



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**Estudio de difusión transdérmica *in vitro* de
7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina aislado de *Heterotheca inuloides* Cass
(Árnica mexicana) utilizando membranas sintéticas Strat-M®.**

Tesis

Que para obtener el título de:

Química Farmacéutica Bióloga

Presenta:

Galicia Alcántara Dulce María

Director: Dr. Andrés Navarrete Castro.

Asesor: Dra. Flora Adriana Ganem Rondero.

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TABLA DE CONTENIDO

Índice Temático	I
Índice de Figuras	III
Índice de Cuadros	IV
Resumen	V
1. Introducción	1
2. Marco teórico	2
2.1. La piel como barrera de protección.....	2
2.2. Estructura de la piel.....	2
2.2.1. Epidermis.....	2
2.2.1.1. Estrato basal cilíndrico	4
2.2.1.2. Estrato espinoso.....	4
2.2.1.3. Estrato granuloso.....	4
2.2.1.4. Estrato lúcido.....	4
2.2.1.5. Estrato corneo.....	4
2.2.2. Dermis.....	5
2.2.3. Tela Subcutánea.....	5
2.3. Mecanismo de permeabilidad y ley de difusión.....	5
2.4. Estudios de difusión	8
2.5. Membranas sintéticas.....	9
2.6. Coeficiente de partición y solubilidad	10
2.7. <i>Heterotheca inuloides</i> Cass.....	10
3. Justificación	13
4. Hipótesis	13
5. Objetivos	14

6. Metodología.....	15
6.1. Material químico	15
6.2. Membranas.....	15
6.3. Aparatos	15
6.4. Determinación de propiedades fisicoquímicas.....	16
6.5. Estudio de difusión.....	16
6.6. Condiciones de análisis de muestras por HPLC	16
6.7. Validación del método de cuantificación.....	17
7. Resultados.....	18
7.1. Determinación de propiedades fisicoquímicas.....	18
7.2. Estudio de difusión <i>in vitro</i>	18
8. Discusión de resultados	26
9. Conclusiones.....	28
10. Perspectivas	29
11. Referencias	30
12. Anexos	33
12.1. Anexo 1. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear ¹ H.....	33
12.2. Anexo 2. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear ¹³ C.....	34
12.3. Espectro de masas	35
12.4. Validación del método para 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina.....	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo de las capas de la piel.....	3
Figura 2. Rutas de permeabilidad de la piel	6
Figura 3. <i>Heterotheca inuloides</i> Cass (Árnica mexicana).....	11
Figura 4. Metabolitos secundarios de <i>H. inuloides</i> Cass.....	12
Figura 5. Cámara de Franz	15
Figura 6. Perfil de difusión de 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina.....	19
Figura 7. Orden cinético para la difusión de 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina	20
Figura 8. Gráfico del porcentaje permeado en función del tiempo.....	21
Figura 9. Gráfico de la fracción difundida en función del tiempo siguiendo el modelo de Higuchi.....	21
Figura 10. Gráfico de la fracción difundida en función del tiempo siguiendo el modelo de Peppas.	22
Figura 11. Orden cinético para la difusión de cafeína.....	23
Figura 12. Perfil de difusión de cafeína.....	24
Figura 13. Espectro de RMN ¹ H de 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina	33
Figura 14. Espectro de RMN ¹³ C de 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina	34
Figura 15. Espectro de masas de 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina	35
Figura 16. Cromatograma del blanco	36
Figura 17. Cromatograma de 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina.....	36
Figura 18. Curva de Calibración de 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina	37
Figura 19. Curva estándar de cafeína	40

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Propiedades fisicoquímicas de 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina: Solubilidad aparente en solución amortiguadora de Tris pH=7.5 y coeficiente de reparto octanol/solución amortiguadora de tris pH=7.5.	18
Cuadro 2. Determinación del flujo y coeficiente de permeabilidad de cafeína.	24
Cuadro 3. Resumen del método de validación para la cuantificación de 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina	25
Cuadro 4. Curva de calibración de 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina.	37
Cuadro 5. ANOVA de la linealidad	38
Cuadro 6. Precisión del método de cuantificación de 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina	38
Cuadro 7. ANOVA de la reproducibilidad del método	38
Cuadro 8. Repetibilidad del método	39
Cuadro 9. ANOVA para la repetibilidad del método	39
Cuadro 10. Exactitud del método	39

Resumen

En la presente tesis se realizó un estudio *in vitro* de difusión transdérmica de 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina, metabolito secundario que concede propiedades antiinflamatorias y antinociceptivas a la *Heterotheca inuloides* Cass mejor conocida como “Árnica mexicana”, la cual es usada en la medicina tradicional en forma de infusiones, decocciones o cataplasmas para tratar heridas cutáneas y procesos inflamatorios^{1,2,3}.

El resultado que se obtuvo del estudio utilizando cámaras de Franz y una membrana sintética de uso comercial como un modelo de piel humana, denominada Strat-M®; es que la 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina sigue un mecanismo de difusión pasiva, pero con el tiempo la cantidad difundida disminuye, encontrándose una difusión en las primeras dos horas de 0.1107 ± 0.0003 mg/cm²h y otro de 2 a 4 horas de 0.0556 ± 0.0121 mg/cm²h. Una manera de verificar si el metabolito seguía una difusión pasiva fue determinando las propiedades fisicoquímicas de éste, demostrando que posee un bajo peso molecular, un coeficiente de reparto (octanol/agua) de 2, el cual es ideal para que no quede retenido en la membrana, además de presentar una baja solubilidad en el medio receptor utilizado (Disolución amortiguadora de Tris pH 7.5).

1. INTRODUCCIÓN

Heterotheca inuloides Cass (Árnica mexicana) es una planta empleada en la Medicina Tradicional Mexicana para el tratamiento de contusiones, procesos inflamatorios y heridas cutáneas^{2,3,1}; utilizando principalmente las inflorescencias para la elaboración de infusiones o decocciones y algunos productos comerciales tanto en cremas, ungüentos y pomadas.

Se ha identificado que la 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina es uno de los metabolitos secundarios que concede dichas propiedades, por lo que en el presente estudio se determinará la constante de permeabilidad utilizando un modelo *in vitro* de difusión transdérmica en cámaras de Franz y una membrana sintética comercial (Strat-M®) como sustituto de piel, la cual se ha reportado en trabajos anteriores reduce la variabilidad, además de tener una mejor reproducibilidad en la experimentación⁴, para poder correlacionar el uso de la planta y sus propiedades de penetración con el uso tradicional.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. LA PIEL COMO BARRERA DE PROTECCIÓN

La piel humana es una barrera eficiente⁵, su principal función es proteger al cuerpo humano de la pérdida de agua (balance hídrico y termorregulación), y la entrada de componentes potencialmente tóxicos, alergénicos, irritantes y microbiológicos⁶.

2.2. ESTRUCTURA DE LA PIEL

La piel es el órgano más extenso de todo el cuerpo humano, mide aproximadamente 1.4 metros cuadrados. Existe una gran variabilidad de la piel dependiendo del sexo, edad, raza, actividades del individuo y región del cuerpo⁷. Está conformada por capas dividiéndose en epidermis (capa superficial), dermis o corion (porción profunda) y tela subcutánea.

2.2.1. EPIDERMIS

La epidermis es la capa exterior de la piel. Es un epitelio escamoso, estratificado y queratinizado. Carece de vasos sanguíneos y se nutre por difusión de los capilares de la dermis. Impide tanto la pérdida de humedad y la entrada de sustancias tóxicas⁸. Los cinco estratos que lo conforman son: basal, espinoso, granuloso, lúcido y corneo. Esquemáticos en la **Figura 1**.

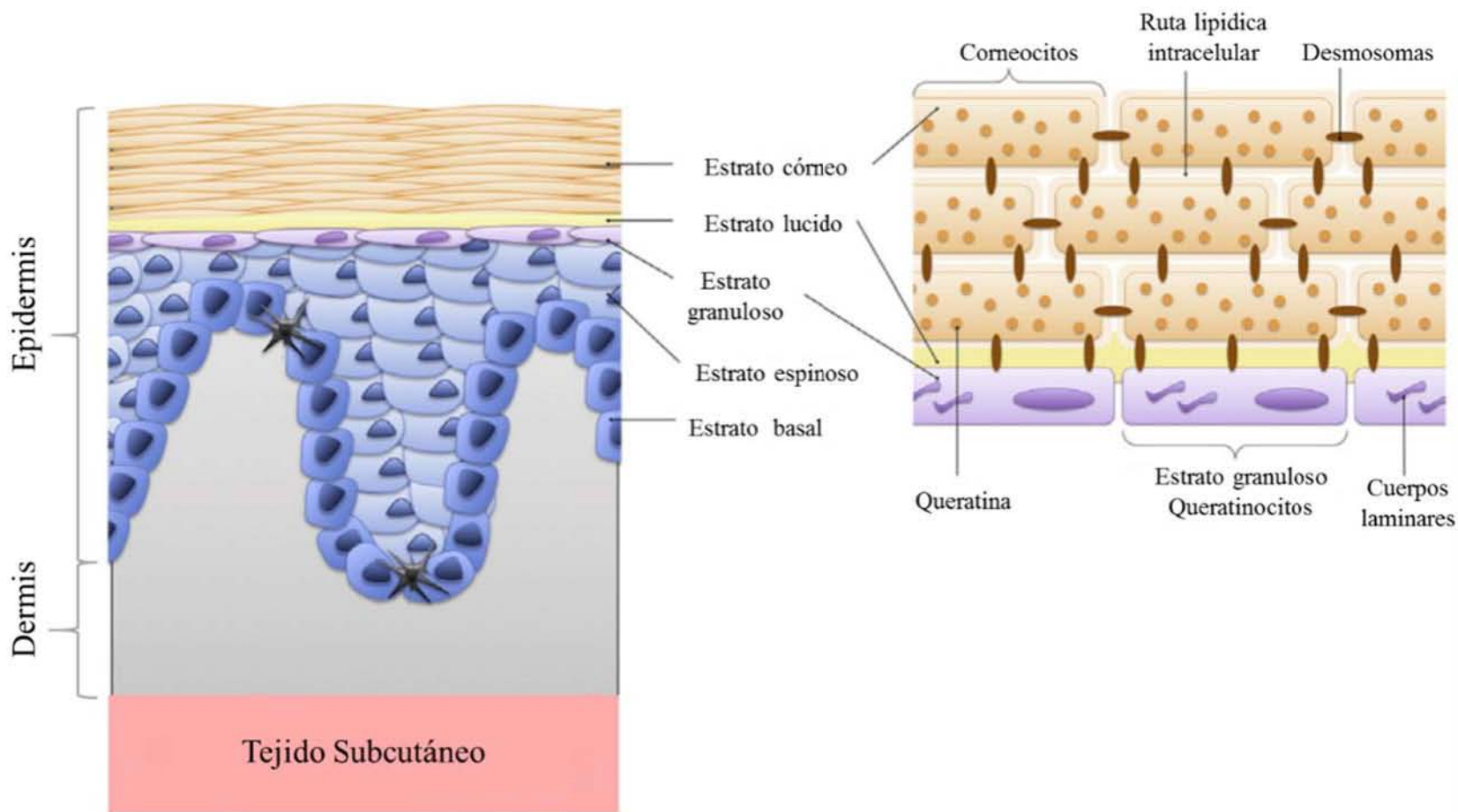


Figura 1. Esquema representativo de las capas celulares de la piel.

2.2.1.1. ESTRATO BASAL CILÍNDRICO

El estrato basal cilíndrico o germinativo es la capa más profunda e importante de la piel, constituido por células columnares capaces de efectuar división mitótica⁹, cuando las nuevas células son formadas, sufren cambios morfológicos y nucleares de manera que se mueven hacia la capa superficial en forma simultánea, dando origen a todas las capas externas de la epidermis¹⁰.

2.2.1.2. ESTRATO ESPINOSO

Las células basales que se mueven hacia la superficie forman una capa de células poliédricas conectadas por desmosomas, constituyendo el estrato espinoso, denominado así, ya que al observarse en el microscopio, se notan bandas citoplasmáticas que le dan un aspecto espinoso característico en los intersticios de las células⁹.

