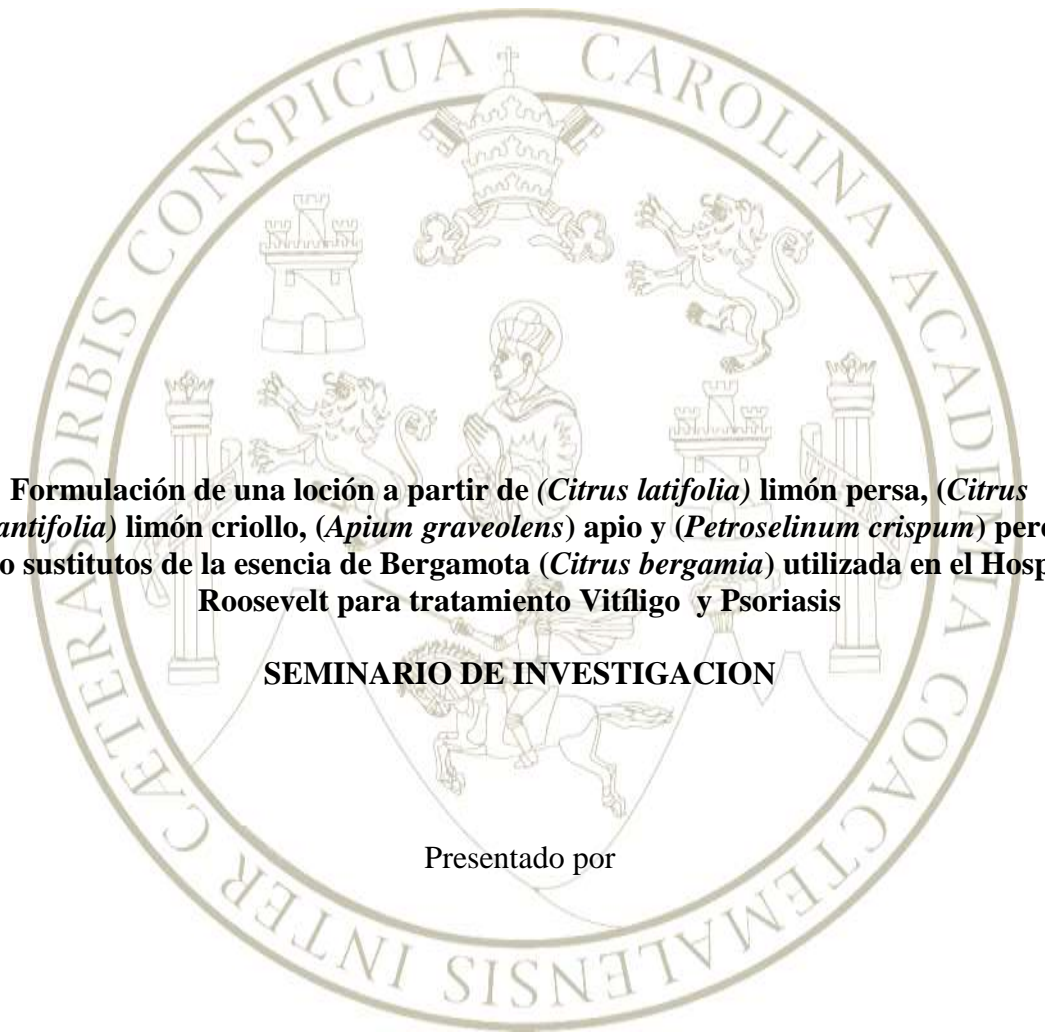


**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a large, circular emblem in the background. It features a central figure of a seated man with a halo, surrounded by various symbols including a crown, a lion, and architectural elements. The Latin motto "CETERA ORBIS CONSPICUA CAROLINA ACCADIA COACTEMALENSIS INTER" is inscribed around the perimeter of the seal.

Formulación de una loción a partir de (*Citrus latifolia*) limón persa, (*Citrus aurantifolia*) limón criollo, (*Apium graveolens*) apio y (*Petroselinum crispum*) perejil, como sustitutos de la esencia de Bergamota (*Citrus bergamia*) utilizada en el Hospital Roosevelt para tratamiento Vitíligo y Psoriasis

SEMINARIO DE INVESTIGACION


Presentado por

**NATHALIE LUCIA RAQUEL ALVAREZ HERNÁNDEZ
ALEJANDRA BETSABÉ LÓPEZ MORALES
SOFÍA MAGNOLIA MARROQUÍN TINTÍ**

**PARA OPTAR AL TÍTULO DE
QUÍMICAS FARMACÉUTICAS**

GUATEMALA, ABRIL DE 2,015

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**



Formulación de una loción a partir de (*Citrus latifolia*) limón persa, (*Citrus aurantifolia*) limón criollo, (*Apium graveolens*) apio y (*Petroselinum crispum*) perejil, como sustitutos de la esencia de Bergamota (*Citrus bergamia*) utilizada en el Hospital Roosevelt para tratamiento Vitíligo y Psoriasis

**NATHALIE LUCIA RAQUEL ALVAREZ HERNANDEZ
ALEJANDRA BETSABÉ LÓPEZ MORALES
SOFÍA MAGNOLIA MARROQUÍN TINTÍ**

GUATEMALA, ABRIL DE 2,015

JUNTA DIRECTIVA

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda, Ph.D.	Decano
Lic. Julieta Roca de Ariza, M.A.	Secretario
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal I
Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares	Vocal II
Lic. Rodrigo Jose Vargas Rosales	Vocal III
Br. Michael Javier Mó Leal	Vocal IV
Br. Blanqui Eunice Flores De León	Vocal V

Acto que Dedico, Nathalie Alvarez

- A Dios:** Por regalarme la vida y la bendición de cumplir esta gran meta y sueño y poder compartirlo con las personas que amo. Por nunca abandonarme y por demostrarme día con día que soy una de sus hijas predilectas. A la Virgen por ser mi protectora y darme fuerzas para luchar siempre.
- A mi papa:** Norberto Alvarez gracias papi por siempre creer en mi y por motivarme a ser una mejor persona y una mejor profesional, por su ejemplo de lucha y de amor a su profesión.
- A mi mama:** Martha Hernández gracias a la mujer más luchadora que conozco, a la que nunca se cansa de luchar por sus hijos, que siempre esta para escucharme y aconsejarme. Gracias mami por nunca dejar de buscar la felicidad de todos, por ser el ejemplo a seguir de mujer independiente y llena de amor. La amo.
- A mis hermanos:** Cory, Omar, Chayto, Nestor, Cyntia y Mónica, gracias por ser mis compañeros de vida, y mis compañeros de mil batallas, a cada uno por ser mi felicidad y mi orgullo. Por ser el apoyo tanto económico como moral a todas mis locuras y mis sueños. Son los mejores hermanos del mundo.
- A mis sobrinos:** Andrés, Josué, Marian, Javier y Sofy. Son el motor de vida, la fuente de mi felicidad y alegría en todo momento. Gracias por hacerme la tía más feliz y orgullosa que pueda existir.
- A mis cuñados:** Hector, Jannina, Olguita y Gerson, gracias por aceptar a mis hermanos tal y como son, por quererlos y quererme a mi y a toda mi familia a pesar de todo. Y por luchar junto a nosotros por seguir siendo la gran familia que somos.
- A mis abuelitos:** Papa Chalio (Q.E.P.D) y Mama Maruca, gracias por ser el más grande ejemplo de amor que tengo en la vida. Y ahora Papa Chalio por ser nuestro gran ángel guardian junto a mi abuelito Felipe Alvarez y a mi abuelita Antolina Capir.
- A mis tios, tias y primos:** Gracias por nunca abandonarnos y siempre estar junto a nosotros, por consentirnos y por ser parte de la familia más bonita y unida que Dios me pudo haber regalado.
- A mis amigos:** Mis amigos de promoción, a los de toda la vida, y a los del trabajo por compartir conmigo esta gran alegría por haber conseguido alcanzar este gran sueño. En especial a Sofy y Ale, por haberme aceptado en su equipo, por ser unas grandes amigas y tenerme paciencia. Y a Nereida por haber sido la cuarta integrante de nuestro equipo.

Acto que Dedico, Alejandra López

A Dios, mi padre:

Por haber creado la ciencia, y nutrirme con conocimiento y sabiduría, y por darme la oportunidad de superarme cada día, a través de mis estudios y los excelentes líderes y profesores universitarios que puso en mi camino, para que nutrieran mi futuro y me encaminaran a ser lo que siempre he deseado, una Licenciada en Química Farmacéutica. Gracias a Dios por todo lo que me rodea y por haberme creado y mantenerme viva.

A mis dos madres Irma Consuelo López Morales y Maria Consuelo Morales Marroquín:

Por ser siempre el mejor ejemplo de honestidad, responsabilidad, valentía y todo lo bueno en mi hogar, y sembrar en mí buenos valores. Porque se limitaron en sus necesidades personales, para darme siempre lo mejor, las amaré toda mi vida, y mi labor de profesional será dedicada siempre a ustedes.

A mi padre, mis hermanos, cuñado y sobrinos:

Gracias por hacer tan feliz mi vida, por apoyarme, amarme, y estar siempre pendientes de mí, los amo, y espero darles un buen ejemplo siempre.

A mis compañeros de seminario, padrinos de graduación mis mejores amigos:

Gracias por ser un buen ejemplo para mí durante mi carrera, y apoyarme hasta con las tareas, y hacer mi vida de estudiante más fácil y feliz, a pesar de los desvelos. Los quiero tanto.

Acto que Dedico, Sofía Marroquín,

A Dios: Por ser mi padre, mi maestro, mi amigo, por manifestarse en mi vida siempre. Por ser la vida, por estar en los niños y por estar entre nosotros enseñándonos a ser mejores.

A mi madre divina:

Por toda la protección, misericordia, guía, esperanza y amor que me ha dado.

A mi papa y mi mama:

Fernando y Apolonia, por ser ejemplo de perseverancia, superación, amor a Dios; por enseñarnos el amor a Cristo y por sacrificar todo por nosotros, sus hijos.

A mis hermanos:

Por ser mucho en mi vida, por ser libertad, por ser perseverancia, por ser seguridad, por ser valentía, por ser firmeza, por ser amistad, por estar siempre.

A mis sobrinos:

Gabriela y Max que el Cristo bendito me los guarde siempre y haga de ustedes seres de bien.

A los que ya no están:

Mama Naya (Genara de Jesús Palencia Rojas), Licha (Felisa Marroquín Palencia), Jovito Marroquín Palencia, Teresa de Jesús Palencia Rojas. Por haber permitido que Dios los usará y se manifestara, porque hoy lo que somos fue por su amor que trascendió.

A mis tios, tias y primos:

A Patricio y todos los demás, mi corazón les agradece por el ejemplo que sembraron en mí.

A mis amigos:

Por estar allí, por escuchar, apoyar, acompañar, aguantar, guiar y manifestarme su amor. Los tengo en mi corazón y son fortaleza en mi vida.

A la juventud de la USAC:

Gracias por creer en que las cosas pueden y deben de ser mejores.

A mis maestros:

Gracias por la enseñanza, por la oportunidad, por la confianza y por la amistad.

