apertura de los anillos A, B y C.....	65
Figura 1.19. Rutas intracelulares seguidas por ebulina y ricina.....	74
Figura 1.20. Estructura primaria de cadena A de ebulina I y ricina.	76
Figura 1.21. Estructura primaria de cadena B de ebulina I y ricina.....	77
Figura 1.22. Ataque de la neovasculatura tumoral con inmunotoxinas	79

Figura 3.1. Partes utilizadas de la planta.	90
Figura 3.2. Estructura de la quitina (a) y del quitosano (b).	94
Figura 3.3. Esquema de la reacción entre el quitosano en solución ácida y los iones de TPP	97
Figura 3.4. Representación esquemática de las uniones estrechas entre células epiteliales y el transporte paracelular.	100
Figura 3.5. Atomizador Büchi Mini Spray- Dryer B- 290.	103
Figura 3.6. Reacción del método CUPRAC.	106
Figura 3.7. Ácido gálico y sus derivados	108
Figura 3.8. Reacción de Folin – Ciocalteau.	108
Figura. 3.9. Recta patrón de ácido gálico 2,5 mM	109
Figura 3.10. Capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC).	111
Figura 3.11. Esquema diluciones ORAC	112
Figura 3.12. Placa de 96 ORAC	113
Figura 3.13. Descongelación de cultivos celulares	116
Figura 3.14. Cámara de Neubauer.	119
Figura 3.15. Reducción del MTT	120
Figura 3.16. Esquema HPLC JASCO	125
Figura 3.17. Representación esquemática del polímero de Carbopol[®]	133
Figura 3.18. Extensómetro de Pozo y Suñé.	134
Figura 3.19. Aplicación de una fuerza de cizalla sobre un material.	135
Figura 3.20. Viscosidad en fluidos newtonianos.	137
Figura 3.21. Viscosidad en materiales plásticos.	137
Figura 3.22. Viscosidad en materiales pseudoplásticos y dilatantes.	138
Figura 3.23. Viscosidad en materiales tixotrópicos.	139
Figura 3.24. Viscosímetro Brookfield modelo HB con aguja CP42.	140
Figura 3.25. Diseño celda horizontal.	142

Figura 3.26. Diseño celda de Franz.....	143
Figura 3.27. Diseño celda de difusión de flujo continuo.....	144
Figura 3.28. Perfiles de absorción expresados en cantidades acumuladas o en flujos con respecto al tiempo.....	151
Figura 3.29. Equipo de difusión de flujo continuo (PermeGear® ILC-07)	153
Figura 3.30. Esquema de la celda de difusión de flujo continuo.	154
Figura 3.31. Detalle funcionamiento aparato de difusión de flujo continuo.....	154
Figura 3.32. Detalle del montaje de membrana o piel en las celdas de difusión.....	155
Figura 4.1. Recta patrón de la capacidad antioxidante de ácido gálico por el método CUPRAC.....	163
Figura. 4.2. Recta patrón de ácido gálico 2,5 mM	165
Figura 4.3. Recta patrón de Trolox® 1 mM.....	166
Figura 4.4. Curva de calibración de Trolox.....	168
Figura 4.5. Análisis comparativo de las técnicas de evaluación de los extractos de <i>S. ebulus</i>.....	169
Figura 4.6. Efecto del tratamiento durante 24 horas de diferentes concentraciones de los extractos de las hojas y frutos maduros de <i>S. ebulus</i> sobre la viabilidad de las células U373 MG de astrocitoma humano.....	171
Figura 4.7. Efecto protector de extractos de hojas y frutos maduros de <i>S. ebulus</i>. ...	173
Figura 4.8. Detalle de los cromatogramas de los patrones de quercetina, kaempferol, ácido gentísico, ácido ferúlico, apigenina y rutina.....	175
Figura 4.9. Cromatogramas de los extractos de frutos verdes y maduros, hojas antes y después de floración.	177
Figura 4.10. Perfil de cesión en membrana hidrófila del extracto de hojas maduras de <i>S. ebulus</i> en porcentaje respecto al tiempo.....	182
Figura 4.11. Evolución del flujo intrínseco en función del tiempo del extracto de HM de <i>S. ebulus</i> cedido a través de membrana hidrófila.....	182
Figura 4.12. Perfil de cesión en membrana lipófila del extracto de hojas maduras de <i>S. ebulus</i> en porcentaje respecto al tiempo.....	184