2.2.1.3. ESTRATO GRANULOSO

El estrato granuloso está conformado por varias capas de células poliédricas que acumulan en su citoplasma queratohialina, la cual es una proteína sulfatada precursora de la queratina⁹. También llamado así porque en este estrato aparecen los gránulos lamelares o cuerpos de Odland. Estos gránulos contienen una carga lipídica que al llegar al estrato córneo será liberada al espacio intercelular, formando así la matriz de lípidos en la que están inmersos los corneocitos.

2.2.1.4. ESTRATO LÚCIDO

El estrato lúcido, situado debajo del estrato córneo, se compone por tres o cuatro capas de células aplanadas que contienen gránulos de eleidina⁹.

2.2.1.5. ESTRATO CÓRNEO

El estrato Córneo (5 a 600 μm) está constituido por células planas, que por su poca nutrición y por estar alejadas de la red capilar dérmica, sufren un proceso necrótico biótico⁹. Son conocidas con el nombre de células queratinizadas por su alto contenido en dicha proteína.

La estructura principal de este estrato consiste en:

- **Corneocitos:** Están conformados por un conjunto de 18-20 células apiladas que varían según la parte del cuerpo y proporcionan una barrera física.

- **Corneodesmosomas:** Funcionan como ligaduras para mantener juntos a los corneocitos.
- **Mezcla de lípidos:** Permiten el paso de las moléculas entre los corneocitos. Está conformada por 13 especies de ceramidas, colesterol, y ácidos grasos libres en igual proporción para formar una **barrera de permeabilidad**.
- **Enzimas proteolíticas:** Están involucradas en el proceso de formación de una pro-barrera conformada por lípidos y enzimas lipolíticas que degradan los desmosomas, contribuyendo ambas al inicio de las actividades bioquímicas del estrato córneo.
- **Secreciones:** Son contenidas en el cuerpo laminar epidermal del estrato córneo y granuloso. Forman una pro-barrera laminar de lípidos, intercalados con enzimas y péptidos antimicrobianos¹¹.

2.2.2. DERMIS

La dermis es una capa proveniente del mesodermo. Está compuesta por una red de macromoléculas con filamentos intermedios de queratina que unen a los queratinocitos con las fibras de colágeno en la dermis superficial. Presenta dos estratos mal limitados que son el estrato papilar del tejido conectivo laxo y el estrato reticular¹².

2.2.3. TELA SUBCUTÁNEA

Es una lámina de tejido areolar que suele contener grasa. Se le conoce como tejido adiposo subcutáneo o aponeurosis superficial, une a la dermis con las estructuras subyacentes⁹.

2.3. MECANISMOS DE PERMEABILIDAD Y LEY DE DIFUSIÓN.

Las membranas celulares tienen una permeabilidad selectiva que depende de la composición de la membrana (lípidos y proteínas) y la molécula (tamaño, lipofilicidad y movimiento al atravesar la membrana); es decir, las moléculas pequeñas y solubles en lípidos pueden atravesar directamente la membrana, mientras que, las moléculas más grandes o menos liposolubles no lo pueden hacer, a menos que la célula tenga un mecanismo específico para transportarlas. El movimiento de la molécula al atravesar la membrana se clasifica de acuerdo a las necesidades físicas y energéticas. De éstas

últimas surgen el llamado mecanismo de difusión, el cual se divide en pasivo o activo dependiendo si utilizan o no energía para llevarse a cabo¹³.

De acuerdo con las leyes de difusión de Fick, la permeabilidad a través de la piel incluye el proceso de difusión a través de la epidermis intacta y de los apéndices de la piel. Éstos últimos ocupan el 1% del total de la superficie del cuerpo humano, por lo que se considera a esta vía poco usual. Principalmente, la permeabilidad está limitada por el estrato córneo, donde han sido identificadas dos rutas por las cuales se lleva a cabo dicho proceso; la vía intracelular y la intercelular^{13,14}.

La vía intracelular, como se puede ver en la **Figura 2**, se da a través de los espacios intracelulares, rodeando a los corneocitos. Mientras que la ruta intercelular atraviesa los corneocitos y los espacios intercelulares¹².

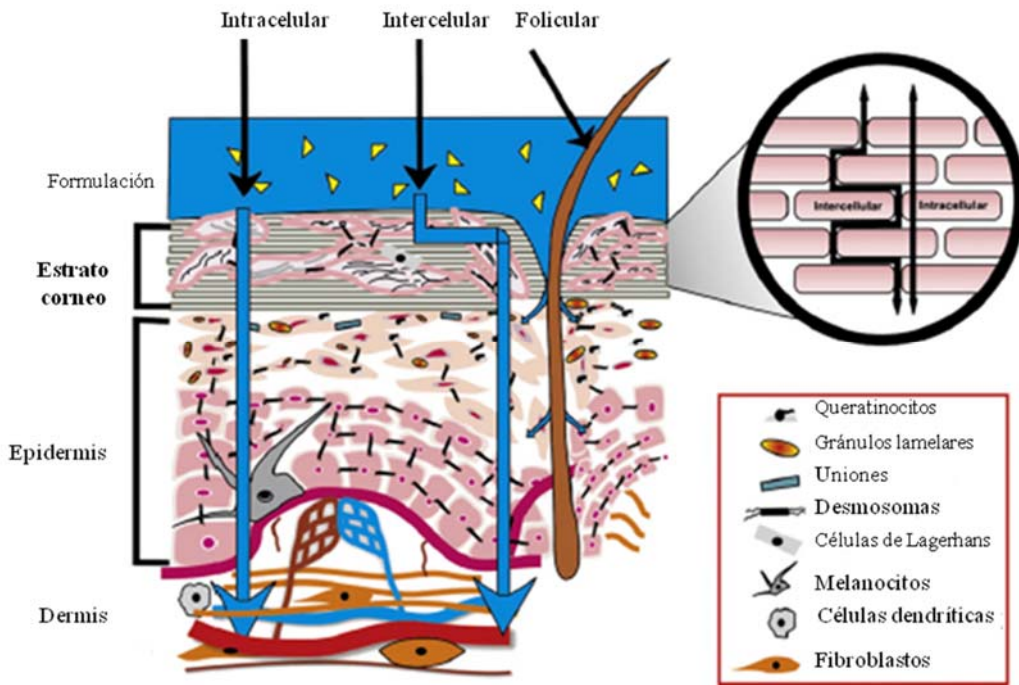


Figura 2. Rutas de permeabilidad de la piel.

Existen varios modelos fisicoquímicos que explican la permeabilidad de las moléculas a través de la piel, entre los principales se encuentran la primera y segunda ley de Fick. La primera ley describe la difusión de un compuesto sin carga a través de una membrana, donde el flujo en estado estacionario (J =moles/cms) por unidad de

longitud del trayecto (δ , cm) es proporcional al gradiente de concentración (ΔC) y al coeficiente de difusión (D cm²/s).

$$J = -D \left(\frac{\Delta C}{\Delta \delta} \right)$$

Denotando que el signo negativo indica que el flujo neto es en dirección al compartimento de menor concentración; y la segunda ley de Fick se utiliza en sistemas cuya difusión no es constante (estado de no equilibrio), donde el coeficiente de difusión es independiente del tiempo; estableciendo que la velocidad de cambio de la composición de la muestra es proporcional al coeficiente de difusión por la velocidad de cambio del gradiente de concentración¹⁵; para calcular la constante de permeabilidad (K_p ; cm/h) se utiliza la siguiente ecuación:

$$\Delta t = \frac{x^2}{2D}$$

Donde Δt es la diferencia de tiempo, x es el cambio de concentración en un punto y D es el coeficiente de difusión¹⁶.

Otros modelos que explican la difusión son los de Higuchi y Peppas. El modelo de Higuchi describe el flujo de un soluto al atravesar una matriz usualmente polimérica; aunque para explicarlo se basa en dos puntos principalmente. El primero es la visualización física de la barrera de la matriz, en donde hay una parte con soluto no disuelto y la otra parte con el soluto disuelto, manteniéndose siempre el gradiente de concentración como se describe en la ley de Fick. Para terminar de describir el modelo, el segundo punto es considerar el análisis como un estado pseudo estático combinado con un balance global de masas del cual se obtiene la siguiente ecuación:

$$Mt = \sqrt{DCs(2A - Cs)t} \quad \text{o} \quad J = \frac{dMt}{dt} = \sqrt{\frac{DCs(A - \frac{1}{2}Cs)}{2t}}$$

Donde Mt es la cantidad acumulada de soluto a un tiempo por unidad de área de la superficie expuesta y D el coeficiente de difusión del soluto a través de la membrana¹⁷.

El otro modelo es el de Peppas, el cual en general es favorable para un tipo de difusión Fickiana de un soluto a través de una membrana polimérica y se describe de la siguiente forma¹⁷:

$$\frac{Mt}{M_{\infty}} = kt^n$$

Donde M_t es la cantidad acumulada de soluto a un tiempo, M_{∞} es la cantidad total acumulada, K es la constante específica del sistema y n es el exponente de difusión el cual es un indicativo del mecanismo por el cual difunde el soluto. Cuando n es igual a 0.5 se dice que sigue una difusión de tipo Fickiana, cuando n igual a 1 se relaciona a una cinética de orden cero o no Fickiana¹⁸.

2.4. ESTUDIOS DE DIFUSIÓN.

Muchos estudios de difusión de fármacos son utilizados para analizar la permeabilidad de éstos, por la vía cutánea, ya que existe una pequeña diferencia entre los modelos de difusión de la formulación y la permeabilidad de los fármacos a través de la piel¹⁵. Los modelos *in vitro* son de gran utilidad pues permiten observar algunas diferencias según su situación fisiológica (sitio anatómico, daños o lesiones, enfermedad e hidratación)¹⁹.

Existen varias guías reguladas por comités que avalan la realización de estudios *in vitro*. Entre las más conocidas se encuentran la Guía No. 428 “Estudios del comportamiento de la absorción de la piel” creada por la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE) y el Centro Europeo para Ecotoxicología y Toxicología de Químicos (EXETOC); la guía “Métodos para la evaluación de la penetración percutánea” de la Asociación Europea de Cosméticos y Perfumes (COLIPA); siendo la de más importancia la elaborada por la Asociación Americana de Científicos en colaboración con la Administración de Fármacos y Alimentos (HAPS/FDA) cuyo trabajo radica en los perfiles de los estudios *in vitro* de penetración de la piel citados en la “Guía para la industria en formas semisólidas no estériles”. Sin importar la guía que se siga, en la técnica utilizada se deben tener en cuenta las diversas variables generadas por el tipo de cámara, la piel (integridad, viabilidad y preparación),

medio receptor y la manera en cómo realizar los cálculos para determinar la constante de permeabilidad²⁰.

Una manera de predecir la absorción de un compuesto a través de la piel en una prueba de difusión *in vitro* es usar cámaras de difusión de Franz, que están compuestas por un compartimento donador y un receptor separados por una membrana²¹.

La piel humana es obtenida a partir de una operación o de un cadáver y es considerada como la “*Ideal*” por la alta correlación que existe entre los datos de los estudios *in vivo* e *in vitro*. Sin embargo, la piel humana no es de fácil acceso y tiene grandes variaciones intra e inter-individual de hasta de un 45%²²; una manera de reducir la variabilidad es el uso de membranas sintéticas, las cuales ayudan a disminuir la variabilidad biológica asociada a la edad, sitio anatómico y género⁴.

2.5. MEMBRANAS SINTÉTICAS.

Las membranas sintéticas están compuestas de fragmentos poliméricos que permiten el paso de componentes; entre los principales se encuentran: policarbonato, polietersulfona, poliacetonitrilo y polipropano²³.

Con base en su composición existen dos tipos de membranas sintéticas que son usadas en los estudios de difusión de fármacos en cámaras de Franz, las cuales son isotrópicas y anisotrópicas. Las isotrópicas por tener una composición y estructura definida son las más utilizadas, debido a que un supuesto de la Ley de Fick establece que el estrato córneo es considerado como una capa homogénea²⁴.