AGRADECIMIENTOS

**A DIOS NUESTRO PADRE CELESTIAL
A NUESTROS PADRES Y ABUELITOS
A NUESTRAS HERMANAS Y HERMANOS
A NUESTROS FAMILIARES Y AMIGOS
A NUESTROS MAESTROS**

A LA GLORIOSA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA, en especial a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

AL LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN DE PRODUCTOS NATURALES, LIPRONAT

A EL ÁREA DE DERMATOLOGÍA DEL HOSPITAL ROOSEVELT, especialmente al Dr. Carlos García.

A LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNIDAD DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS, en especial a Dra. Elena Chang.

A LABORATORIO DONOVAN WERKE

A TODAS LAS PERSONAS QUE NOS APOYARON, en especial a Dra. Sully Margot Cruz Velásquez, Lic. Armando Cáceres, Licda. Hada Alvarado, Lic. Julio Chinchilla, Licda. Patricia Navas, Licda. Julia García, Licda. Ayleen Santizo, Licda. Nereida Marroquín, Evelin Macario,

ÍNDICE

Contenido	Página
I. Ámbito de la investigación.....	2
II. Resumen.....	5
III. Antecedentes.....	7
IV. Justificación.....	37
V. Objetivos.....	39
VI. Hipótesis	40
VII. Materiales y Métodos.....	41
VIII. Resultados.....	53
IX. Discusión de Resultados.....	76
X. Conclusiones.....	86
XI. Recomendaciones.....	88
XII. Referencias Bibliográficas.....	89
XIII. Anexos.....	96

I. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN

El vitíligo es uno de los desórdenes más frecuentes de hipopigmentación de la piel caracterizado por manchas de color blanco rosáceo, desprovistas de melanocitos identificables. El vitíligo resulta de una compleja interacción entre factores ambientales, genéticos e inmunológicos lo que contribuye en última instancia a la destrucción del melanocito. Su etiología no es bien conocida, se postulan varias teorías para explicar la pérdida de melanocitos epidérmicos o de su funcionalidad (Hernández, 2008). Se ha propuesto que el estrés oxidativo pudiera estar involucrado en la patogénesis de la degeneración del melanocito en el vitíligo, donde se ha demostrado un desequilibrio tisular del sistema oxido-reducción (Ferrándiz, 2001).

Por su parte la patología de la psoriasis es una enfermedad crónica de la piel; que se presenta como áreas o parches de piel que se inflaman y desarrollan escamas. La descamación sucede cuando las células en la capa externa de la piel se reproducen más rápido de lo normal y se acumulan en la superficie de la piel (Peyri, 2010).

Para ambas patologías se destacan los tratamientos tópicos como la loción de bergamota, la loción de psoralenos, así como la combinación de furanocumarinas con radiación ultravioleta (PUVA), UVB de banda estrecha (Fernández, 2008). Estos tratamientos poseen como principio activo a las furanocumarinas, las cuales son moléculas cuya estructura química les permite ser activadas por la luz ultravioleta en la región de 310-400 nm, en ese momento sus electrones son excitados, con lo que pueden insertarse en la doble hélice del ADN de las células epidérmicas y unirse a las bases pirimidínicas, por medio de lo cual bloquean la transcripción del ADN, y llevan a la célula a la muerte (Arreaga, 1996). En el caso del vitíligo las furanocumarinas y la luz UV, estimulan la actividad de la tirosinasa, con ello la síntesis de melanina, ayudando de esta manera a la repigmentación. Por su parte en la psoriasis ayudan principalmente a la muerte celular de las células que se encuentran en crecimiento acelerado (Fang et. al., 2002).

En el vitíligo, además del uso de furanocumarinas también se han promovido la utilización de tratamientos que contribuyan al balance de antioxidantes en la epidermis afectada, es decir se ha promovido el uso de antioxidantes (Ferrándiz, 2001).

En el Hospital Roosevelt de Guatemala, se utiliza en preparados tópicos, para el tratamiento de vitíligo y psoriasis, una esencia extraída de la bergamota (*Citrus bergamia*), fruta perteneciente a la familia de plantas rutaceae, cuyo contenido de furanocumarinas es tal que permite un efecto terapéutico comprobado. Esta esencia posee un costo que durante ciertas temporadas el Hospital Roosevelt no puede cubrir, por lo que deja de dispensar la loción de esencia de bergamota a sus pacientes o recurre a la preparación de macerados de cítricos para sustituir a la esencia de bergamota.

Estandarizar la preparación de los macerados que el Hospital Roosevelt emplea cuando se carece de esencia de bergamota y asegurarse de que presente la misma concentración de furanocumarinas que aporta la esencia al preparado galénico, es importante en el aseguramiento de la calidad y de la eficacia. Además el empleo de plantas accesibles en el mercado capitalino, que posean furanocumarinas, para preparar la loción, permitirá que el equipo del laboratorio del Hospital Roosevelt, pueda conseguir el material vegetal, macerarlo y producir un producto de calidad con un valor menor al de la esencia de bergamota.

Otra variable importante en el tratamiento de vitíligo es evidenciar el potencial antioxidante del medicamento que se está empleando. Por ello, si en el presente estudio uno de los macerados tuviera un buen potencial antioxidante, similar al de la esencia de bergamota, se podría pensar en estudios clínicos para validar su eficacia terapéutica en el vitíligo.

En el presente estudio se analizaron dos tipos de limones de mayor distribución en la ciudad capital *Citrus aurantifolia* y *Citrus latifolia* y dos hierbas de la familia Apiaceae el perejil (*Petroselinum crispum*) y el apio (*Apium graveolens*), los cuales según la literatura

consultada presentan furanocumarinas conocidas como psoraleno, bergapteno y bergamotina.

Además se llevaron a cabo estudios *in Vitro* como la cuantificación de flavonoides por espectrofotometría con UV, cuantificación de fenoles totales por método micrométrico, determinación de actividad antioxidante con metodología micrométrica de DPPH (2,2-difenil-1-picril hidrazilo), para demostrar la actividad antioxidante de las muestras analizadas y comparadas con el estándar respectivo, debido a que esta actividad se encuentra directamente ligada con la quelación de peróxidos que se producen en la piel, los cuales causan un efecto de decoloración de la misma, y es el objetivo de estos extractos combatir la acción de los radicales libres.

También se logró determinar la actividad antitirosinasa de los extractos, demostrando que si los extractos no inhiben esta enzima, no interfieren con la producción de melanina en la piel, lo cual suma otra actividad importante para el tratamiento de vitíligo, ya que no producen despigmentación por esta vía.

II. RESUMEN

En la presente investigación se identificaron cumarinas a través del método de cromatografía en capa fina (CCF) y cromatografía en papel, y se cuantificaron a través de espectrofotometría ultravioleta, furanocumarinas, de las especies Rutaceae: (*Citrus aurantifolia*) limón criollo y (*Citrus latifolia*) limón persa, y dos especies de la familia Apiaceae: (*Apium graveolens*) apio y (*Petroselinum crispum*) perejil. Estas determinaciones se realizaron para identificar si dichas especies vegetales cumplen con los parámetros requeridos para ser utilizadas como droga vegetal en una formulación para tratamiento de vitíligo y psoriasis. Los parámetros fueron establecidos a partir de la cuantificación realizada en esencia de bergamota, la cual es el componente activo de la formulación usada en el Hospital Roosevelt para el tratamiento de dicha enfermedad, por ende se utilizó como uno de los estándar en todos los ensayos. En el caso de *C. latifolia* y *C. aurantifolia*, el material vegetal consistió en la cascara picada, y en el caso de *P. crispum* y *A. graveolens*, consistió en una mezcla de tallo y hojas en proporción 1:1 picados.

Se llevó a cabo la curva de calibración con estándar de psoraleno, para la cuantificación de furanocumarinas a 310 nm, la esencia de bergamota a concentración de 12 mg/mL = meq de psoraleno. Los resultados confirman la presencia de furanocumarinas en todas las muestras; se evidenció que para sustituir la concentración de furanocumarinas presentes en 10 mL de esencia de bergamota (Volumen requerido para hacer la loción) se necesitan 63.10 mL del macerado de *C. latifolia*, 67.51 mL de macerado de *C. aurantifolia*, 69.84 mL de *P. crispum* y 208.38 mL de macerado de *A. graveolens*; dichos macerados a una concentración de 100 g de material vegetal, en 250 mL de etanol al 70%.

También se llevó a cabo la identificación por CCF y cuantificación de flavonoides en los extractos, seguidamente de la determinación de actividad antioxidante (DPPH micrométrico y cromatografía) y cuantificación de otros compuestos fenólicos (cuantificación micrométrica) a los cuales puede atribuirse actividad antioxidante; la cual es importante para eliminar los radicales libres que produce la piel del paciente con vitíligo. El compuesto antioxidante se encarga de proteger la piel de la oxidación y decoloración, atrapando los radicales libres e interviniendo en los pasos de iniciación, propagación y

finalización de procesos oxidativos. Finalmente se obtuvo como resultado que los extractos de *C. latifolia* y *C. aurantifolia* poseen mayor contenido de flavonoides y fenoles totales, y mayor actividad antioxidante que la esencia de bergamota.

Como ensayo adicional se llevó a cabo la cuantificación de la actividad anti-tirosinasa en los extractos de las cuatro especies en estudio. La tirosinasa es la enzima limitante de la velocidad de la biosíntesis de pigmentos de melanina responsables de la coloración parda de la piel. La prueba de la inhibición de la tirosinasa pueden ser clínicamente útil para determinar si un tratamiento es seguro para ser utilizado en el tratamiento de vitíligo o no, ya que este podría presentar actividad fototóxica pero al mismo tiempo antitirosinasa, lo que podría a la vez causar antagonismo en la producción de melanina en la piel. El extracto que mostró menor efecto antitirosinasa fue el de *A. graveolens*, sin embargo los cuatro extractos en estudio presentaron menor actividad antitirosinasa que el estándar de esencia de bergamota, lo cual indica que inhiben esta enzima con menor potencia que la esencia de bergamota, aspecto importante en el tratamiento de vitíligo, en donde se requiere que esta enzima se encuentre activa.

Concluyendo que los macerados preparados no poseen la concentración de furanocumarinas necesaria para sustituir en la loción de esencia de bergamota a la esencia de bergamota, sin embargo los macerados de *C. latifolia* y *C. aurantifolia* si presentan mayor actividad antioxidante y un menor efecto inhibidor de la tirosinasa que la esencia de bergamota, por lo que tienen propiedades químicas y biológicas prometedoras para tratar el vitíligo, pero no la psoriasis.

III. ANTECEDENTES

3.1 Vitíligo

3.1.1 Generalidades

El Vitíligo es una enfermedad mundial que afecta alrededor del 1% de la población. Es un trastorno crónico con predisposición multifactorial y factores desencadenantes, como traumatismo, quemadura solar, estrés y enfermedad sistémica. En el 80% de los casos aparece antes de los 30 años, no tiene distinción de razas aunque prevalece en personas de piel oscura y es más frecuente en los trópicos (Hernández, 2008).