Figura 4.13. Perfil de cesión en membrana hidrófila del extracto liofilizado de hojas maduras de <i>S. ebulus</i> en porcentaje respecto al tiempo.....	185
Figura 4.14. Evolución del flujo intrínseco en función del tiempo del extracto liofilizado de HM de <i>S. ebulus</i> cedido a través de membrana hidrófila.	186
Figura 4.15. Perfil de cesión en membrana lipófila del extracto liofilizado de hojas maduras de <i>S. ebulus</i> en porcentaje respecto al tiempo.....	188
Figura 4.16. Perfiles de cesión de los distintos extractos en membrana hidrófila y lipófila durante ocho horas.....	188
Figura 4.17. Comparativa de los microgramos difundidos acumulados a través de membrana hidrófila para el extracto crudo y liofilizado.....	189
Figura 4.18. Extensograma del gel de extracto acuoso de hojas maduras de <i>S. ebulus</i> al 1% Carbopol[®]980.....	192
Figura 4.19. Representación gráfica de la fuerza de cizalla frente a la velocidad de cizalla del gel de extracto acuoso de hojas maduras de <i>S. ebulus</i> al 1% Carbopol[®]980.	194
Figura 4.20. Perfil de cesión de polifenoles en compartimento receptor expresadas en porcentaje liberados del gel de extracto acuoso de hojas maduras de <i>S. ebulus</i> al 1% Carbopol[®]980.....	195
Figura 4.21. Evolución del flujo intrínseco en función del tiempo del gel de extracto acuoso de hojas maduras de <i>S. ebulus</i> al 1% Carbopol[®]980.....	196
Figura 4.22. Extensograma del gel de extracto acuoso de HM de <i>S. ebulus</i> al 1,5% Carbopol[®]980.....	198
Figura 4.23. Representación gráfica de la fuerza de cizalla frente a la velocidad de cizalla del gel de extracto acuoso de hojas maduras de <i>S. ebulus</i> al 1,5% Carbopol[®]980.....	200
Figura 4.24. Perfil de cesión de polifenoles en compartimento receptor expresadas en porcentaje liberados del gel de extracto acuoso de hojas maduras de <i>S. ebulus</i> al 1,5% Carbopol[®]980.....	201
Figura 4.25. Evolución del flujo intrínseco en función del tiempo y modelo matemático generado del gel de extracto acuoso de hojas maduras de <i>S. ebulus</i> al 1,5% Carbopol[®]980.....	202

Figura 4.26. Extensograma del gel de extracto liofilizado de hojas maduras de <i>S. ebulus</i> al 1% Carbopol®980.....	205
Figura 4.27. Fuerza de cizalla frente a la velocidad de cizalla del gel de extracto liofilizado de hojas maduras de <i>S. ebulus</i> al 1% Carbopol®980.....	206
Figura 4.28. Perfil de cesión de polifenoles en compartimento receptor expresadas en porcentaje liberados del gel de extracto liofilizado de hojas maduras de <i>S. ebulus</i> al 1% Carbopol®980	207
Figura 4.29. Evolución del flujo intrínseco en función del tiempo y del modelo matemático generado del gel de extracto liofilizado de hojas maduras de <i>S. ebulus</i> al 1% Carbopol®980.....	207
Figura 4.30. Extensograma del gel de extracto liofilizado de hojas maduras de <i>S. ebulus</i> al 1,5% Carbopol®980.....	210
Figura 4.31. Representación gráfica de la fuerza de cizalla frente a la velocidad de cizalla del gel de extracto liofilizado de hojas maduras de <i>S. ebulus</i> al 1,5% Carbopol®980.....	212
Figura 4.32. Perfil de cesión de polifenoles en compartimento receptor expresadas en porcentaje liberados del gel de extracto liofilizado de hojas maduras de <i>S. ebulus</i> al 1,5% Carbopol®980.....	213
Figura 4.33. Evolución del flujo intrínseco en función del tiempo y del modelo matemático de ajuste del gel de extracto liofilizado de hojas maduras de <i>S. ebulus</i> al 1,5% Carbopol®980.....	214
Figura 4.34. Representación gráfica del índice de extensibilidad.....	216
Figura 4.35. Representación gráfica de la consistencia.....	217
Figura 4.36. Representación gráfica de la viscosidad.....	217
Figura 4.37. Comparativa de los microgramos difundidos acumulados para el extracto liofilizado en gel de Carbopol®980 al 1,0% y 1,5%.....	201
Figura 4.38. Comparativa de los microgramos difundidos acumulados para el extracto crudo en gel de Carbopol®980 al 1,0% y 1,5%.....	201
Figura 4.39. Representación gráfica del coeficiente de permeación K_p.....	203