Una membrana recientemente comercializada es Strat-M®. Fue reportada por Joshi y colaboradores en el 2012⁴ y posteriormente por Karadzovska en 2013²⁵, demostrando que el uso de esta membrana como sustituto de la piel humana en los modelos de difusión dérmica, no tiene una variabilidad importante lote a lote, tiene una alta seguridad de que los datos que se obtengan son confiables y no hay una limitación de almacenaje. La membrana está compuesta de múltiples capas de polietersulfona, dando una morfología similar a la piel humana. Aunque los experimentos no se reproducen del todo en condiciones *in vivo*, sobre todo con respecto al metabolismo, distribución dérmica y el paso a torrente sanguíneo, si ofrece una gran ventaja en que las condiciones experimentales se pueden controlar con precisión²⁵.

2.6. COEFICIENTE DE REPARTO Y SOLUBILIDAD.

El coeficiente de reparto (K) en la ley de Fick muestra la importancia que tiene la solubilidad de la sustancia para penetrar la piel, ya que entre más afín sea el compuesto a la fase liposoluble, más fácil será su penetración por difusión pasiva, correlacionándose con la piel debido a la presencia de los lípidos intercelulares en el estrato córneo que le confieren propiedades lipofílicas, muy parecidas a las del n-octanol²⁶.

La constante de difusión representa la cantidad de fármaco que pasa a través de las capas celulares, relacionándose ésta determinación fisicoquímica con lo que pasa *in vivo*²⁷.

2.7. HETEROOTHECA INULOIDES CASS.

Heterotheca inuloides Cass, mejor conocida como “árnica mexicana”, es una planta de gran interés de estudio debido a su amplio uso en la medicina tradicional para el tratamiento de contusiones, procesos inflamatorios y heridas cutáneas^{2,3,1}.

Es una planta herbácea perenne o anual²⁸, sus flores están dispuestas en cabezuela sobre pedúnculos de hasta 8 cm de largo, receptáculo plano o casi plano de unos 2 cm de ancho y desnudo, involucro anchamente campanulado a hemisférico, brácteas numerosas, lineales a subuladas, graduada con las exteriores más cortas, las interiores de 9 mm a 13 mm de largo, pilo-hispida, flores dimorfas y simpétalas de color amarillo, las periféricas femeninas de 25 a 40 lígulas de 8 a 15 mm de largo, las del disco biaxiales tubulares de 40 a 150, los aquenios dimorfos de la flores liguladas triquenas de 2 a 4 mm de largo glabros o poco pubescente, vilano ausente o en forma de corona breve, el disco de las flores obovado u oblanceolados de 2 a 5 mm de largo, seríceos, cerdas o escamita exteriores de 0.3 a 0.6 mm de largo, cerdas interiores del vilano de 4 a 7 mm de largo, blanquecinas o rojiza. Posee olor débil y sabor amargo²⁹ (**Figura 3**).



Figura 3. *Heterotheca inuloides* Cass “Árnica mexicana”.

Se han identificado varios constituyentes como flavonoides, sesquiterpenos, triterpenos y esteroides¹. En el 2010 Rocha-González y colaboradores determinaron el efecto antinociceptivo de los extractos de hexano, metanol, diclorometano y acetato de etilo de las inflorescencias de *H. inuloides*; donde se encontró más activo el hexánico, por lo cual se realizó el fraccionamiento e identificación de los principales componentes, encontrándose el óxido de cariofileno (a), cedreno (b), 7-hidroxi-3,4-dihidrocadalina (c) y 7-hidroxicadalenol (d) (**Figura 4.**). Se demostró que la 7-hidroxi-3,4-dihidrocadalina, es el constituyente activo más potente³.

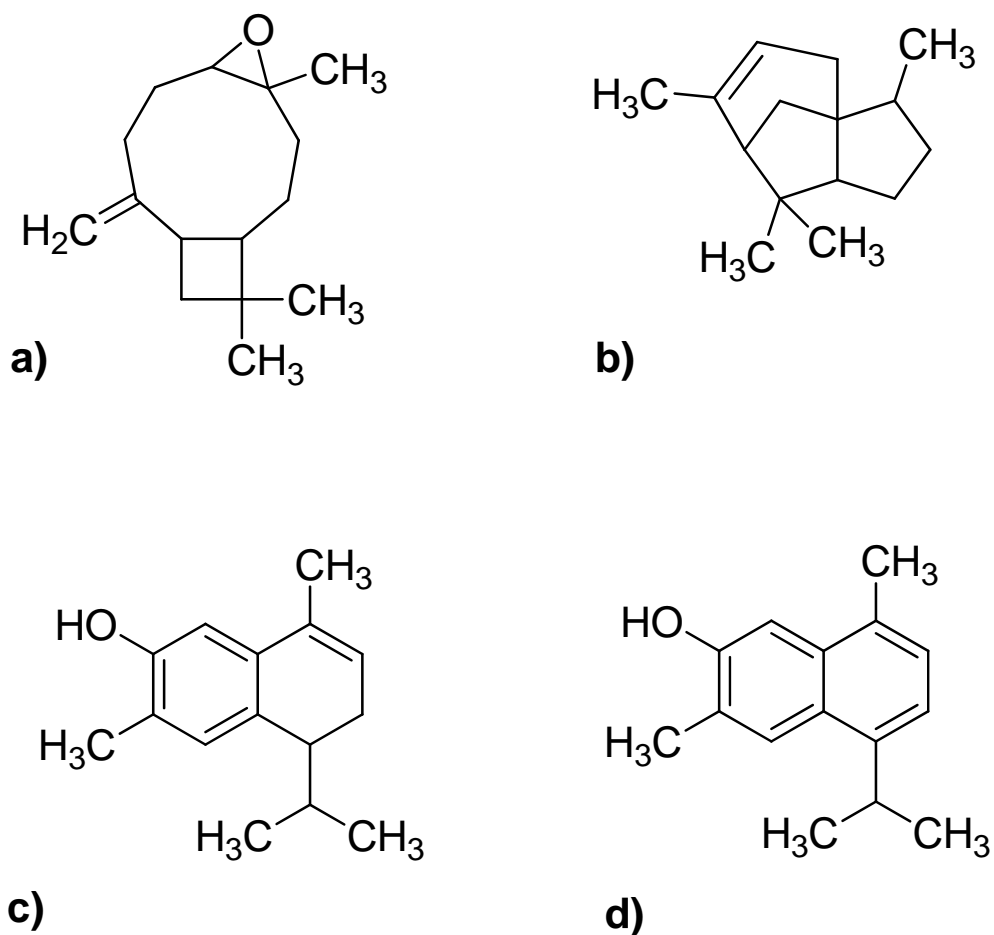


Figura 4. Metabolitos secundarios de *H. inuloides*.

La 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina es un sesquiterpenoide, tiene aspecto de cristales blancos con un punto de fusión de 101-103 ° C²⁹. Adicionalmente se han reportado efectos antimicrobianos y antiinflamatorios².

3. JUSTIFICACIÓN.

La planta *Heterotheca inuloides*, mejor conocida como Árnica mexicana es utilizada en la medicina tradicional en forma de infusiones, decocciones o soluciones hidroalcohólicas sobre la piel, para tratar procesos inflamatorios y de dolor.

En un trabajo previo se demostró que el metabolito secundario 7-hidroxi-3,4-dihidrocadalina, es uno de los compuestos que concede las propiedades antes señaladas, pero se desconocen las propiedades de penetración a través de la piel, por lo cual en este trabajo se abordó este tema para poder correlacionar las propiedades de penetración, de uno de sus componentes activos en un modelo *in vitro* utilizando membranas sintéticas con el uso vernáculo de aplicación tópica de esta planta medicinal.

4. HIPÓTESIS

La 7-hidroxi-3,4-dihidrocadalina, uno de los componentes activos de *Heterotheca inuloides* difundirá eficientemente siguiendo un mecanismo de difusión pasiva en las membranas sintéticas Strat-M®, lo que permitirá relacionar las propiedades de difusión de este compuesto con el uso tópico cutáneo de la planta.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Realizar el estudio de difusión transdérmica *in vitro* de la 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina aislada de *Heterotheca inuloides* (Árnica mexicana) utilizando membranas sintéticas Strat-M® para verificar que sigue un mecanismo de difusión pasiva.

5.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el coeficiente de reparto y la solubilidad de la 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina por métodos analíticos.
- Determinar el modelo cinético que sigue la 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina por un análisis de regresión lineal al realizar estudios de permeabilidad a través de membranas sintéticas.
- Determinar el coeficiente de permeabilidad de la 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina a través de la membrana sintética Strat-M® utilizando la ecuación que describe la primera ley de difusión de Fick.

6. METODOLOGÍA

6.1 MATERIAL QUÍMICO.

Se utilizó el metabolito 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina previamente aislado, caracterizado e identificado mediante RMN ^1H , RMN ^{13}C y EM (**Figuras 8, 9 y 10**) mostrados en el **Anexo 1, 2 y 3**^{30, 31}, n-octanol (Sigma Aldrich), Tris Base Ultrapure (US Biological), Tween 20 y cafeína (Sigma Aldrich).

6.2. MEMBRANAS

Membranas sintéticas Strat-M® (Millipore, Merck, México).

6.3. APARATOS

Se utilizó una cámara de Franz construida de vidrio como se muestra en la **Figura 5**. El compartimento donador tiene una capacidad de 1.5 mL, con un diámetro de contacto con la membrana de 8 mm, el compartimento receptor tiene una capacidad de 4.5 mL.

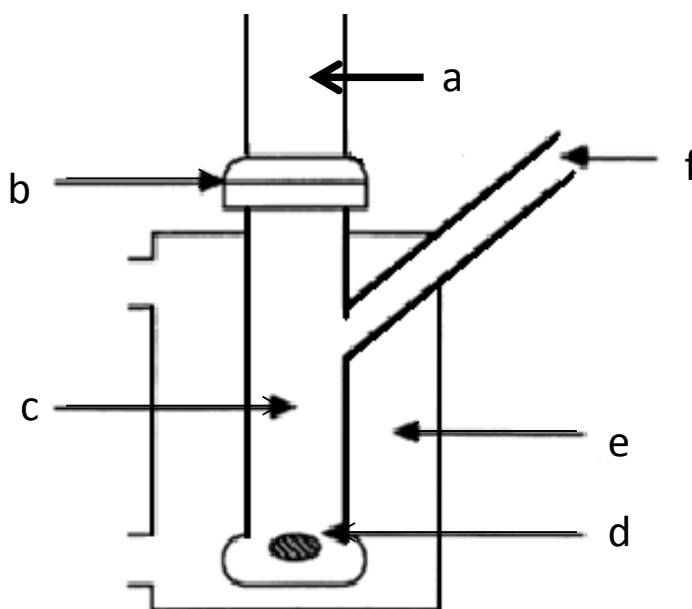


Figura 5. Cámara de Franz. Compartimento donador (a), membrana (b), compartimento receptor (c), barra magnética (d), chaqueta de calentamiento (e) y salida para toma de muestra (f).

Para mantener en agitación se utilizó un agitador magnético y una barra magnética, un baño de agua para mantener la temperatura constante de 37°C.

El análisis de las muestras se realizó en un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución con las siguientes especificaciones:

Bomba Waters Delta 600 (Waters Corp., Milford, MA, USA), Inyector Waters 717 Plus, Controlador automático de gradientes Waters 600, Detector UV con arreglo de diodos Waters 2996, Software Waters Empower Pro.

6.4. DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES FISCOQUÍMICAS (COEFICIENTE DE REPARTO Y SOLUBILIDAD)

La solubilidad aparente se determinó colocando en agitación aproximadamente 5 mg de 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina en una solución amortiguadora de Tris a pH 7.5 manteniendo a 37°C por 24 horas.

El coeficiente de reparto se determinó manteniendo en agitación por 24 horas 1 mL de n-octanol y 1 mL de solución amortiguadora de Tris pH 7.5, para saturar ambos medios a 37°C, después de las 24 horas se adicionó aproximadamente 1 mg de 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina, se continuó con la agitación a la misma temperatura por 24 horas, para su análisis por HPLC (Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución por sus siglas en inglés) separando ambas fases.