El vitíligo o leucoderma es una enfermedad que se caracteriza por la pérdida de las células productoras del pigmento melánico en la piel, es decir, la pérdida de los melanocitos; por tanto, el enfermo presenta áreas acrómicas o manchas blancas en las cuales, al realizarles biopsias, se evidencia la ausencia de estas células. El enfermo pierde progresivamente el color de la piel, la mayor parte de los mismos presentan la despigmentación en las manos inicialmente y luego en la cara. Estas manchas van progresando lentamente a partir de estos sitios y pueden extenderse por todo el cuerpo y llegar a un grado de despigmentación que la persona semeja a un albino (ausencia de pigmento en toda la piel del cuerpo, las cejas, pestañas y el pelo). Las áreas del cuerpo afectadas con mayor frecuencia son: Genitales, cara, parte superior del tórax, manos y pies, axilas, ingles, contorno de los ojos y boca, ano, codos y rodillas. Esta situación ocurre porque en esas áreas se concentran mayor número de melanocitos y por eso son más susceptibles que otras áreas. La despigmentación generalizada o universal es menos frecuente.

La causa del vitíligo es multifactorial, es decir producida por varios factores, en donde la predisposición genética ejerce un papel indudablemente importante, ya que la mayoría de los pacientes en evaluación (65%) presentan un antecedente familiar con vitíligo. Las hipótesis evaluadas científicamente en el mundo y las más aceptadas de acuerdo a las investigaciones son las siguientes: Teoría autoinmune, los melanocitos se destruyen por ciertos linfocitos activados. Sería similar a lo que ocurre en otros procesos autoinmunes mejor conocidos (tiroiditis), y se ve confirmada por la respuesta, de algunos

casos, a tratamientos con fármacos inmunosupresores. Teoría neurógena: Se postula una posible interacción entre los melanocitos y células nerviosas que liberaran un mediador neuroquímico tóxico. Este sería el causante de la destrucción de los melanocitos. Teoría de la autodestrucción: Según esta propuesta los melanocitos serían destruidos por sustancias tóxicas formadas en los procesos metabólicos de biosíntesis de la melanina (a través de determinadas rutas metabólicas activas tan sólo en algunos sujetos). Por ende el vitíligo puede ser generado por estrés, quemaduras (una de las principales), embarazo. Por lo que se han propuesto mecanismos autoinmunitarios, citotóxicos, bioquímicos, oxidantes-antioxidantes, nerviosos y virales para la destrucción de los melanocitos epidérmicos. Asimismo, varios estudios señalan una participación significativa de la susceptibilidad genética al vitíligo (Goldsmith, 2009).

3.1.2 Posible etiología del vitíligo

3.1.2.1 Genética del vitíligo

El vitíligo se caracteriza por penetrancia incompleta, múltiples factores de susceptibilidad y heterogeneidad genética. La herencia del vitíligo puede involucrar genes asociados con la biosíntesis de melanina, la respuesta a la agresión oxidativa y la regulación de la autoinmunidad. La frecuente asociación del vitíligo con enfermedades autoinmunitarias instó a investigar sus posibles relaciones con el HLA (antígenos leucocitarios humanos). Los tipos HLA asociados con vitíligo en más de un estudio son A2, DR4, DR7 y CW6 (Goldsmith, 2009).

3.1.2.2 Hipótesis autoinmunitaria y respuesta de inmunidad humoral:

La asociación del vitíligo con enfermedades autoinmunitarias está bien establecida. Los trastornos tiroideos, en particular la tiroiditis de Hashimoto y la enfermedad de Graves, suelen asociarse con vitíligo, junto con otras endocrinopatías como enfermedad de Addison y diabetes mellitus. Otros trastornos asociados son alopecia areata, anemia perniciosa, lupus eritematoso sistémico, enfermedad inflamatoria intestinal, artritis reumatoidea, psoriasis y síndrome poliglandular autoinmunitario, pero se discute la significación de algunas de estas asociaciones. La evidencia más convincente de patogenia autoinmunitaria es la demostración de autoanticuerpos circulantes en pacientes con vitíligo. (Goldsmith, 2009)

Se ha planteado el interrogante de si los anticuerpos del vitíligo están presentes como consecuencia de la destrucción de las células pigmentarias, como epifenómeno, o si estos anticuerpos destruyen las células pigmentarias.

3.1.2.3 Mecanismos de inmunidad celular:

Además de la participación de mecanismos de inmunidad humoral en la patogenia del vitíligo, hay firme evidencia que indica procesos de inmunidad celular. La destrucción de los melanocitos puede estar mediada directamente por linfocitos T citotóxicos autorreactivos. En casos de vitíligo, se ha comunicado un mayor número de linfocitos citotóxicos CD8, circulantes que reaccionan con MelanA/Mart-1 (antígeno de melanoma reconocido por los linfocitos T), glucoproteína 100 y tirosinasa. Se han demostrado linfocitos T CD8 activados en la piel que rodea a las lesiones de vitíligo. Interesa destacar que los receptores de linfocitos T específicos de melanocitos, hallados en pacientes con melanoma y con vitíligo, son muy similares desde el punto de vista estructural (Goldsmith, 2009).

La radiación ultravioleta participa en la inducción del vitíligo autoinmune, afección caracterizada por pérdida de la pigmentación cutánea que puede afectar diferentes zonas del cuerpo. La radiación ultravioleta altera al melanocito y se produce liberación de antígenos del melanocito. Los antígenos son transportados por células presentadoras al ganglio linfático. En él se originan linfocitos sensibilizados. Los linfocitos sensibilizados llegan a la piel, se aloja y liberan mediadores y óxido nítrico que dañan a nuevos melanocitos agravando la enfermedad. Cuando se activan los linfocitos R reguladores, se liberan citoquinas antiinflamatorias que inhiben al óxido nítrico, que dañan a nuevos melanocitos agravando la enfermedad (Cabrera, 2009).

3.1.2.4 Alteración del sistema oxidante-antioxidante en el vitíligo:

La agresión oxidativa también puede desempeñar un papel patogénico importante en el vitíligo. Varios estudios validan una teoría de posible agresión oxidativa, que postula a que la acumulación de radicales libres tóxicos para los melanocitos provoque su destrucción. Se ha demostrado aumento de los niveles de óxido nítrico en melanocitos cultivados y en el

suero de los pacientes con vitíligo, lo que sugiere que el óxido nítrico puede inducir autodestrucción de los melanocitos (Goldsmith, 2009).

3.1.2.5 Teoría nerviosa

El vitíligo segmentario suele adoptar una distribución dermatómica, lo que generó la hipótesis nerviosa que propone que ciertos mediadores químicos liberados de las terminaciones nerviosas disminuyen la producción de melanina (Goldsmith, 2009).

3.1.3 Tratamiento de vitíligo

El tratamiento del vitíligo es muy complejo y requiere de un estudio completo del paciente afectado y que haya un buen entendimiento entre el médico y el paciente. Hay que tener en cuenta que muchos pacientes, en un 20%, tienen repigmentación espontánea y otros mejoran y recaen durante varios años. Toda persona con sospecha de padecer vitíligo debe acudir al especialista quien elaborará su historia clínica, valorará el tipo de lesiones que presenta el paciente en la piel, si hay enfermedades sistémicas involucradas y si hay factores causales aparentes. Una vez hecho el diagnóstico, se procederá, de acuerdo a la posible causa, a iniciar el tratamiento y su modificación según la evolución de la enfermedad (Ferrándiz, 2001).

Dentro del gran grupo de medicamentos utilizados en el ámbito mundial se destacan, por la frecuencia con que se usan y los resultados positivos que se obtienen los siguientes: Tópicos, Cremas a base de esteroides, loción de bergamota, ácido retinoico, lociones con psoralenos, entre otros. Sistémicos: Los esteroides, fenilalanina, antioxidantes, azatioprina. Mopsalen. Otros procedimientos: Psoralenos más radiación ultravioleta (PUVA), UVB de banda estrecha, injertos de piel sana en lesiones con vitíligo. El tratamiento dependerá del uso y localización de las lesiones aunque los nuevos esquemas de tratamientos empleados con éxitos incluyen agentes antioxidantes en la terapia (Fernández, 2008).

3.2 Psoriasis:

Es una enfermedad inflamatoria crónica de la piel que produce lesiones escamosas engrosadas e inflamadas, con una amplia variabilidad clínica y evolutiva (Kelley, 1992).

La causa de la psoriasis es una velocidad anormalmente alta de mitosis en las células epidérmicas que se pueden relacionar con una sustancia transportada en la sangre, un defecto en el sistema inmune. Se cree que es multifactorial, en individuos con predisposición genética y desencadenada o exacerbada por diversos factores ambientales.

Aunque está poco esclarecida, hay dos hechos básicos: La hiperplasia epidérmica por un aumento de la población germinativa, y el infiltrado inflamatorio de la dermis. La inflamación viene mediada por linfocitos Th1 tipo CD4+, que liberan (junto al queratinocito) citosinas proliferativas, que estimulan la proliferación de las células epidérmicas. La respuesta inflamatoria es de tipo celular, frente a un autoantígeno aún desconocido, o frente a un superantígeno estreptocócico en el caso de la psoriasis en gotas post-infecciosa. Esta teoría viene avalada por los estudios anatomopatológicos de las muestras de biopsia, así como por la efectividad de los fármacos que inhiben la activación de los linfocitos T, su expansión clonal o la liberación de citosinas proinflamatorias.

Se estima que entre 1 y 3% de la población sufre de psoriasis. Si bien puede aparecer a cualquier edad, suele hacerlo entre los 15 y 35 años, con un pico máximo de incidencia en la segunda década. Afecta por igual a ambos sexos, aunque es más precoz en mujeres, y en personas con antecedentes familiares. Por otro lado, no existe relación entre psoriasis y cáncer de piel (no maligno)(Kelley, 1992).

Los siguientes factores pueden desencadenar un ataque de psoriasis o hacer que la afección sea más difícil de tratar: Bacterias o infecciones virales, incluyendo faringitis estreptocócica e infecciones de las vías respiratorias altas, aire o piel seca, lesión en la piel, incluyendo cortaduras, quemaduras y picaduras de insectos, algunos medicamentos, incluyendo antipalúdicos, betabloqueadores y litio, estrés, muy poca luz solar, demasiada luz solar (quemadura solar), demasiado alcohol.

Los parches o manchas cutáneas producto de la psoriasis pueden ser: Piel seca y cubierta de escamas plateadas, de color rosa-rojo (como el color del salmón), levantados y gruesos.

Otros síntomas pueden abarcar: Lesiones genitales en los hombres y mujeres, dolor articular (artritis psoriásica), cambios en la uña, incluyendo engrosamiento, manchas de color amarillo-marrón, hendiduras (hoyuelos) en la superficie de la uña y separación de la uña de su base, caspa intensa en el cuero cabelludo.

La psoriasis puede afectar cualquiera o todas las partes de la piel. Existen cinco tipos principales de psoriasis:

Eritodérmica: El enrojecimiento de la piel es muy intenso y cubre un área grande.

En gotas (guttata): Aparecen pequeñas manchas rojas-rosadas en la piel

Inversa: el enrojecimiento e irritación de la piel ocurre en las axilas, ingle y entre la piel superpuesta.

En placa: Parches de piel rojos y gruesos son cubiertos por escamas de plateadas a blancas. Éste es el tipo más común de psoriasis.

Pustular: Ampollas blancas que están rodeadas por piel roja e irritada (Kelley, 1992).

3.3 Furanocumarinas

3.3.1 Generalidades

Las furanocumarinas son metabolitos secundarios de las plantas, son compuestos fenólicos cuya estructura química es la de una cumarina a la que se le adiciona un anillo furano. Estos compuestos fitoquímicos son fototóxicos solamente en presencia de luz, y cumplen un rol importante en la defensa de las plantas ante los herbívoros y algunos hongos patógenos (Taiz & Zeiger, 2006).

Algunas furanocumarinas son activadas por la luz ultravioleta en la región de 310-400 nm. En ese momento sus electrones son excitados, con lo que pueden insertarse en la doble hélice del ADN y unirse a las bases pirimidínicas, por ejemplo la citosina y timina, por medio de lo cual bloquean la transcripción del ADN, y conllevan a la muerte celular.

Uno de los principales factores que logran que la planta lleve a cabo la mayor producción de furanocumarinas es que la planta esté enferma o estresada, por lo que algunos cosechadores de apio desarrollan prurito al manipular la planta estresada o enferma. Los Psoralenos o furanocumarinas lineales, son ampliamente distribuidas en plantas y son particularmente abundantes en umbelíferas y rutáceas, los ejemplos más comunes son psoraleno, bergapteno (visnagina), xantotoxina (metoxaleno) e isopimpinellina (kelina). Las plantas que contienen psoralenos, son usadas interna o externamente en PUVA terapéutico (tratamiento fotoquimioterapéutico donde se utiliza el psoraleno con la luz ultravioleta A-visible) en el tratamiento de la psoriasis, vitíligo, y otras afecciones de la piel o para producir bronceado.

3.3.2 Propiedades fisicoquímicas de las furanocumarinas

Son sólidos cristalizables de color blanco o amarillento. Son solubles en solventes orgánicos (éter, cloroformo y alcohol) y principalmente polares. Las furanocumarinas presentan fluorescencia (azul, amarilla, verde, púrpura), lo cual permite su reconocimiento (Bruneton, 2001).

3.3.3 Formación de las furanocumarinas

La utilización sistemática de marcadores ha permitido demostrar que la prenilación por el DMAPP (dimetil pirofosfato) del núcleo bencénico, en C6 o en C8 de una 7-hidroxicumarina, es el origen del ciclo suplementario que caracteriza estas moléculas. La prenilación en C-6 lleva a la formación de las furanocumarinas llamadas lineales; si se produce en C-8 origina la formación de homólogos angulares. La ciclación de la 6 o de 8-isoprenilcumarina se debe probablemente al ataque nucleofílico de hidroxilo en C7 sobre el epóxido formado por oxidación del doble enlace de la cadena isopentenílica. El resultado de esta reacción está en función de la orientación del nucleofílico: formación de una hidroxi-isopropildihidrofuranocumarina o, en el caso de ataque sobre el carbono terciario, de una hidroximetildihidropiranocumarina. La presencia únicamente de una especie de Apiaceae, de (+)-(R)-lomatina y de (+)-(S)-columbianina apoya esta hipótesis (Kuklinski, 2000).

El mecanismo propuesto para explicar la formación de las furanocumarinas consta de dos etapas sucesivas: Oxidación estereoespecífica en C-4' y eliminación del resto hidroxiisopropílico en C-5 por retroaldoización. La o las sustituciones en C-5 y en C8 de las furanocumarinas se producen tardíamente, y dependen de oxidasas y orto metiltransferasas.

3.3.4 Extracción e identificación de Furanocumarinas

Se extraen con mezclas hidroalcohólicas, se realiza una cromatografía de capa fina y se identifica por fluorescencia UV o revelado con el éster aminoetílico del ácido difenilbórico (comúnmente llamado “Reactivo de productos naturales” porque permite detectar también otras sustancias naturales como flavonoides) (Kuklinski, 2000).

Las cumarinas libres son solubles en alcoholes y en disolventes orgánicos como dióxido de etilo y disolventes clorados con los cuales pueden ser extraídas. Los heterósidos son más o menos solubles en agua. Para su purificación se pueden aplicar las propiedades específicas de las lactonas: apertura y solubilización en medio alcalino, cierre en medio ácido. También es posible, en algunos casos, recurrir a la sublimación. El interés de estos dos procesos está limitado por el riesgo que presentan de poder inducir alteraciones en la estructura original. También existe el riesgo de formación de artefactos en caso de recurrir a técnicas cromatográficas sobre soportes clásicos (sílice), sobre todo en el caso de las cumarinas aciladas; en este caso se debe recurrir a un fraccionamiento sobre gel, tanto con las formas libres como con los heterósidos. La CLAR (cromatografía líquida de alta eficacia) semipreparativa se emplea ampliamente (fases normales y reversas). La electroforesis capilar se suele utilizar para separar cumarinas con estructuras semejantes (Kuklinski, 2000).

Las cumarinas poseen un espectro UV característico, muy influenciado por la naturaleza y posición de los sustituyentes, que se modifica sustancialmente en medio alcalino (KOH, NaOCH₃). Examinadas a la luz UV, las CCF de drogas con cumarinas presentan manchas cuya coloración, exaltada en presencia de amoníaco, varía del azul al amarillo y al púrpura. Para la valoración de estos compuestos en una droga, se puede

recurrir a una técnica espectrofluorimétrica (después de realizar la elución de las manchas en CCF) o más simplemente a la CLAR.

3.3.5 Furanocumarinas y fototoxicidad

La capacidad que poseen diversas especies vegetales, indígenas o exóticas, de provocar hiperpigmentación cutánea transitoria se conoce desde hace mucho tiempo: se cree que el zumo del *Amni visnaga* L. (Apiaceae) era utilizado por los egipcios para suprimir las manifestaciones del vitiligo y que la medicina ayurvédica empleaba, con el mismo fin, las semillas de una psoralea (Fabaceae). Se sabe también que estas especies pueden ser el origen de una dermatitis aguda, a veces acompañada por formación de vesículas que evolucionan, por coalescencia, en anchas ampollas. En numerosos casos, aparece a continuación una hiperpigmentación que puede persistir mucho tiempo (dermatitis de Berloque). En ausencia de tratamiento específico, conviene establecer un tratamiento sintomático (compresas frías, ocasionalmente corticoides). Estos accidentes cutáneos son la expresión de una fototoxicidad: se producen siempre después de un contacto con la planta o el producto, seguido de exposición a la luz solar; se favorecen con la humedad (Arreaga, 1996).

Los constituyentes fototóxicos, comunes a todas estas especies, son furanocumarinas lineales: Psoraleno, bergapteno (=5-metoxipsoraleno y xantotoxina =5-MOP) y xantotoxina (xantotoxol-MOP); las furanocumarinas angulares solo pueden dar lugar a cicloadiciones sobre los carbonos C3, C4 y C4', C5' con las bases pirimidínicas del ADN. Estas cicloadiciones pueden ser mono o bifuncionales y, en este último caso, formar enlaces cruzados entre los pares de bases de los ácidos nucleicos y de este modo, inducir lesiones en el genoma. Es posible que estas propiedades guarden relación con la fototoxicidad cuyo mecanismo no está definido todavía: explican mejor las propiedades mutagénicas y cancerogénicas (Bruneton, 2001).

3.3.6 Principales especies involucradas con furanocumarinas

Todas pertenecen, al menos en lo que concierne a las especies europeas y a excepción de la higuera, (*Ficus carica* L) (Moraceae), bien a la familia de las apiaceae o bien a la

rutaceae. Se trata normalmente de especies cultivadas que pueden producir dermatitis en agricultores o en empleados en industrias de transformación. Por ello se consideran fototóxicas por contacto: angélica, apio, perejil y numerosas especies del género citrus. Como es lógico, existen los mismos riesgos de fototoxicidad con los productos utilizados en dermatología, perfumería, o fórmulas cosméticas y que contienen en su formulación furanocumarinas o aceites esenciales de citrus (especialmente los que se preparan a base de bergamota). Los riesgos de fototoxicidad tras ingestión son muy limitados, no obstante precaución con el apio que puede ser, verdad es que raramente, origen de manifestaciones fototóxicas, principalmente en pacientes tratados simultáneamente con PUVA terapia (Alboroz, 1980).

3.3.7 Aplicaciones de las furanocumarinas

Aplicaciones medicinales: Las propiedades fotodinámicas del bergapteno y de la xantoxina les hacen aplicaciones en PUVAterapia: tratamiento fotoquimioterápico de la psoriasis y de otras afecciones dermatológicas. Esta técnica consiste en la administración, generalmente por vía oral, de furanocumarina (0.6 mg/Kg de 8-metoxipsoraleno o 1.2 mg/Kg de 5-metoxipsoraleno) y dos o tres horas mas tarde proceder a una radiación de la lámpara UV que emita en la zona de longitudes de onda UV largas(320-380 nm)(tomar en cuenta el espectro de absorción de furanocumarinas y flavonoides). Las exposiciones a las radiaciones, que son en principio de corta duración (1-3 J/cm²), van aumentando progresivamente hasta 6-8 J/cm², en general con 3 sesiones por semana. Se puede realizar tratamientos locales (ej: en caso de insuficiencia hepática), pero deben llevarse a cabo con la máxima prudencia. La PUVAterapia está contraindicada en embarazadas y en niños, en casos de afecciones cutáneas que se agraven con el sol y en casos de insuficiencia renal o cardíaca. Esta terapéutica no está desprovista de riesgos: trastornos digestivos (8-MOP), sequedad cutánea, fotosensibilización (prurito, quemaduras, de ahí la necesidad de evitar las sobreexposiciones: vestidos envolventes, pantallas) y más tardíamente, envejecimiento acelerado del cristalino (llevar gafas durante y en las horas siguientes al tratamiento), envejecimiento cutáneo y problemas de pigmentación. Cuando se utiliza durante mucho tiempo, la PUVA terapia aumenta el riesgo de aparición de cánceres: estudios recientes confirman que puede inducir carcinoma espinocelular así como melanoma, muchos años

después del inicio del tratamiento. Sin embargo, los especialistas estiman que la PUVAterapia sigue siendo útil, especialmente en caso de psoriasis extendida (considerando la calidad de vida que procura a los sujetos tratados) con las reservas de: limitar el número de indicaciones procedentes, no tratar (salvo excepciones) a sujetos jóvenes y fototipos claros, tener en cuenta los tratamientos anteriores y asegurar el control del número de sesiones y las dosis dadas (máximo $1,500 \text{ J/cm}^2$ acumuladas) (Bruneton, 2001).

Las más importantes acciones que tienen las furanocumarinas en los campos biológico y terapéutico, se derivan de su actividad fotosensibilizante sobre las células, la cual se manifiesta como fototoxicidad que altera y desorganiza numerosos procesos biológicos en diferentes tipos de células. Esta actividad fotosensibilizante es explicable debido a la reactividad del estado triplete de las furanocumarinas que se genera cuando éstas interactúan con la radiación UV, y cuyas posibles reacciones se pueden agrupar en dos categorías (Bruneton, 2001).