6.5. ESTUDIO DE DIFUSIÓN

Para realizar el estudio de permeabilidad se colocó una solución amortiguadora de Tris pH 7.5 (la solución amortiguadora fue preparada de acuerdo a la **FEUM**³²) en el compartimento receptor, mientras que en el compartimento donador se colocó un mililitro de una suspensión de 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina en solución amortiguadora de Tris pH 7.5 (1.8 mg/mL). Entre ambos compartimentos se colocó la membrana sintética Strat-M® (Millipore) con un diámetro de 0.8 cm y un grosor de 30 µm, el estudio se realizó a 37°C y agitación constante.

Se dejó estabilizar la membrana entre los compartimentos a la temperatura y agitación indicadas anteriormente por 30 minutos antes de colocar la suspensión de 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina en el compartimento donador; el muestreo se realizó a los 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 150, 180, 210, 240 minutos tomando 0.5 mL del compartimento receptor y recuperando el volumen.

6.6. CONDICIONES DE ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS POR HPLC.

Las condiciones para el análisis por cromatografía fueron las siguientes:

- Soporte: Columna de acero inoxidable Luna 5 μ C18, 5 μ m (150x4.6 mm).
- Precolumna: LC-18 (Supercol®, tamaño de partícula de 5 μ m).
- Fase móvil: Acetonitrilo grado HPLC.
- Flujo: 1.0 mL/min.
- Detector: UV/VIS ajustado a 220 nm.
- Volumen de la muestra: 10 μ L.
- Temperatura de la columna: 30°C.
- Tiempo de corrida: 7 min.

El análisis de datos se realizó a partir de las áreas bajo la curva del cromatograma, las cuales se convirtieron a concentración (mg/mL), interpolando en una curva con concentraciones conocidas. Posteriormente, se construyó un gráfico de cantidad acumulada (mg) contra el tiempo (horas), para obtener la pendiente, la cual permitió calcular el coeficiente de permeabilidad (**K_p**) a partir de la ecuación de difusión de la primera ley de Fick.

$$J = K_p C_0$$

Donde:

J=Pendiente de la curva correspondiente al flujo de la membrana (mg/cm²h).

k_p= Coeficiente de permeabilidad (cm/h).

C₀= Concentración inicial en el compartimento donador (mg/cm³).

6.7. VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN

La validación del método analítico se realizó siguiendo lo establecido en la Guía de Validación de Métodos Analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos.³³

7. RESULTADOS

7.1. Determinación de propiedades fisicoquímicas

En el **Cuadro 1** se muestran los resultados de la determinación de las propiedades fisicoquímicas de la 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina; se encontró que es un molécula lipófila o altamente soluble en n-octanol a 37°C utilizado como medios n-octanol/disolución amortiguadora de Tris pH 7.5

Cuadro 1. Propiedades fisicoquímicas de 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina: Solubilidad aparente en disolución amortiguadora de Tris pH=7.5 y coeficiente de reparto octanol/disolución amortiguadora de tris pH7.5.

	Solubilidad aparente \pm S.D. (mg/mL) (n=3)	Coficiente de reparto \pm S.D. (n=3)
7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina	0.6056 \pm 0.0055	2.1518 \pm 0.057

7.2. Estudio de difusión *in vitro*.

Se determinó que el coeficiente de permeabilidad (**Kp**) de la 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina fue de 0.1993 \pm 0.0005 cm/h en las primeras dos horas y de 0.0996 \pm 0.0121 cm/h en las siguientes dos horas.

La constante de permeabilidad fue calculada utilizando la ecuación que describe la primera ley de Fick, en la cual es necesario conocer el flujo (pendiente) que tiene la 7-hidroxi-,4-dihidrocajalina al atravesar la membrana, el cual es representado en la **Figura 6**; como se puede observar existe un cambio de pendiente; en las primeras dos horas para la primera parte del gráfico se tiene que es de 0.1107 \pm 0.0003027 mg/cm²h de las 0 a las 2 horas y de 0.05535 \pm 0.01213 mg/cm²h para la segunda parte de este, encontrándose una disminución en la difusión de la 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina a través de la membrana sintética Strat-M®.

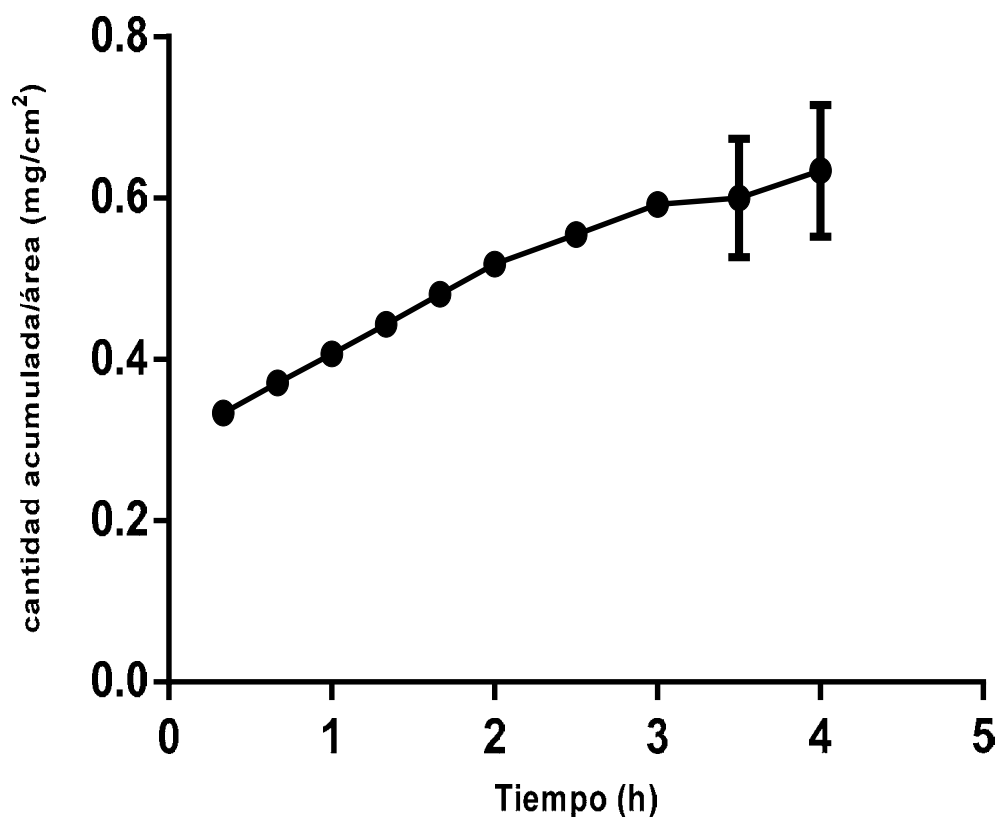


Figura 6. Perfil de difusión de 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina. (n=6 ±S.D)

Para determinar la cinética de 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina en la difusión a través de las membranas se calculó el orden cinético de la concentración remanente (concentración en el compartimento donador a un tiempo), teniendo una mejor correlación para una cinética de Orden 1 como se puede ver en la **Figura 7**, por lo que se dice que es dependiente de la concentración ($\frac{dx}{dt} = f(c)$).

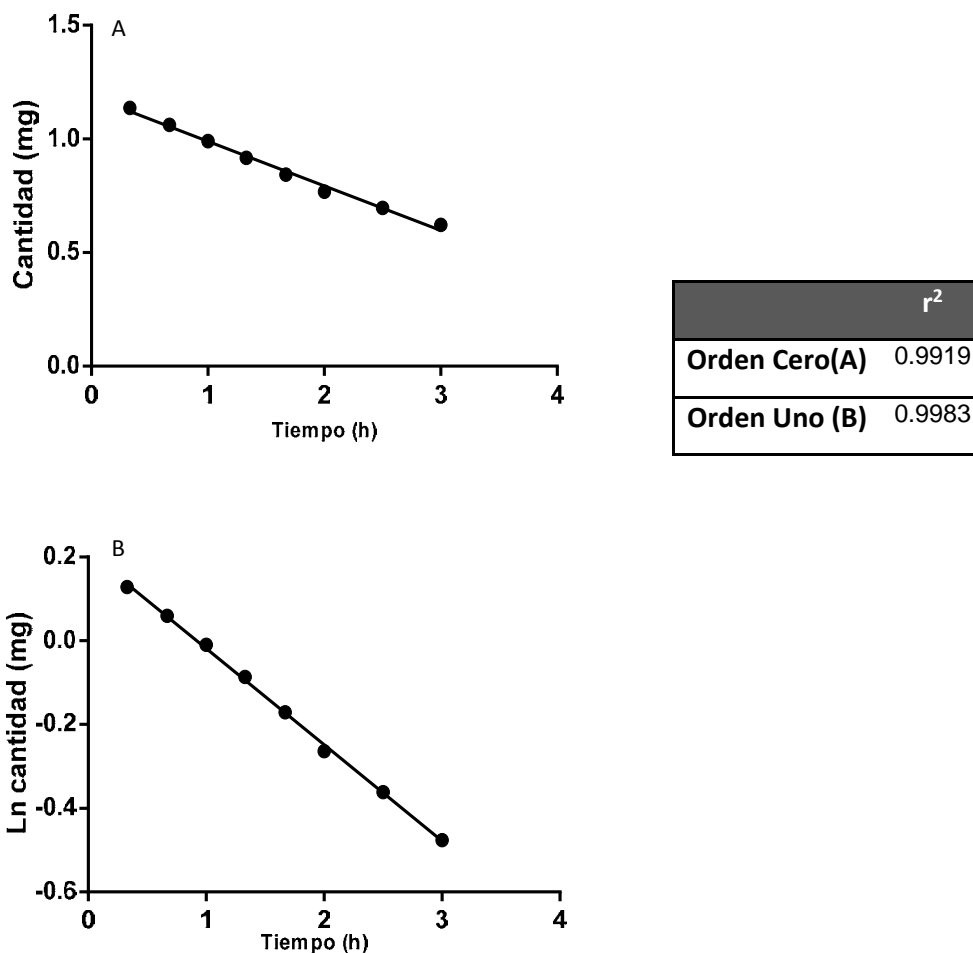


Figura 7. Orden cinético para la difusión de 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina. Panel A cinética de orden cero y Panel B cinética de primer orden. En el recuadro se presenta el coeficiente de correlación.

Se determinó el porcentaje permeado a lo largo del tiempo de experimentación, demostrándose que a las 2 horas a pasado a través de la membrana sintética Strat-M® el 60% de la 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina (**Figura 8**). Con esta relación se utilizaron los modelos de Higuchi y Peppas para ver su ajuste (**Figuras 9 y 10**).

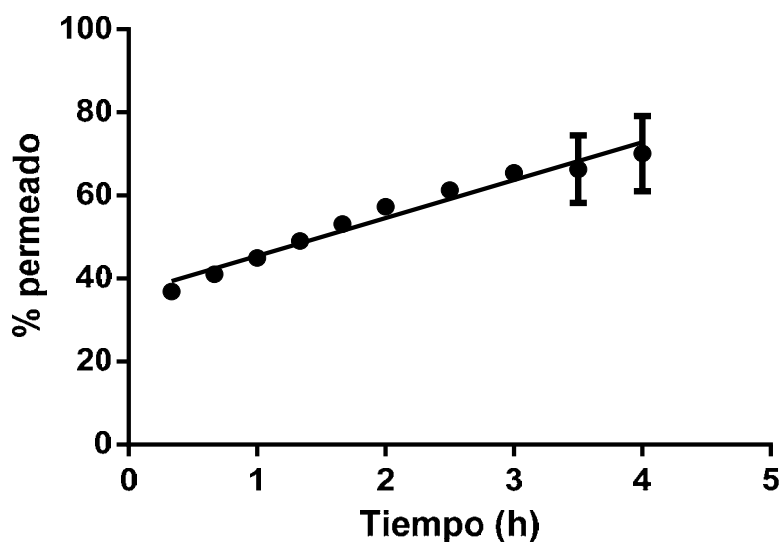


Figura 8. Gráfico del porcentaje permeado en función del tiempo ($n=6 \pm S.D.$).