Los fotoenlaces directos se dan con macromoléculas como el DNA, el RNA y las proteínas. Las fotomodificaciones indirectas a los sustratos biológicos se dan a través de formas reactivas del oxígeno. Históricamente, las furanocumarinas se han usado, junto con la radiación UV, en el tratamiento de varias enfermedades de la piel como la psoriasis, el vitíligo y la micosis fungoides; el bergapteno, además se usa como protector solar en preparaciones cosméticas. Como ya se indicó el término furanocumarina se aplica colectivamente a un gran número de compuestos que poseen el núcleo benzo-2-pirona (cumarina), con un anillo furánico unido en las posiciones 6 y 7 para las lineales, y 7 y 8 para las angulares. Su origen natural está restringido a las plantas, y aunque esporádicamente se han reportado en las familias leguminosas, moráceas, meliáceas, compuestas y solanáceas, su mayor ocurrencia se presenta en las rutáceas y en las umbelíferas o apiáceas.

Biosintéticamente las furanocumarinas tiene un origen mixto; el núcleo cumarínico se deriva de la ruta shiquimato-corismato, pasando por el ácido trans-cinámico y finalizando con la umbeliferona. El anillo furánico proviene de la vía acetato-mevalonato, cuyo

producto intermedio, el dimetilalilpirofosfato (DAP), se une a la umbeliferona para generar las furanocumarinas lineales (psoralenos) y las angulares (angelicinas). Su función en el metabolismo vegetal se enmarca dentro de los diferentes mecanismos de defensa que poseen las plantas para sobrevivir a los herbívoros polívoros y a los hongos patógenos. Esta acción protectora se manifiesta en la variada toxicidad hacia otros organismos, como larvas y semillas, en la actividad antialimentaria hacia insectos, y en la respuesta antifúngica y como fitoalexinas. El mayor interés por las furanocumarinas se ha centrado, durante los últimos años, en investigar los aspectos químicos, bioquímicos, fisiológicos y terapéuticos relacionados con su acción fotosensibilizante y fototóxica sobre las células (Medinilla, 2009).

3.3.8 Antecedentes históricos

Los efectos biológicos de las furanocumarinas se conocen hace más de 3.000 años. En el libro sagrado de los hindúes, “Atarva Veda”, y en un manuscrito budista se menciona el tratamiento de la leucoderma por medio de la aplicación de un extracto vegetal clasificado ahora como *Psoralea corylifolia*. Desde hace cuatro siglos se pregona la inducción de problemas en la piel cuando se hacía contacto con la savia de varias especies de rutáceas y apiáceas. La *Ruta graveolens* L. (ruda) causaba eritemas, erupciones y enrojecimiento en las manos de las personas que cortaban sus flores. Tal efecto se conoce ahora como fotofitodermatitis, inducida por la luz solar y ocasionada por la presencia de furanocumarinas lineales en la planta. En 1834 se aisló el primero de estos compuestos, el bergapteno, del aceite de bergamota, *Citrus bergamia*. Posteriormente se separó la xantoxina, y en 1933, Spath y Holzen establecieron sus estructuras químicas y reportaron sus respectivas síntesis. Sólo hasta 1940 se identificaron a las furanocumarinas como los agentes responsables de la fotodermatitis. En esa época, Kuske estudió los efectos fotosensibilizantes de la piel. Las invaluable perspectivas de estas sustancias en el tratamiento exitoso de varias enfermedades cutáneas, ocasionaron que a partir de los años 50 se empezaran importantes estudios sobre las fuentes botánicas de las furanocumarinas, su mecanismo de acción, su toxicidad en los animales y en el hombre, sobre el desarrollo de fuentes monocromáticas de luz U.V. y sobre la incidencia de tales sustancias en el cáncer (Bruneton, 2001, p. 690).

3.3.9 Efectos biológicos

La principal característica de estas sustancias la constituye su acción fotosensibilizante sobre las células. Se entiende como fotosensibilización un proceso en el cual la acción combinada de la radiación y un agente sensibilizante produce efectos físicos, químicos y biológicos, no observados sin la presencia de este último. Parece demostrado que la potenciación de la luz UV a la actividad de las furanocumarinas no es aditiva sino sinérgica (Medinilla, 2009, p. 24).

El mecanismo por el cual ocurre la acción fotosensibilizante soporta el hecho de que ésta se manifiesta en una fototoxicidad, que implica fundamentalmente una alteración o desorganización de numerosos procesos biológicos en células bacterianas o fúngicas, en virus a nivel de ADN, en células de mamíferos in vitro, en tejidos vegetales, y en células epidérmicas mamíferos. La alteración de los procesos biológicos y químicos en tales organismos puede producir los siguientes efectos: Fotodermatitis, caracterizada por la presencia de eritemas, ampollas, erupciones y enrojecimiento de la piel. Carcinogénesis y mutagénesis, originadas en los procesos de reparación y reproducción del ADN (Disminución de la velocidad del ciclo celular, inhibición del desarrollo de ciertos tumores, variación de la actividad enzimática, aumento de la pigmentación de la piel y degradación fotodinámica de la vitamina E).

3.3.10 Mecanismo de Acción

Como ya se mencionó la actividad fotosensibilizante de estos compuestos se explica fundamentalmente en la reactividad de su estado excitado triplete (T₁) que se genera cuando interactúan con la luz UV y cuyas posibles reacciones (de tipo radicalario), se pueden agrupar en dos amplias categorías (Medinilla, 2009). Reacciones de enlace con macromoléculas como el DNA, el RNA y las proteínas. Reacciones de transferencia de energía al oxígeno molecular, para generar algunas de sus formas reactivas, (oxígeno singlete y el anión superóxido).

3.3.10.1 Generación de estado de triplete

Las furanocumarinas lineales y angulares exhiben un bien definido espectro de absorción U.V. con varias bandas; la primera de ellas aparece en el UV cercano entre 300 y 335 nm; los otros dos picos presentan sus máximos a longitudes de onda menores que 300 nm (245-295 y 210-220 nm). Estas absorciones se atribuyen al sistema P conjugado de las moléculas y específicamente a la transición P- P*(estado excitado), cuya absorción precisa depende de los rasgos estructurales de cada compuesto. Al graficar la magnitud del efecto fotosensibilizante en función de la radiación, se encuentra que para la mayoría de las furanocumarinas, la mayor actividad aparece en el rango de 320-370 nm, con un máximo situado entre 340 y 360 nm. Al absorber la radiación, las furanocumarinas excitan los electrones P de sus enlaces más reactivos a un estado excitado de corta vida ($>10^{-8}$ seg), llamado estado singlete (S1), el cual puede desactivarse a través de diferentes procesos, uno de los cuales implica pasar a otro estado excitado, donde los electrones no apareados en orbitales moleculares diferentes, tiene espines paralelos, se conoce como estado excitado triplete (T1), y tiene un período de vida de 3 a 10 seg o mayor. Aunque las furanocumarinas fotoexcitadas son reactivas en los dos estados anteriores, el mayor tiempo de vida de T1 les permite reaccionar con mayor probabilidad a través del estado triplete (Bruneton). Los eventos que tienden a ocurrir a partir del estado excitado triplete se pueden presentarse de la siguiente manera: Un decaimiento radiante llamado fosforescencia. Un decaimiento no radiante en forma de calor. Un tipo de fotorreacciones directas con biomoléculas. Un tipo de fotorreacciones indirectas a través del O₂ (Bruneton, 2001). Bajo condiciones apropiadas algunos eventos pueden ocurrir al mismo tiempo, lo cual indica que teóricamente las dos fotorreacciones señaladas pueden ser importantes en la inducción de los efectos fotosensibilizantes. Generalmente ocurre que la disipación de energía en forma de calor o de radiación no induce reactividad o fotosensibilización.

3.3.10.2 Procesos fotoquímicos directos con sustratos biológicos

Las moléculas excitadas de las furanocumarinas pueden reaccionar, por medio de radicales libres, con diferentes sustratos. Con moléculas de DNA, formando monoadductos, a través de las bases pirimídicas. Con moléculas de RNA, formando sólo monoadductos.

Con moléculas de proteínas a través de los aminoácidos. Con moléculas no excitadas de su misma clase, provocando dimerización del compuesto.

3.3.10.3 Interacción de furanocumarinas con ADN

Es el más importante y sobre todo el más investigado de los procesos responsables de los efectos fototóxicos y curativos de los psoralenos. El mecanismo propuesto, supone inicialmente un débil acomplejamiento de la molécula no excitada y las bases pirimídicas del ADN, a través de fuerzas no covalentes como las de Van der Waals, los puentes de hidrógeno y las fuerzas hidrofílicas. Con el primer cuanto de energía a 365 nm, se pueden formar dos tipos de monoadductos con las bases del ADN; uno fluorescente que involucra los dobles enlaces 4',5' de la cumarina y el 5,6 de la base. La absorción de un segundo fotón de energía a >365 nm por el monoadducto fluorescente (tiene intacto el enlace 3,4 del núcleo pirónico), genera un diadducto no fluorescente, y se evidencia la formación de una unión cruzada entre las dos fibras opuestas de la doble hélice del ADN. La reactividad de las furanocumarinas con las bases pirimídicas del ADN está determinada por factores estéricos y electrónicos. Los estudios revelan que las sustancias que poseen estructuras angulares o sustituyentes que extraen electrones son incapaces de formar uniones cruzadas con el ADN, y sólo generan monoadductos con sus bases. Ello ocurre con la angelicina y sus derivados y con el 3-carboxipsoraleno. La forma angular de los primeros les impide disponer adecuadamente los dos sitios fotorreactivos a las bases pirimídicas. Y el grupo extractor de electrones en la posición tres del carboxipsoraleno, disminuye la reactividad de su doble enlace 3,4. Obviamente, esto reduce la actividad biológica de estos compuestos, lo cual se trata de aprovechar como una alternativa en el tratamiento de enfermedades de la piel que minimice algunos efectos citotóxicos de los psoralenos (Alboroz, 1980). Las sustancias como el psoraleno, el bergapteno y el 4,5',8-trimetilpsoraleno, que presentan estructuras lineales y poseen sustituyentes dadores de electrones, exhiben fácilmente la propiedad de formar uniones cruzadas.

3.3.10.4 Interacción con ARN

Estas fotorreacciones han sido menos estudiadas que las anteriores. Las furanocumarinas muestran baja capacidad para formar complejos con el ARN debido al

desorden estructural de la macromolécula, y por ello la posibilidad de formar monoadductos también es baja. Algunas furanocumarinas lineales forman diadductos con el ARN, sólo cuando están implicadas dos cadenas de macromoléculas diferentes. Otros estudios demuestran que los psoralenos se enlazan al tARN, provocando cambios conformacionales e inhibiendo la actividad de la enzima aminoacil-tARN sintetasa. Se cree que el sitio de la reacción sobre el tRNA involucra la 4-tiouridina en la posición 8 del extremo 5' de la cadena nucleotídica (Alboroz, 1980).

3.3.10.5 Interacción con Proteínas:

Existen evidencias de fotoenlace entre trimetilpsoraleno y las siguientes proteínas: albúmina de sueros de bovinos y humanos, termolisina, ribonucleasas, quimiotripsina, protamina, lisozima, b-lactoglobulina, histona y amilasa. Tales fotoenlaces ocurren a través de los aminoácidos, y la extensión de los mismos depende de la naturaleza y estructura de la proteína; se encuentra, por ejemplo, que hacia la albúmina las furanocumarinas muestran alta afinidad, indicada por los valores relativamente altos de las constantes de asociación. El mecanismo de los fotoenlaces entre las furanocumarinas y las proteínas es el siguiente: Adición de una molécula de cumarina al aminoácido de la proteína (en una reacción por radicales libres). Foto oxidación de la molécula del psoraleno en dos intermedios reactivos, los cuales forman el enlace con la proteína (Kuklinski, 2000).

3.3.10.6 Procesos fotoquímicos indirectos con sustratos biológicos

Desde que se reconoció que el estado excitado singlete del oxígeno molecular tenía un período de vida largo (ms a ms), y una facilidad para difundirse por las membranas celulares, su función biológica en los procesos fotosensibilizantes de los psoralenos se hizo evidente. El estado triplete de las furanocumarinas, en presencia de oxígeno molecular, puede transferir su energía al O₂ triplete y generar especies muy reactivas de oxígeno como el estado singlete (O₂), el anión superóxido (O₂⁻), y los radicales hidroxilo (OH[•]), los cuales al interactuar con los sustratos biológicos (células epidérmicas, dérmicas, endoteliales y enzimas), generan moléculas foto oxidadas, responsables muy probablemente de la variación en la actividad de las enzimas y de las respuestas fotosensibilizantes de la piel como eritemas, demás, pigmentación y vasodilatación (Kuklinski, 2000).

3.3.10.7 Manifestaciones bioquímicas y fisiológicas de las fotorreacciones furanocumarinas

La alteración de numerosos procesos biológicos en los organismos por acción de las furanocumarinas en presencia de la luz UV es consecuencia de uno o de los tipos de reacciones generales que experimentan los estados excitados de aquéllas. La complejidad de los procesos y los diversos sitios donde ocurren (Células endoteliales, epidérmicas y dérmicas, constituyentes citoplasmáticos como enzimas, RNA y lisosomas, constituyentes nucleares como el DNA y la cromatina y membrana celular), dificultan la explicación de determinado efecto por un tipo de reacción específica. Se ha comprobado, sin embargo, que los fotoenlaces directos con el DNA, el RNA y las proteínas causan los siguientes efectos primarios. Disminución de la síntesis del DNA, al inhibirse la replicación del mismo por la formación del enlace cruzado en la doble hélice. Reducción de la actividad de molde del DNA, bloqueando así, la síntesis de RNA; la unión cruzada con las bases del DNA inactivan las células para el proceso de transcripción. Disminución de la síntesis de proteínas, debido a la pérdida de actividad del DNA o al fotoenlace directo que forman las furanocumarinas con estas moléculas. La combinación de estos efectos altera las funciones celulares que dependen de los procesos de transcripción y traducción. Los fenómenos de muerte celular, mutación y carcinogénesis en la piel, resultan aparentemente de la fotoconjugación de los psoralenos al DNA. Es claro que la excesiva producción de diaductos con las bases pirimídicas disminuye ostensiblemente la velocidad del ciclo celular, hasta llegar a la inactivación total. Aquellas células que sobreviven al daño del DNA y sufren la replicación, tienden a repararse a través de un proceso que eventualmente aparece como responsable de los efectos carcinogénicos y mutagénicos de los psoralenos (Medinilla, 2009). Complementario a lo anterior, existe evidencia experimental de que las reacciones de las furanocumarinas con sustratos biológicos a través del O₂, alteran esencialmente procesos que ocurren en las células endoteliales y en las membranas celulares, y modifican la actividad de las enzimas. Entre las manifestaciones corrientes de estas interacciones están los siguientes efectos: Oxidación de lípidos presentes en la membrana lipoproteínica de las células. Daños en la membrana celular que se traducen en edemas, eritemas, vesiculación e hiperpigmentación. Fotooxidación de las células endoteliales, provocando daños en los capilares, arteriolas, vénulas y posiblemente vasodilatación. Formación de productos secundarios de oxidación que incrementan la

síntesis de prostaglandinas y prostaciclina. Variación en la actividad de algunas enzimas, inhabilitando a unas como la lisozima y la glutamato dehidrogenasa., y acelerando a otras como la tirosinasa responsable del proceso de pigmentación de la piel. Aunque los productos de oxidación que se generan por la acción del O_2 singlete y del anión superóxido sobre los sustratos biológicos no han sido completamente estudiados e identificados. Si se tiene alguna claridad sobre la forma como ellos inducen la síntesis de melanina en la pigmentación de la piel. Parece ocurrir que los productos de la fotodegradación inactivan los grupos sulfidrilos que normalmente acomplejan al ion Cu^{2+} de la tirosinasa, permitiendo una mayor actividad catalizadora en algunas etapas de la biosíntesis de la melanina.

3.3.10.8 Aplicación en dermatología

Los psoralenos se han usado, junto con la luz UV, en el tratamiento de varias enfermedades de la piel como el vitíligo, la psoriasis y la micosis fungoides. Adicionalmente, se ha utilizado el bergapteno como protector solar en preparaciones cosméticas. Los compuestos comúnmente ensayados en estos tratamientos son: la xantotoxina, el bergapteno, el psoraleno, el 4,5',8-trimetilpsoraleno, la angelicina y la 4,5'-dimetilangelicina; pero los que han presentado el mejor resultado son el trimetilpsoraleno y el bergapteno (Medinilla, 2009).

En el caso del vitíligo (acromia progresiva de la piel), el tratamiento con psoraleno y luz UV, se explica por el incremento que ocasionan en la actividad de la tirosinasa. El uso más importante de las furanocumarinas ha sido en el desarrollo de la fotoquimioterapia de la psoriasis, enfermedad de la piel caracterizada por una proliferación de células epidérmicas. La sustancia más efectiva ha sido la xantotoxina, cuya acción se fundamenta en la habilidad que presenta para inactivar al ADN y disminuir la velocidad del ciclo celular. Algunos de sus efectos citotóxicos se están tratando de evitar con el uso de furanocumarinas angulares con pacientes con psoriasis. Recientemente, se reporta el tratamiento exitoso de micosis fungoides (tumoración fungosa de la piel), usando radiación UV y una furanocumarina angular, 4, 6,4'-trimetilangelicina. (Todas las furanocumarinas anteriormente mencionadas se encuentran en el exocarpio y mesocarpio de las Rutáceas, como en la bergamota, lima, naranja y limón) (Hernández, 1996). Desde hace varias

décadas se reportan diversos efectos de estas sustancias que aparentemente no están relacionados con los mecanismos descritos antes, ya que se manifiestan sin el concurso de la radiación UV. Algunos de ellos son los siguientes: Actividad antimicrobial contra *Mycobacterium tuberculosis*, *Aspergillus oryzae* y *Curvularia lunata*. Acción de imperatonina, psoraleno, xantotoxina y bergapteno sobre la mutagenicidad de 2-aminoantraceno hacia *Salmonella typhimurium*. Estímulo de los melanocitos y de la actividad de la tirosinasa in vitro y en ausencia de la luz UV los compuestos ensayados fueron la xantotoxina, el bergapteno, y el 4,5',8-trimetilpsoraleno.

Las furanocumarinas son compuestos ampliamente distribuidos en las plantas principalmente en las familias umbelíferas y rutáceas, pudiendo encontrarse en todas las partes de la planta, desde la raíz hasta las flores y frutos, siendo más abundantes en éstos últimos, presentándose a menudo como mezclas en forma libre o como glicósidos. El nombre camarina anteriormente fue asignado en honor al árbol de Tonka (*Coumarona odorata*) llamándose entonces cumarinas a todos aquellos compuestos que contienen como base la estructura descrita por Vogel: Todas las cumarinas se caracterizan por el sistema Benzo-alfa-pirona y su carácter lactónico que hace que sean solubilizadas por soluciones alcalinas con la aparición de un color amarillo (Medinilla, 2009).

3.3.11 Plantas que contienen furanocumarina de importancia en el presente estudio (ver anexos)

3.3.11.1 *Citrus bergamia*, aplicaciones dermatológicas

En un estudio el aceite de bergamota ha sido relacionado con ciertos efectos fototóxicos (debido al compuesto bergapteno y bergamotina). En el pasado, un compuesto extraído del aceite de bergamota (el psoraleno) se usó en cremas para acelerar el bronceado y en protectores solares. Esta sustancia penetra en la piel y aumenta los daños en el ADN de las células. Este daño es el responsable de quemaduras solares y de un incremento de la producción de melanina (Neves, 2002).

En 1959 se descubrió que la sustancia era fotocarcinógena, pero no se prohibió en cremas bronceadoras hasta 1995. Estas sustancias fotocarcinogénicas fueron prohibidas después de que hubiesen causado muchos casos de melanomas malignos y muertes. Los

psoralenos (bergapteno y bergamotina) ahora solo se usan en el tratamiento de ciertos desórdenes de la piel, como parte de la terapia PUVA (tratamientos contra el eczema, psoriasis y vitíligo a base de Psoraleno + rayos UVA).

3.3.11.2 Esencia de *C. bergamia*:

El vitíligo y la psoriasis es una enfermedad tratada con esencia de bergamota en el Hospital Roosevelt, que está incorporada a un preparado galénico, el cual está constituido por: 10 mL de esencia de bergamota, 5mL de éter sulfúrico, 10 mg de hidrato de cloral. 95 mL de etanol al 70%. La esencia de bergamota se obtiene por expresión del fruto del bergamota. Para ello exprimen la corteza con la mano o bien todo el fruto con auxilio de unas maquinillas rudimentarias. La esencia purificada por filtración circular en el comercio en vasijas de cobre, de 25 y 50 Kg de cavidad.

3.3.11.3 Propiedades fisicoquímicas:

La esencia de bergamota es un líquido amarillo pardusco o de color de miel; a menudo verde a causa de su contenido en cobre, de olor muy agradable y sabor amargo. P. esp.: 0.881-0.888 (150); con una actividad rotatoria de +8 hasta +220. Es soluble en un volumen de alcohol de 900.

3.3.11.4 Composición química

Esta esencia debe su olor principalmente al acetato de *l*-linalilo, $\text{CH}_3\text{CO} \cdot \text{OC}_{10}\text{H}_{17}$, y al *l*-linalol, $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{OH}$; contiene además *d*-limoneno, $\text{C}_{10}\text{H}_{16}$; alcohol dihidrocumínico, $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}$, bergapteno (inodoro), $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{O}_4$, α -pineno, C_{10}H_6 , *l*-canfeno, $\text{C}_{10}\text{H}_{16}$, bisaboleno y bergamotina.

3.3.11.4.1 Composición química y aplicaciones dermatológicas de *C. aurantifolia* y *C. latifolia*

Aceite esencial (0,2-2,5 %): Monoterpenos: limoneno (80%), α y γ -terpinenos, ρ -cimeno, α y β -felandrenos, terpinoleno. Sesquiterpenos. Alcoholes alifáticos. Aldehídos. Cumarinas y furanocumarinas (bergamotina). Eupéptico (aceite esencial). Bacteriostático (aceite esencial). Antidiarréico (pectina de la pulpa). Vitamínico (ácido 1-ascórbico).