Se utilizaron los modelos de Higuchi y Peppas para determinar el tipo de difusión que tiene la 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina, demostrando que se tiene una mejor correlación para el de Higuchi.

El modelo de Higuchi (**Figura 9**) presenta una correlación de 0.9842.

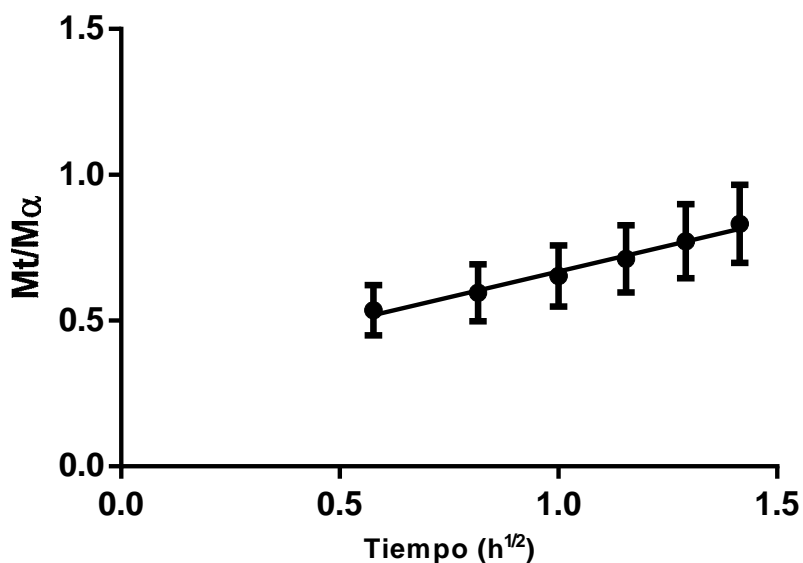


Figura 9. Gráfico de la fracción difundida en función del tiempo siguiendo el modelo de Higuchi. ($n=6 \pm S.D.$)

El modelo de Peppas (**Figura 10**) no se ajusta al no tener una buena correlación (0.9632).

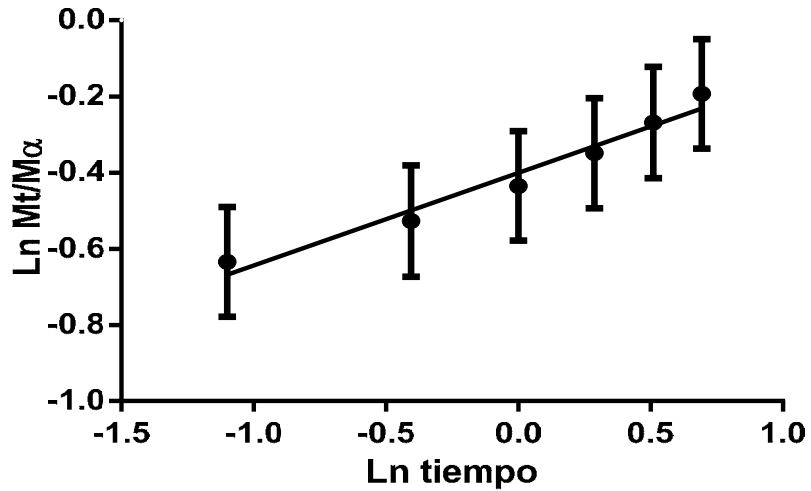


Figura 10. Gráfico de la fracción difundida en función del tiempo siguiendo el modelo de Peppas.

Para verificar la funcionalidad de las membranas Strat-M® se realizó un experimento basado en un trabajo previo⁴; los parámetros determinados fueron el orden cinético de difusión, el flujo y la constante de permeabilidad de la cafeína.

Se determinó que sigue un orden cinético uno, ya que tiene una mejor correlación (**Figura 11**).

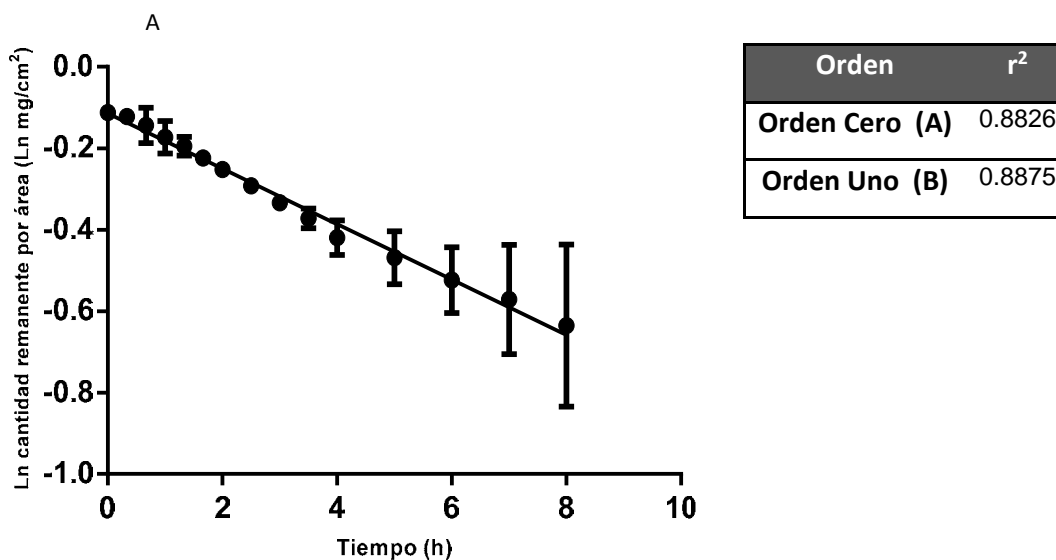


Figura 11. Orden cinético para la difusión de cafeína. Panel A cinética de orden cero y Panel B cinética de primer orden. En el recuadro se presenta el coeficiente de correlación.

Además de identificar el orden cinético se determinó el flujo que tiene la cafeína a través de la membrana Strat-M; y a partir de este parámetro la constante de permeabilidad (**Cuadro 2**).

Cuadro 2. Determinación del flujo y coeficiente de permeabilidad de cafeína.

	Flujo (J) ±S.D. mg/cm ² h	Kp±S.D. cm/h
Cafeína	0.0334±0.0019	0.0418±0.0023

Para saber que seguía una cinética parecida a lo reportado se hizo el gráfico de cantidad permeada por área de exposición en función del tiempo, mostrada en la **Figura 11**.

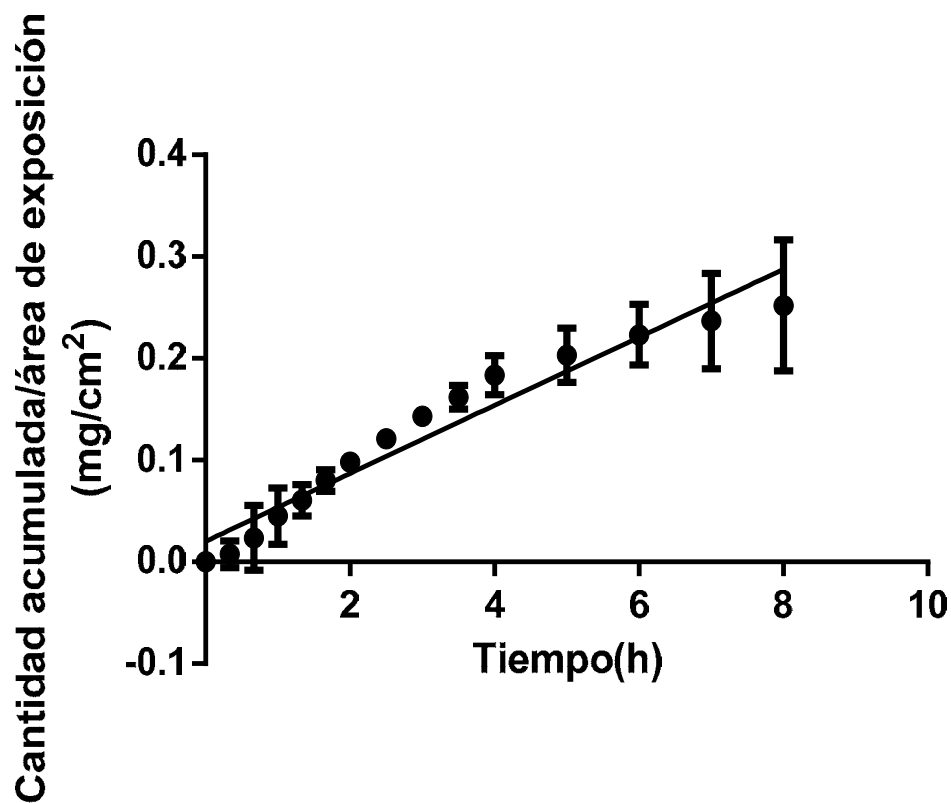


Figura 12. Perfil de difusión de Cafeína.

Para verificar que los resultados obtenidos en la realización de la determinación de la permeabilidad de la 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina fueran confiables se validó el método, mostrándose en el **Cuadro 3** un resumen, incluyendo los criterios de aceptación.

Cuadro 3. Resumen del método de validación para la cuantificación de 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina.

Determinación	Metodología	Criterios de aceptación	Resultados	Conclusión	
Precisión	Repetibilidad	Hacer un mínimo de 3 réplicas a 3 diferentes concentraciones.	C.V. ≤ 2%	C.V.=1.3%	Aceptado
	Exactitud	Se evalúa utilizando un mínimo de seis determinaciones de cada concentración (80, 100 y 120% de la concentración normal de trabajo)	El porcentaje de recuperación debe estar entre el 90 y 100% del valor teórico.	98.9%	Aceptado
	Precisión intermedia	Se determina realizando un mínimo de seis determinaciones al 100% de la concentración esperada. (Diferentes días, analistas y equipo).	C.V. ≤ 2%	C.V.=1.02%	Aceptado
Especificidad	Habilidad de un método para distinguir entre un analito e impurezas, precursores sintéticos, metabólicos o productos de degradación.	Presentar cromatogramas y verificar que no interfieran con la señal del analito.	Anexo 4	Aceptado	
Límite de cuantificación	Es la concentración que proporciona una razón, señal o ruido con una relación 20 a 1 y es menor o igual al 5% de la precisión para lo cual se preparan 3 concentraciones de la sustancia de interés a valores menores o que incluya la especificación del contenido/ valoración; ya sea por dilución o pesada independiente. Simultáneamente preparar 5 blancos y medir la respuesta analítica.	Calcular el límite de cuantificación $LD = (10 \times Sb) b_1$ $r^2 \geq 0.98$	$LD = 0.00482$ mg/mL $r^2 = 0.9912$	Aceptado	
Linealidad	Se adicionará a 3 muestras la cantidad correspondiente al 100% del analito. Seleccionar 2 niveles superiores e inferiores de la concentración correspondiente al 100% y realizar por triplicado.	C.V. ≤ 2% $r^2 \leq 0.98$ % de recobro= 98-102%	C.V.=1.02% $r^2=0.9912$ % de recobro= 98.9%	Aceptado	

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina presentó una cinética de permeabilidad de orden uno con dos coeficientes de permeabilidad; uno de las cero a las dos horas y otro (menor) de las dos a las cuatro horas (**Figura 6**). El primer coeficiente de permeabilidad fue 0.0615 ± 0.003 cm/h y el segundo de 0.0375 ± 0.0067 cm/h, lo que nos indica el cambio de flujo al atravesar la membrana sintética Strat-M®; también se observó que 70% del compuesto difundió a las cuatro horas, aunque esta relación no permite conocer si tiene un efecto terapéutico.

Otros modelos que se utilizaron para explicar matemáticamente la difusión de la 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina fueron el modelo de Higuchi y el modelo de Peppas^{17,18}.

El principal criterio para saber si los resultados de la difusión se ajustaban a los modelos antes mencionados fue el coeficiente de correlación siendo para el modelo de Higuchi de 0.9842 y para el de modelo de Peppas de 0.9627, sugiriendo que sólo se ajusta al modelo de Higuchi.

Como ya se había mencionado la 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina es un sesquiterpenoide, en cuya estructura se encuentra presente un grupo hidroxilo fenólico, dos metilo y un radical isopropilo que debido a sus características definen a la molécula como un ácido débil con un pka de 10.53 (Calculado usando Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V11.02 (© 1994-2013 ACD/Labs)). En el medio receptor (Solución amortiguadora de Tris pH 7.5) la molécula se encuentra en su forma no disociada, lo cual es ideal para favorecer su permeabilidad³⁴. Entre otros factores que favorecen la permeabilidad de una molécula a través de la piel, se encuentran la solubilidad y el coeficiente de reparto, parámetros que fueron calculados en este trabajo.

Es necesario determinar la solubilidad en el medio receptor a utilizar, ya que ésta cambia con el vehículo, modificando el flujo de la solución del compartimento donador al receptor a través de la membrana y la K_p ; además que, para la realización del experimento de permeabilidad se deben asumir condiciones Sink (el fármaco se encuentra a no más del 10% de la concentración de su saturación en el medio), por lo que al saber que la solubilidad es de 0.6 mg/mL y considerar el volumen total de la cámara se pudo conocer la concentración óptima a la temperatura de trabajo (37°C), y

poder asegurar que se encontraba en condiciones Sink en la solución amortiguadora de Tris pH 7.5.

El siguiente parámetro calculado fue el coeficiente de reparto, que es una propiedad fisicoquímica determinada para evaluar las características lipofílicas o hidrofílicas de una molécula. De acuerdo a la determinación de este parámetro la 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina es una molécula lipofílica, al tener un coeficiente de reparto octanol/solución amortiguadora de Tris pH 7.5 de 2.15 (**Cuadro 1**), ya que se ha descrito que una molécula con un coeficiente de reparto igual a 2, es una molécula ideal para permear a través de la piel, ya que si esta es más alta puede quedar retenida en la membrana, mientras que si es menos lipófila entonces tendrá menos afinidad a los lípidos y se dificultará su difusión a través del estrato córneo³⁵. Por lo anteriormente expuesto, se asume que la 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina está en el intervalo de las moléculas capaces de difundir a través de la piel.

Se realizó la validación del método de cuantificación (**Anexo 4**) utilizando como medio la solución amortiguadora de Tris pH=7.5, encontrándose todos los parámetros aceptables de acuerdo con la Guía de Validación de Métodos Analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos.

9. CONCLUSIÓN

El coeficiente de reparto determinado para la 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina fue de 2.15, mientras que la solubilidad de 0.6056 indicando que cumple con las propiedades para poder atravesar la membrana sintética.

El orden cinético que sigue el metabolito al pasar a través de la membrana sintética es de primer orden.

El coeficiente de permeabilidad de en las primera dos horas es de 0.7036 cm/h y en las siguientes dos de 0.2409 cm/h con un paso del metabolito del 70%, considerándose una difusión eficiente.

La 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina sigue una difusión pasiva a través de las membranas sintéticas y por ende en la piel.

10. PERSPECTIVAS

Con base en los resultados obtenidos de este trabajo se proponen lo s:

- Utilizar diferentes concentraciones de 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina, evaluando si existe una diferencia en el coeficiente de permeabilidad.
- Realizar estudios con otros disolventes para solubilizar la 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina.
- Realizar estudios de permeabilidad de distintas formulaciones farmacéuticas de uso tópico (Gel, ungüento, parche, pomada y emulsión), que contengan la 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina.
- Realizar experimentos *in vivo* que nos permitan hacer una correlación con el trabajo presentado.

11. REFERENCIAS.

1. Coballase-Urrutia E, Pedraza-Chaverri J, Cárdenas-Rodríguez N, et al. Hepatoprotective effect of acetic and methanolic extracts of *Heterotheca inuloides* against CCl₄-induced toxicity in rats. *Exp Toxicol Pathol*. 2011;63(4):363-70. doi:10.1016/j.etp.2010.02.012.
2. Kubo Isao, Kyoko Ishiguro, Swapan K. Chaudhuri, Yumi Kubo, Yolanda Sanchez TO. Short reports a plant growth inhibitory sesquiterpenoid from *heterotheca inuloides*. 1995;38(2):553-554.
3. Rocha-González HI, Blaisdell-López E, Granados-Soto V, Navarrete A. Antinociceptive effect of 7-hydroxy-3,4-dihydrocajalina isolated from *Heterotheca inuloides*: role of peripheral 5-HT₁ serotonergic receptors. *Eur J Pharmacol*. 2010;649(1-3):154-60. doi:10.1016/j.ejphar.2010.09.022.
4. Jhosi, Vivek; PhD; Brewster DCP. ISSUE INTERVIEW WITH In Vitro Diffusion Studies in Transdermal Research: A Synthetic Membrane Model in Place of Human Skin. 2012;12(2).
5. Williams AC, Barry BW. Penetration enhancers. *Adv Drug Deliv Rev*. 2004;56(5):603-18. doi:10.1016/j.addr.2003.10.025.
6. Janůšová B, Zbytovská J, Lorenc P, et al. Effect of ceramide acyl chain length on skin permeability and thermotropic phase behavior of model stratum corneum lipid membranes. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1811(3):129-37. doi:10.1016/j.bbailip.2010.12.003.
7. Le Vay D. *Anatomía Y Fisiología Humana*. Segunda ed. Paidotribo; 2004:288-290.
8. Segre J. Complex redundancy to build a simple epidermal permeability barrier. *Curr Opin Cell Biol*. 2003;15(6):776-782. doi:10.1016/j.ceb.2003.10.001.
9. Eriksen P. L.; De Lara S.; Álvarez A.; Galarza G.; *Anatomía Humana*. segunda. México: UNAM; 2002:19-21.
10. Venus M, Waterman J, McNab I. Basic physiology of the skin. *Surg*. 2011;29(10):471-474. doi:10.1016/j.mpsur.2011.06.010.
11. Menon GK, Cleary GW, Lane ME. The structure and function of the stratum corneum. *Int J Pharm*. 2012;435(1):3-9. doi:10.1016/j.ijpharm.2012.06.005.
12. Lai-Cheong JE, McGrath J a. Structure and function of skin, hair and nails. *Medicine (Baltimore)*. 2013;41(6):317-320. doi:10.1016/j.mpmed.2013.04.017.
13. E. Bergstorm K. G. SB. Principios del tratamiento tópico. In: Al. KW et., ed. *Dermatología En Medicina General*. séptima. Buena Aires: Editorial Panamericana; 2009:2097-2102.

14. Moser K, Kriwet K, Naik A, Kalia YN, Guy RH. Passive skin penetration enhancement and its quanti[®] cation in vitro. 2001;52.
15. Couto A, Fernandes R, Cordeiro MNS, Reis SS, Ribeiro RT, Pessoa AM. Dermic diffusion and stratum corneum: a state of the art review of mathematical models. *J Control Release*. 2014;177:74-83. doi:10.1016/j.jconrel.2013.12.005.
16. Sinkó B, Garrigues TM, Balogh GT, et al. Skin-PAMPA: a new method for fast prediction of skin penetration. *Eur J Pharm Sci*. 2012;45(5):698-707. doi:10.1016/j.ejps.2012.01.011.
17. Paul DR. Elaborations on the Higuchi model for drug delivery. *Int J Pharm*. 2011;418(1):13-17. doi:10.1016/j.ijpharm.2010.10.037.
18. Peppas NA, Narasimhan B. Mathematical models in drug delivery: How modeling has shaped the way we design new drug delivery systems ☆. *J Control Release*. 2014;190:75-81. doi:10.1016/j.jconrel.2014.06.041.
19. Alexander A, Dwivedi S, Ajazuddin, et al. Approaches for breaking the barriers of drug permeation through transdermal drug delivery. *J Control Release*. 2012;164(1):26-40. doi:10.1016/j.jconrel.2012.09.017.
20. Baert B, Boonen J, Burvenich C, et al. A new discriminative criterion for the development of Franz diffusion tests for transdermal pharmaceuticals. *J Pharm Pharm Sci*. 2010;13(2):218-30.
21. Selmin F, Cilurzo F, Aluigi A, Franzè S, Minghetti P. Regenerated keratin membrane to match the in vitro drug diffusion through human epidermis. *Results Pharma Sci*. 2012;2:72-78. doi:10.1016/j.rinphs.2012.10.001.
22. Huong SP, Bun H, Fourneron J-D, Reynier J-P, Andrieu V. Use of various models for in vitro percutaneous absorption studies of ultraviolet filters. *Ski Res Technol*. 2009;15(3):253-261. doi:10.1111/j.1600-0846.2009.00368.x.
23. Yamaguchi K, Mitsui T, Aso Y, Sugibayashi K. Analysis of in vitro skin permeation of 22-oxacalcitriol from ointments based on a two- or three-layer diffusion model considering diffusivity in a vehicle. *Int J Pharm*. 2007;336(2):310-8. doi:10.1016/j.ijpharm.2006.12.017.
24. Ng S-F, Rouse JJ, Sanderson FD, Eccleston GM. The relevance of polymeric synthetic membranes in topical formulation assessment and drug diffusion study. *Arch Pharm Res*. 2012;35(4):579-93. doi:10.1007/s12272-012-0401-7.
25. Karadzovska D, Riviere JE. Assessing vehicle effects on skin absorption using artificial membrane assays. *Eur J Pharm Sci*. 2013;50(5):569-76. doi:10.1016/j.ejps.2013.02.020.

26. Saïd a, Makki S, Muret P, Humbert P, Millet J. Psoralens percutaneous permeation across the human whole skin and the epidermis in respect to their polarity (in vitro study). *J Dermatol Sci*. 1997;14(2):136-44.
27. Camenisch G, Folkers G, Waterbeemd H Van De. journal of pharmaceutics Comparison of passive drug transport through Caco-2 cells and artificial membranes. *Int J Pharm*. 1997;147.
28. Gené RM, Segura L, Adzet T, Marin E, Iglesias J. *Heterotheca inuloides*: anti-inflammatory and analgesic effect. *J Ethnopharmacol*. 1998;60(2):157-62.
29. *Farmacopea Herbolaria de Los Estados Unidos Mexicanos*. Segunda. México: Secretaria de Salud; 2013:167-168.
30. Bohlman, Ferdinand; Zdero C. U_ber die Inhaltsstoffe von *Heterotheca inuloides* Cass.pdf. *Chem Ber*. 1967;109(1):2021-2025.
31. Kubo, Isao; Muroi Hisae; kubo, Aya; Chaudhuri SK. SYOT. Antimicrobial Agents from *Heterotheca inuolides*. *Planta Med*. 1994;60(1):218-221.
32. *Farmacopea de Los Estados Unidos Mexicanos*. Secretaria de Salud; 2011.
33. *Guía de Validación de Métodos Analíticos*. México: Colegio Nacional de QFB's; 2002.
34. Tam KY, Avdeef A, Tsinman O, Sun N. The permeation of amphoteric drugs through artificial membranes--an in combo absorption model based on paracellular and transmembrane permeability. *J Med Chem*. 2010;53(1):392-401. doi:10.1021/jm901421c.
35. Abdulkarim MF, Abdullah GZ, Chitneni M, et al. Topical piroxicam in vitro release and in vivo anti-inflammatory and analgesic effects from palm oil esters-based nanocream. *Int J Nanomedicine*. 2010;5:915-24. doi:10.2147/IJN.S13305.