Rubefaciente, en uso tópico (aceite esencial). La fruta contiene 35-45% de aceite esencial, 7-7.6% ácido cítrico, el aceite se compone de d-lirolilacetato, d-limoneno, L-linol, alcohol dihidrocumónico, α -pineno, bisaboleno y dipineno (Younken, 1995, p. 25).

3.3.11.4.2 Composición química y aplicaciones dermatológicas de *A. graveolens*

Uso externo suele comportarse como un cicatrizante. Contiene grandes cantidades de agua y celulosa. El bulbo contiene, además del aceite etéreo, almidón, azúcares, colina, tirosina, glutamina, asparragina y vitamina B-1 y B-2 que son necesarios para la función nerviosa y muscular. Aceite esencial (2-3%): limoneno, (60%), selineno, β -terpineol, β -cariofileno, p-cimeno, β -pineno, α -santalol, dihidrocarvona, butilftálicos (sedanolido, sedenólido), furanocumarinas y otros heterósidos cumarínicos (Younken, 1995).

3.3.11.4.3 Composición química y aplicaciones dermatológicas del *P. crispum*

Hojas, semillas: Aceite esencial (3-6%): fenilpropanos (apiol, miristicina), terpenos (α y β -pineno). Flavonoides: apiósido, luteolol, apigenol. Vitaminas A, B, C; sales minerales (hierro, calcio, fósforo, magnesio, sodio, potasio, yodo, manganeso, azufre); furanocumarinas: bergapteno; enzimas: diastasas. Raíces: Aceite esencial (0,5-1%): apiol, miristicina; flavonoides: apiósido. Poliíinos: falcarinol. Furanocumarinas: bergapteno, oxipeucedanina, isoimperatorina (Bruneton, 2001). En cuanto al uso estético, es un recomendado agente blanqueador para las manchas y pecas en la piel producidas por el sol. El zumo de las apiáceas era utilizado por los egipcios para suprimir las manifestaciones del Vitíligo.

3.4 Actividad antioxidante

3.4.1 Generalidades

Según Halliwell (2011), una sustancia antioxidante es aquella molécula que tiene como objetivo principal proteger un tejido biológico contra el daño oxidativo. Un radical libera una molécula inestable que contiene uno o más electrones no apareados, es decir, que posee un electrón impar en órbita, y tiende a buscar moléculas estables para formar combinaciones con ellas y saturar sus electrones. A este proceso se le conoce como oxidación.

La oxidación es fundamental en el ser humano para la producción de energía, pero cuando la producción de oxígeno es incontrolada y existe un desequilibrio en la acción protectora de enzimas puede implicar la aparición de muchas enfermedades como artritis reumatoide y aterosclerosis; así como en procesos degenerativos asociados con el envejecimiento y el Vitiligo (Mau, Lin & Song, 2002).

En las oxidaciones biológicas, los radicales libres más importantes, son el oxígeno y los derivados del mismo: el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. Los radicales libres reaccionan rápidamente con casi cada tipo de molécula biológica hallada en forma libre o formando parte de las diferentes estructuras celulares de los seres vivos, tales como: glúcidos, fosfolípidos, aminoácidos, nucleótidos, ácidos grasos, lipoproteínas y membranas celulares (Venereo, 2002).

Resultados de estudios recientes ha propuesto que el estrés oxidativo pudiera ser un fenómeno importante en la fisiopatología del vitiligo donde se ha demostrado un desequilibrio tisular del sistema oxido-reducción con la consiguiente producción de radicales libres que conducen a la lesión del melanocito. La acumulación de peróxido de hidrógeno en la epidermis de pacientes con vitiligo y la disminución significativa de la enzima catalasa trae como consecuencia que disminuya o se pierda la capacidad de sintetizar melanina por el melanocito.

Se proponen hipótesis para el vitiligo en el que se postula que la destrucción final de melanocitos en vitiligo es el resultado de una cascada de reacciones iniciadas por una desregulación de la melanogénesis, como resultado de una ruptura en la defensa de los radicales libres (Yildirim, 2004).

En el vitiligo los melanocitos están en continuo estado de estrés oxidativo y la muerte celular puede deberse a las fallas del sistema antioxidante o por fallas en la regulación del factor de transcripción asociado a microftalmia regulado por la proteína relacionada con la tirosinasa, por lo que la inclusión de antioxidantes en la terapia podría incrementar la

eficacia de los tratamientos. Se ha reportado que esta repigmentación se acelera cuando se combina este tratamiento con climatoterapia. Estos hallazgos, aportan una nueva visión sobre la enfermedad, sobre la base de que los melanocitos no desaparecen sino que están funcionalmente anulados. Es por lo anterior que surge un nuevo concepto terapéutico basado en lograr un balance de antioxidantes en la epidermis afectada que pueda revertir el estado afuncional de los melanocitos (Hernández, 2008).

Un método importante para medir la actividad antioxidante de una sustancia es el que mide a los compuestos fenólicos o polifenólicos, estos compuestos están presentes en la naturaleza y poseen anillos aromáticos con sustituyentes hidroxilos, lo que los hace ser potentes antioxidantes por ser donadores de electrones con facilidad. Pueden actuar como antioxidantes mediante dos mecanismos principales: como antiradicalarios y como quelantes de metales, al método de cuantificación se le conoce con el nombre de cuantificación de fenoles totales mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu. El mecanismo es una reacción redox fosfotúngstico y de ácido fosfomolibdico que se reduce, por oxidación de los fenoles, a una mezcla de óxidos azules de tungsteno y de molibdeno (Re et al., 1999), es decir el reactivo de Folin-Ciocalteu como agente oxidante mide la capacidad de la sustancia analizada (específicamente compuestos fenólicos) de funcionar como agentes antioxidantes.

3.4.2 Comportamiento de enzimas antioxidantes en el vitiligo

Enzimas antioxidantes como catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx) han sido estudiadas en pacientes con vitiligo. La SOD es un grupo de metaloenzimas secuestradoras de radicales superóxidos lo que hace que disminuya su toxicidad. Aunque se han reportado estudios en eritrocitos, epidermis y en cultivos estudios en eritrocitos, epidermis y en cultivo de melanocitos donde no ha habido diferencias en esta enzima en pacientes con vitiligo con respecto a pacientes controles, también los hay en que esta actividad está incrementada. Encontrando la actividad de SOD significativamente incrementada en pacientes con vitiligo generalizado tanto en eritrocitos como en tejido, con relación a sus respectivos controles (Hernández, 2008).

La GPx que cataliza la reducción de hidroperóxidos en presencia de GSH para formar glutatión oxidado. La actividad de esta enzima se ha encontrado disminuida significativamente en eritrocitos de pacientes con vitíligo. Un estudio realizado en eritrocitos de pacientes con vitíligo estable y activo reveló también una disminución de GPx con relación a sus respectivos grupos controles, un 33% más marcada en el grupo de pacientes con vitíligo activo comparado con el grupo de vitíligo estable.

La CAT es una reconocida enzima reguladora del estrés oxidativo. Su actividad disminuida provoca acumulación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), evento observado en pacientes con vitíligo. Sin embargo, estudios recientes en pacientes con vitíligo de diferentes grupos de edades no han reportado actividad de catalasa en eritrocitos en ningún caso (Fernández, 2008).

3.4.2.1 Influencia del incremento de las concentraciones de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) sobre la epidermis:

Estudios donde se ha examinado la unión de calcio a la calmodulina en presencia de H_2O_2 han revelado que la calmodulina oxidada pierde la capacidad para activar la ATPasa dependiente de calcio lo cual implica una captación disminuida de L-fenilalanina en la epidermis. La disminución de la catalasa incrementa las concentraciones de H_2O_2 en la epidermis. Este es un inhibidor reversible de la tirosinasa humana y juega un importante papel en la regulación concentración-dependiente de señales colinérgicas tanto de la acetilcolinesterasa (AChE) como de la butirilcolinesterasa (BchE) epidérmica, señales éstas que están severamente afectadas en vitíligo activo debido al incremento de las concentraciones de H_2O_2 . Se ha comprobado que el H_2O_2 media la oxidación de ACTH, α y β , MSH y β endorfina en la epidermis de vitíligo. En todos los casos la afectación del H_2O_2 es debido a la oxidación de los residuos de metionina en la secuencia de estos péptidos dado por el incremento de las concentraciones de H_2O_2 en la epidermis. Estos estudios revelaron además que al oxidarse las β endorfinas, pierde la funcionalidad de promover la pigmentación en melanocitos (Fernández, 2008).

3.4.2.2 Malondialdehído (MDA)

El MDA como producto final de las reacciones de peroxidación lipídica e indicador del estrés oxidativo, ha sido determinado en pacientes con vitíligo. Los resultados de los estudios han mostrado concentraciones incrementadas de MDA tanto en suero como en tejido de pacientes con vitíligo generalizado cuando se compararon con la de pacientes normales. Así mismo se midió MDA en suero de pacientes con vitíligo estable y activo y los resultados demostraron que en ambos casos se encontraban elevados comparados con los controles aunque los pacientes con vitíligo activo mostraron un incremento del 85% con relación a pacientes con vitíligo estable. De igual manera, concentraciones de MDA medidas en eritrocitos de pacientes con vitíligo de diferentes grupos de edades (entre 5 y 45 años), se mostraron incrementadas con relación a sus respectivos controles sanos.

3.4.2.3 Algunos tratamientos:

Se han reportado varios estudios donde se combina la luz UVBBA con el uso tópico de agentes antioxidantes tales como catalasa, pseudocatalasa y superóxido dismutasa así como una mezcla de tales agentes que también contienen vitaminas E y C, ácidos grasos poliinsaturados y ácido α liproico. Se plantea que dichos tratamientos provocan una mejoría clínica evidente y podrían ser considerados en las lesiones, fundamentalmente en cara, cuello y cabeza (Fernández, 2008).

El tratamiento tópico con antioxidantes ha promovido la repigmentación en áreas dañadas sin efectos adversos. Cremas que contienen estos compuestos han sido evaluadas en pacientes de diferentes edades y con diferentes formas clínicas de vitíligo y en todos los casos las áreas dañadas han repigmentado.

3.5 Actividad anti-tirosinasa

3.5.1 Generalidades (Almeda D., Astorga L., Orellana A., Sampuel L. & Sierra P. 2014)

Según estudios realizados por Kim y colaboradores (2002), la tirosinasa es la enzima limitante de la velocidad de la biosíntesis de pigmentos de melanina responsables de la coloración del pelo, piel y ojos. También es conocida como la polifenol oxidasa (PPO), es una enzima multifuncional que contiene cobre. Es catalizadora en la oxidación de monofenoles, *O*-difenoles y *O*-quinonas. La tirosinasa es conocida por ser una enzima clave

para la biosíntesis de melanina en las plantas y animales. Según estudios realizados por Lin y colaboradores (2007), inhibidores de la tirosinasa pueden ser clínicamente útiles para el tratamiento de algunos trastornos dermatológicos asociados con la hiperpigmentación por alta producción de melanina; ellos también encuentran usos en cosmética para despigmentación después de quemaduras. Además, la tirosinasa es conocida por estar involucrada en el proceso de muda de los insectos y la adherencia de organismos marinos. Los inhibidores de la tirosinasa se han utilizado en productos cosméticos que se promueven para aclarar la piel (Chiari, Joray, Ruiz, Palacios & Carpinella, 2010).