6. ANEXOS

ANEXO 1. ESPECTRO DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^1H

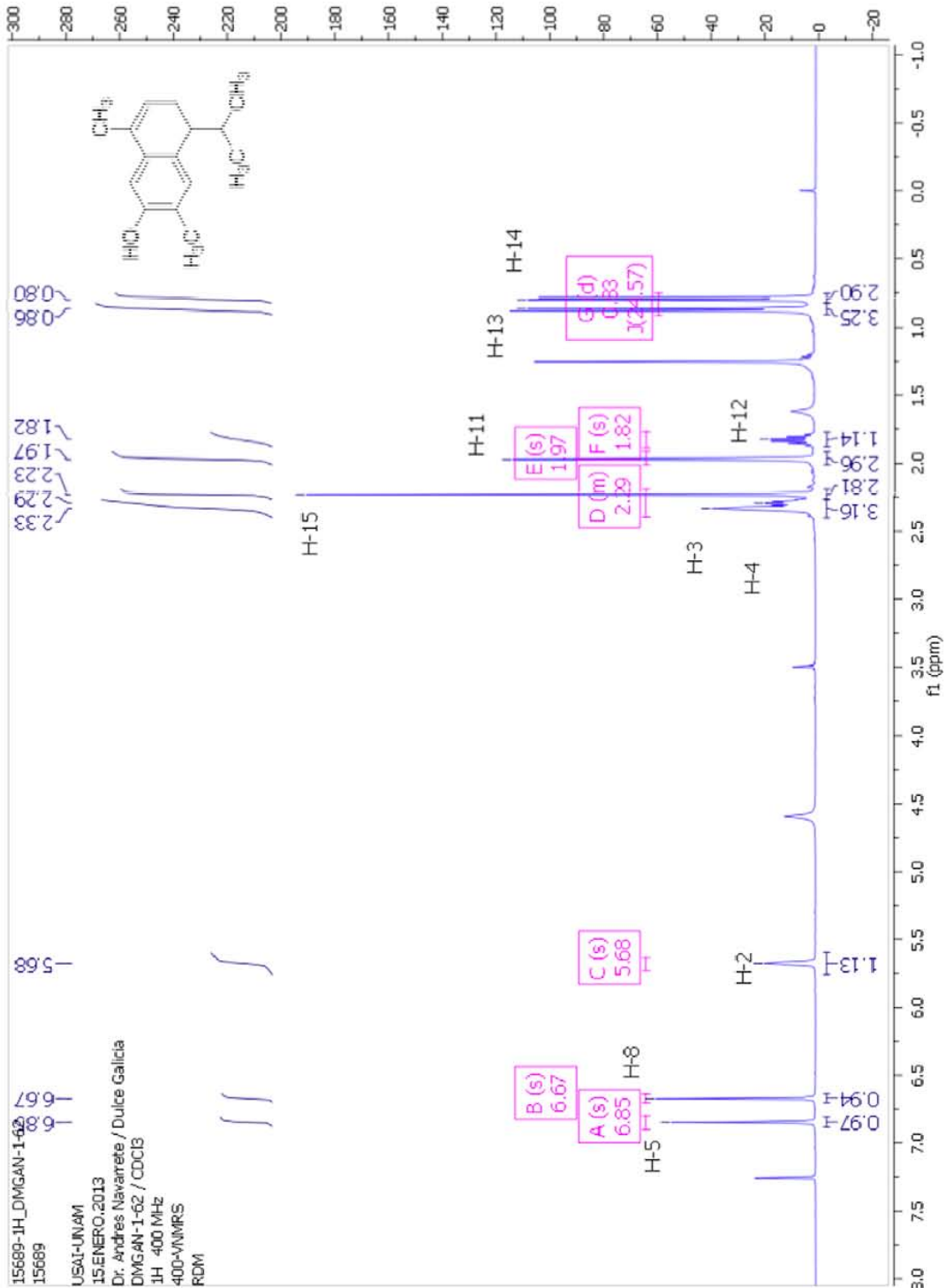


Figura 13. Espectro de RMN ^1H de 7-hidroxi-3,4-dihidrocadalina (400MHz, CDCl_3) de una muestra de. δ 5.68 (s, H-2); 2.29 (m, H-3); 6.85 (s, H-5); 6.07 (s, H-8); 1.97 (s, H-11); 1.82 (s, H-12); 0.83 (d, J=2.57, H-13)³⁰

6.6. ANEXO 2. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear ^{13}C .

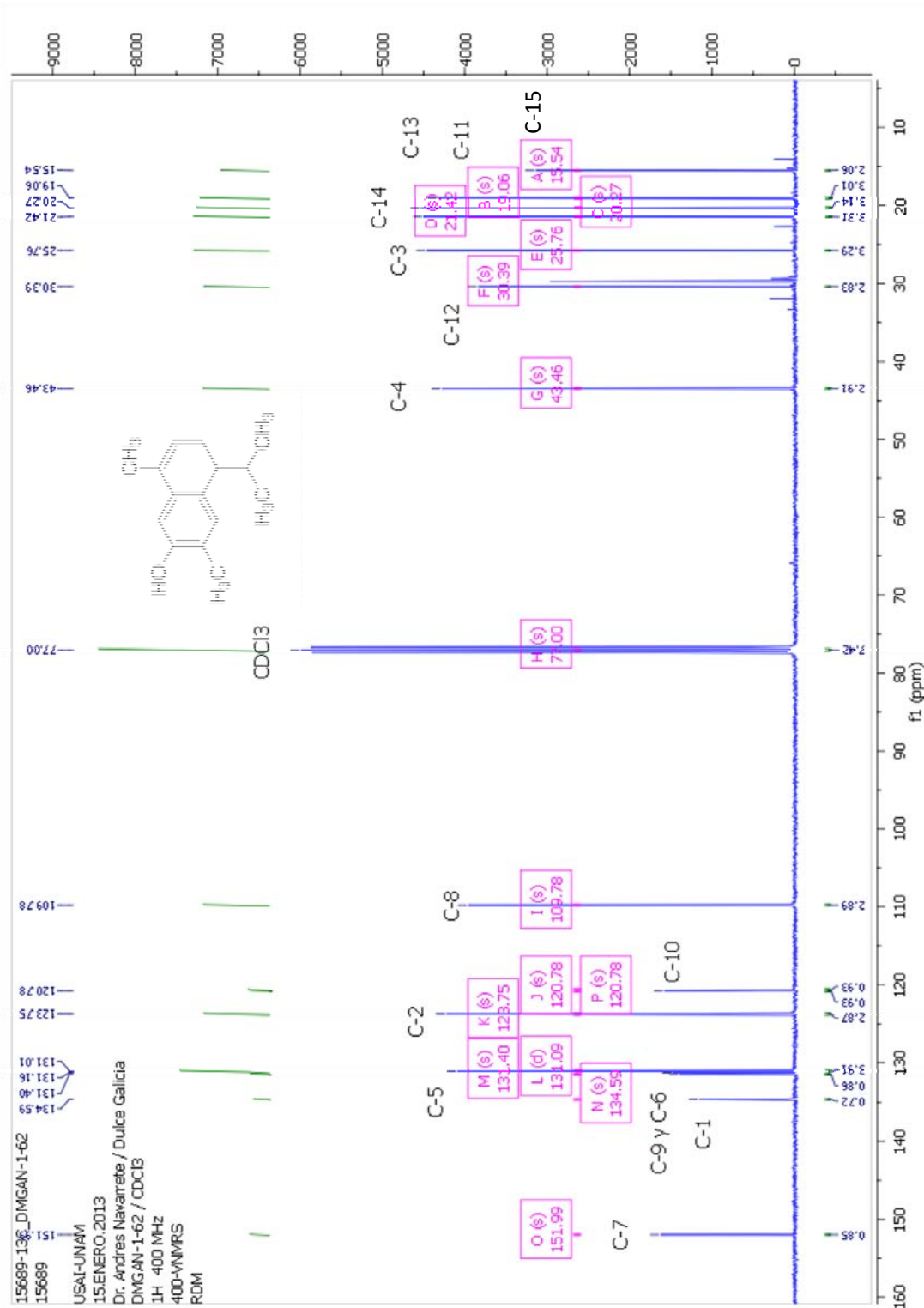


Figura 14. Espectro de RMN ^{13}C de 7hidroxi-4-dihidroacetalina (100MHz, CDCl₃) 151.99 (s, C-1), 131.40 (d, J=15.48 Hz, C-6; C-9), 130.09 (s, C-5), 123.75 (s, C-2), 120.78 (s, C-10), 109.78 (s, C-8), 43.46 (s, C-4), 30.39 (s, C-12), 25.76 (s, C-3), 21.4 (s, C-14), 20.27 (s, C-13), 19.05 (s, C-11), 15.54 (s, C-15).²

6.7. ANEXO 3. ESPECTRO DE MASAS DE 7-HIDROXI-3,4-DIHDROACETALINA

D:\Xcalibur\data\USA\ID\OT8933_1

1/16/2013 6:26:32 PM

DMGAN-1-62

OPERADOR: Margarita Guzman

OT8933_1 #2-3 RT: 0.21-0.41 AV: 2 NL: 1.93E7

T: + c EI Full ms [49.50-800.50]

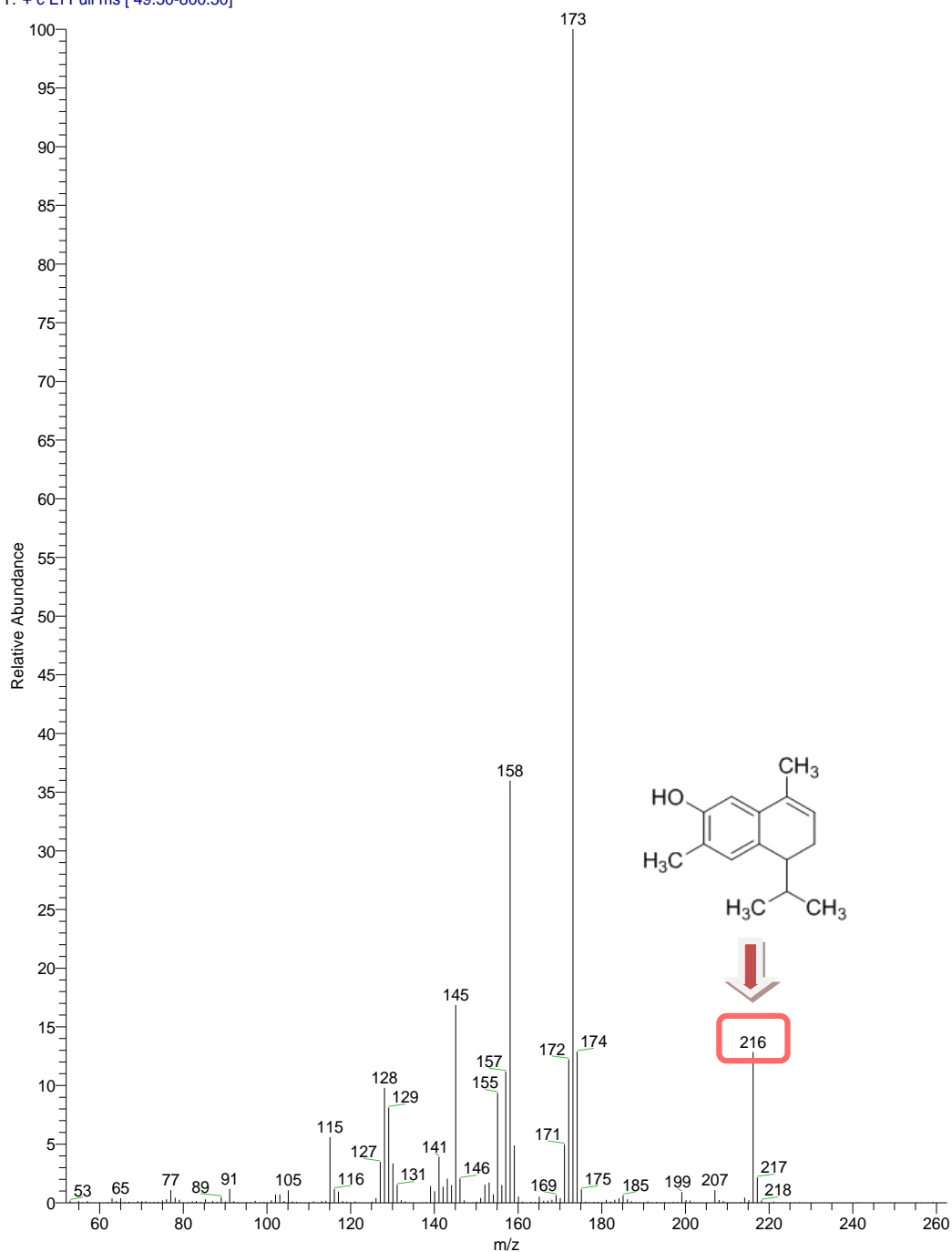


Figura 15. Espectro de masas de 7-hidroxi-3,4-dihidrocadalina EM: m/z (%) [M]⁺: 216(14), 173 (100), 158 (37), 145 (18), 128 (10)².

6.8. ANEXO 4. Validación del método para 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina.

Selectividad

La Selectividad se evaluó obteniendo el Cromatograma del medio receptor (Buffer de Tris pH=7.5) y los demás componentes de la muestra que corresponde al blanco a fin de verificar la ausencia de interferencia a la longitud de onda establecida para el estudio (220 nm).

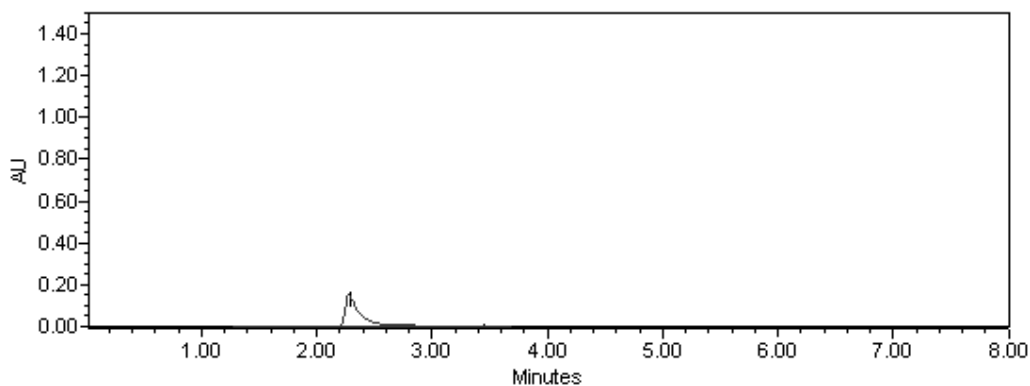


Figura 16. Cromatograma del blanco.

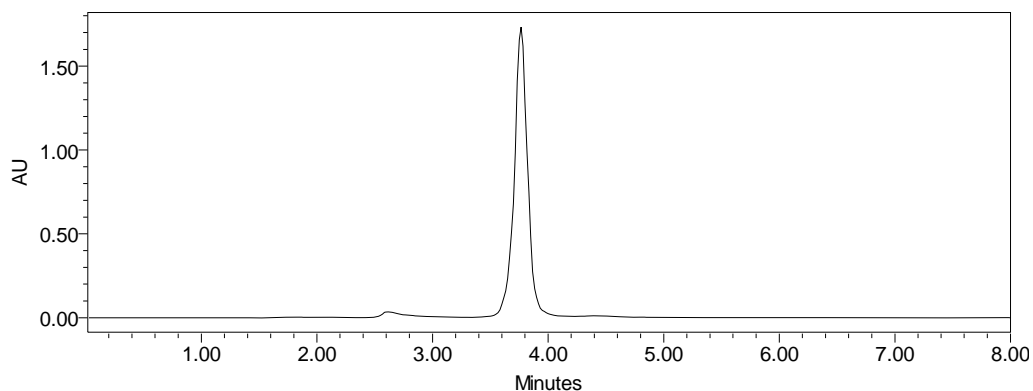


Figura 17. Cromatograma de 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina.

Como se puede ver en las **Figuras 15** y **16**, el tiempo de retención en una lectura de 220 nm de la 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina es de 3.54 minutos mientras que la señal que corresponde al blanco a la misma longitud de onda, no se nota una señal, por lo que se puede decir que el método es selectivo.

Linealidad

Se preparó una curva de calibración de 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina en una solución amortiguadora de Tris pH=7.5 a partir de una solución Stock, incluyendo un blanco y 6 diferentes concentraciones (**Cuadro 4**).

Cuadro 4. Curva de calibración de 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina.

Concentración (mg/mL)	1 Área	2 Área	3 Área	4 Área	5 Área	6 Área	Error estándar	Error absoluto medio
0.8512	9790378	9790378	9790378	9502406	9502406	9502406	9646392	64392.5
0.6810	8327162	8209773	8395982	8149075	8000448	8237455	8219983	56596.84
0.5448	6180343	6260639	6138743	6109238	6269445	6137680	6182682	27664.910
0.4086	3746413	3680635	3746413	3797136	3865232	3824463	3776715	26832.78
0.2043	939744	957011	961615	933302	946772	934475	945486.5	4821.088
0.1362	106305	105489	105309	152928	156729	158246	130834.3	11263.04

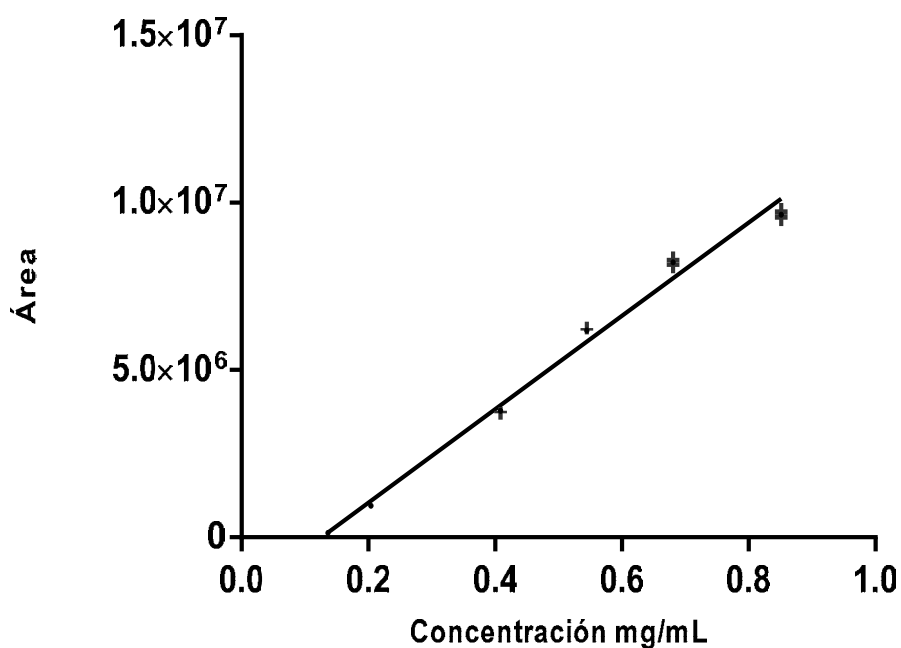


Figura 18. Curva de Calibración del sistema de 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina.

Cuadro 5. ANOVA de la linealidad

Fuente	Σ cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	Razón F	Valor P
Tratamiento	3.428X10 ¹⁰	5	6.857X10 ⁹	F (1.591, 7.956)= 0.7286	P = 0.4819
Individual	4.488X10 ¹⁴	5	8.976X10 ¹³	F(5, 25)= 9538	P< 0.0001
Residuo	2.353X 10 ¹¹	25	9.411X10 ⁹		
Total (Corr.)	4.491X10 ¹⁴	35			

Coefficiente de correlación= 0.9912

Ecuación de la línea recta (Y=1.395X10⁷*X-1.754X10⁶)

Precisión del método

A partir de los datos de linealidad, se evaluó la precisión intra-laboratorio e inter-día, al determinar el C.V., del 100% de la concentración, por triplicado procesadas dos días.

Cuadro 6. Precisión del método de cuantificación de 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina.

Analista/día	C (mg/mL)	1	2	3	Media (x10 ⁶)	S.D.	C.V. %
1 / 1	0.5448	6180343	6260639	6138743	6.193	61963	1.0
2 / 1	0.5396	6269445	6223745	6109238	6.201	82529	1.33
1 / 2	0.5384	6109238	6269445	6137680	6.172	85476	1.38
2 / 2	0.5402	6180343	6269445	6095982	6.182	86742	1.40

C.V.≤2

Cuadro 7. ANOVA de la reproducibilidad del método.

	Σ cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	Razón F	Valor P
Modelo	1.430x10 ⁹	3	4.768x10 ⁸	F (3, 8) = 0.07485	P = 0.9718
Residuo	5.096x10 ¹⁰	8	6.370x10 ⁹		
Total (Corr.)	5.239x10 ¹⁰	11			

No se encuentra diferencia entre los analistas y el día, por lo que se dice que el método es reproducible.

Repetibilidad

Se prepararon tres concentraciones de 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina en buffer de Tris pH 7.5 con 3 repeticiones cada uno.

Cuadro 8. Repetibilidad del método de cuantificación de 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina.

Concentración (mg/mL)	1 Área	2 Área	3 Área	Media	S.D.	C.V. %
0.5384	6109238	6269445	6137680	6.172x10 ⁶	85476	1.38
0.4038	3797136	3865232	3824463	3.829x10 ⁶	34268	0.89
0.2019	933302	946772	934475	938183	7461	0.80

Cuadro 9. ANOVA de la repetibilidad del método.

Fuente	∑cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	Razón F	Valor P
Modelo	4.124x10 ¹³	2	2.062x10 ¹³	F (2, 6) = 7247	P < 0.0001
Residuo	1.707x10 ¹⁰	6	2.845x10 ⁹		
Total (Corr.)	4.126x10 ¹³	8			

Al realizar una prueba de Brown-Forsythe no se encuentra una diferencia entre las áreas por lo que se dice que el método es repetible.

Exactitud

La exactitud se evaluó mediante el recobro de 3 diferentes concentraciones de 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina, las cuales se analizaron por sextuplicado. Se determinó la concentración experimental (C_{exp}) mediante la interpolación en la curva de calibración, comparándose con la concentración teórica (C_{teo}) a fin de determinar el % recuperado.

Cuadro 10. Exactitud del método para la cuantificación de 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina.

C (mg/mL)	% Recobro						Media	S.D.	C.V. %
	1	2	3	4	5	6			
0.8412	98.5	98.5	98.5	98.5	98.5	98.5	98.49	0.0104	0.01
0.5384	98.1	100.2	98.4	98.9	100.0	98.5	99.03	0.8849	0.89
0.4038	99.9	99.1	98.6	98.6	99.1	100.0	99.18	0.6253	0.63

Límites

El límite de cuantificación (LOQ) se calculó en base a la desviación estándar de la respuesta (σ) y la pendiente de la curva de calibración (m).

$$LOQ = \frac{10\sigma}{m} = \frac{10(67208)}{139500000} = 0.00482\text{mg/mL}$$

Para la cuantificación de cafeína en el estudio de difusión, se realizó una curva estándar (**Figura 19**) con la cual interpolando nos permitió conocer la concentración difundida. Se encontró un coeficiente de correlación (r^2) de 0.9892 y una ecuación de la línea recta igual a $Y=1.882 \times 10^6 \cdot X + 895964$.

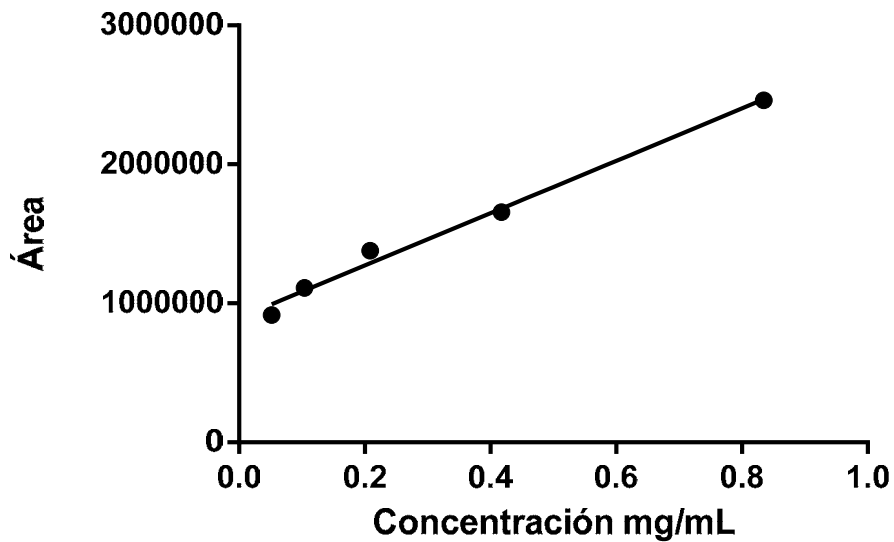


Figura 19. Curva estándar de cafeína.