Los tratamientos tópicos estándar para los trastornos de hiperpigmentación incluyen inhibidores de la tirosinasa, algunos compuestos con actividad inhibitoria se utilizan en medicina, pero la mayoría de ellos no reúnen todos los requisitos de eficacia clínica, o se observan efectos adversos (Casañola et al., 2007).

La búsqueda de los agentes químicos naturales capaces de modular el metabolismo de la pigmentación es de gran interés. Por lo tanto, varios han sido probados como cosméticos y productos farmacéuticos para evitar el exceso de melanina en las capas epidérmicas o como agentes blanqueadores (Baurin, Arnoult, Scior, Do & Bernard, 2002).

Los compuestos para aclarar la piel deben cumplir al menos los siguientes criterios antes de realizar más pruebas. En primer lugar, ser inhibidores de la enzima, preferiblemente con la capacidad de coordinación con los aniones cobres en el sitio activo de la tirosinasa. Esta propiedad confiere cierta especificidad hacia la tirosinasa, puede aumentar la unión y así mejorar la inhibición. En segundo lugar, deben presentar una baja toxicidad. Desafortunadamente, algunos compuestos con la capacidad para coordinar metales pueden ser muy tóxicos, y deben ser descartados. Algunos compuestos evaluados no son tóxicos para las células no-melanocitos (p. ej. queratinocitos), pero se vuelven tóxicos cuando se actúa sobre la tirosinasa y se convierten en quinonas dentro de los melanocitos (Curto et al., 1999).

3.5.2 Melanogénesis y tirosinasa

La melanogénesis es un proceso fisiológico que resulta en la síntesis de los pigmentos de melanina, que desempeñan un papel crucial protector contra

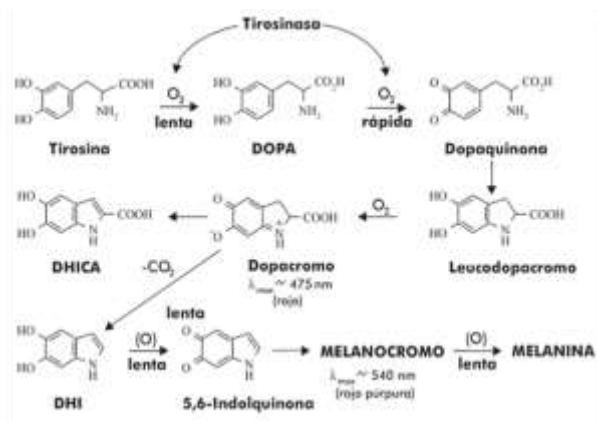
fotocarcinogénesis de la piel. La melanina se forma en células especializadas, los melanocitos en el transcurso de un proceso bioquímico que lleva el nombre de metalogénesis y representa una parte de una serie compleja de acontecimientos que comienzan desde el metabolismo del aminoácido tirosina por la enzima tirosinasa (Casañola et al., 2007).

El componente dominante de color de la piel normal se proporciona por la melanina que es un heteropolímero compuesto de indol que se produce dentro de los melanosomas por la acción de la enzima tirosinasa que es el material precursor en los melanocitos (Nakashima et al., 2010).

La tirosinasa es una enzima clave para la biosíntesis de melanina, se centra principalmente en la catalización de dos reacciones distintas en la síntesis de melanina según (Casañola, et. al. 2007). La hidroxilación de L-tirosina (actividad monofenólica de la tirosina) a 3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) y la oxidación de L-DOPA (actividad difenolasa), para dar lugar a dopaquinona (Lee, Kim & Kim, 1997; Kyeong, Kim, Hyun, Sang & Ho, 2011).

Después de una conversión de dopaquinona a dopacromo, dopacromo tautomerasa (proteína relacionada con tirosinasa-2, DCT/TRP-2) cataliza la conversión de dopacromo a 5,6 - dihidroxiindol-2-carboxílico (DHICA). Posteriormente, DHICA se convierte en indol-quinona carboxílico ácido por DHICA oxidasa proteína relacionada con tirosinasa 1, (TRP-1) y transformarse en melanina mediante en una serie de reacciones no enzimáticas. En general, la actividad de tirosinasa y los niveles de proteína de tirosinasa, TRP-1, y TRP-2 se correlaciona directamente con el contenido de melanina. Es demostrado que los melanocitos derivados de una piel pálida, tienen un contenido de melanina bajo, siempre tienen menores niveles de actividad tirosinasa, TRP-1, y TRP-2 en los melanocitos derivados de la piel más oscura, con un mayor contenido de melanina con altos niveles de actividad tirosinasa (Fang, Tsuji & Setaluri, 2002).

Las proteínas relacionadas con la tirosinasa en humanos (TYRPs) incluyen las enzimas de la tirosinasa y una familia de estrecha relación de los melanocitos, productos específicos de genes implicados en la síntesis de melanina. Las localizaciones cromosómicas de los locus que contienen los tres genes humanos TYRP se han determinado y se han realizado investigaciones de polimorfismos que podrían explicar la variación natural en la pigmentación y de varios estados de hipopigmentación (Fang et al., 2002).



Fuente: (Fang et al., 2002). (Almeda D., Astorga L., Orellana A., Sampuel L. & Sierra P. 2014)

Figura 1. Mecanismo de la melanogénesis

Recientemente se ha demostrado que otros factores tales como iones metálicos también contribuyen a la producción de melanina. Existen además tres cromóforos que contribuyen al color de la piel, la hemoglobina, oxihemoglobina, carotinoides (Ul-Haq et al., 2006).

3.5.3 Compuestos inhibitorios de la tirosinasa

El uso de inhibidores de la tirosinasa, tales como ácido kójico e hidroquinona es cada vez más importante en la industria cosmética debido a sus efectos anti-pigmentación (Momtaz et al., 2008).

Los aniones para amortiguar son útiles en el rango de pH de 4 a 7, son potentes inhibidores de la tirosinasa, particularmente por debajo de pH 5.5, entre los tampones que se utilizan, se encuentra el fosfato de sodio, 0.1 M, con pH 7.0, para las mediciones cinéticas (Duckworth & Coleman, 1969).

En el pasado, eran los sulfitos ampliamente utilizados como inhibidores de la tirosinasa por su efecto antipardeamiento. Sin embargo, su uso ha sido regulado con el fin de asegurar al consumidor seguridad, ya que estos conservantes afectan la calidad nutricional de los alimentos y puede causar reacciones alérgicas, así como gastrointestinales. La arbutina, de origen natural (beta-D-glucopiranosido de hidroquinona), es utilizada tradicionalmente para despigmentación (Baurin et al., 2002).

Otros compuestos con actividad inhibidora de la tirosinasa, incluyen el pirocatecol es conocido como inactivador de la tirosinasa, como su producto de oxidación. Compuestos que pertenecen a diferentes subsistemas, tales como los derivados de azobenceno, tripéptido ácido kójico, análogos del oxadiazol, derivados longifolene, derivados del ácido glicirretínico, nitrosohidroxilaminas, catequinas, ésteres de ácidos gentísico, compuestos de hidroxiestilbeno, y benzaldoximes, ácido salicilidroxámico, catequinas, la hidroquinona, resveratrol y oxiresveratrol (Casañola et al., 2007; Lim, Lim & Yule, 2009).

La Administración de Alimentos y Drogas (FDA por sus siglas en inglés) ha aprobado productos farmacéuticos que contienen 2.4% de hidroxiquinona (HQ) ya que son moderadamente eficaces, pero HQ se considera citotóxico para melanocitos y potencialmente mutágenos para células de mamíferos (Curto et al., 1999).

3.6 Maceración

3.6.1 Generalidades

La maceración es un proceso de extracción sólido-líquido. El producto sólido (materia prima: exocarpio, tallos, hojas.) posee una serie de compuestos solubles en el líquido extractante. La maceración es una técnica para extraer principios activos que se alterarían con el calor, se deja la planta troceada en el líquido a temperatura ambiente (20-25°C) durante un tiempo concreto de varios días dependiendo de la especie (Neves, 2002). Consiste en poner en contacto la droga y el solvente durante varios días, hasta obtener un equilibrio entre la droga y el solvente (en este caso la droga es el exocarpio de lima y limón, y las hojas y tallos de Perejil y apio; el solvente utilizado fue alcohol al 95% y al 70%).

3.7 Longitud de onda de algunos metabolitos secundarios que absorben en la región del espectro ultravioleta-visible.

A continuación se presenta la longitud de onda a la cual absorben algunos metabolitos secundarios en la región del espectro ultravioleta-visible:

Cuadro 1. Longitud de Onda a la cual absorben los Metabolitos secundarios que se encuentran en los macerados

Metabolito	Rango de Longitud de Onda (nm) Absorbancia
1. Alcaloides	150-200
2. Cumarinas	274-311
3. Furanocumarinas	Lineales: 300-335 245-295 210-220 Mayor Actividad: 320-370 Máximo: 340-360
4. Flavonoides	Flavonas y Flavonoles: Banda I: 300-390 Banda II: 250-280 Flavonas: 310-350 Flavonoles: 330-360 Flavonoles: 350-385
5. Saponinas	430
6. Antocianinas	505-535
7. Quinonas	>430
8. Betacianinas	532-554
9. Taninos	700
10. Antraquinonas	220-290 300-350 400-500

Fuente: (Lock, 1997; Fuleki, 1968; Lastra, 2004)

IV. JUSTIFICACIÓN

La loción de esencia de bergamota es un preparado galénico que se produce en el Laboratorio de Producción del Hospital Roosevelt de Guatemala. Contiene esencia de bergamota como componente principal, aportador de furanocumarinas, y representa un producto dermatológico importante para el tratamiento de pacientes que padecen vitíligo y psoriasis; las furanocumarinas la hacen tener efectos fotoreactivos que inhiben la excesiva proliferación celular característica de la psoriasis, además de estimular a la enzima tirosinasa, el cual es un efecto importante en la curación del vitíligo.

La esencia de bergamota se produce a partir del cítrico *Citrus bergamia*, el cual no se cultiva en Guatemala, esta se comercializa a precios que el Hospital Roosevelt no puede cubrir durante ciertas temporadas, tiempo en el cual no se dispensa la loción a los pacientes, o el personal del laboratorio recurre a la preparación de macerados con cítricos nacionales para sustituir a la esencia de bergamota en la loción.

Para preparar estos macerados no se cuenta con un procedimiento estandarizado que permita su correcta producción, por lo que no se conoce con certeza la proporción solvente-materia vegetal con la que se tiene que preparar, ni el tiempo de vida útil de la loción que contiene el macerado y se desconoce si el macerado aporta a la loción la concentración de furanocumarinas que los 10 mL de esencia de bergamota aporta a la loción de esencia de bergamota. Por lo que convergen varias variables no controladas que impiden avalar con certeza el efecto terapéutico de la loción hecha, en base de las furanocumarinas del macerado.

Por lo anterior, el presente trabajo se realizó para validar si el uso de macerados de cítricos nacionales pueden sustituir a la esencia de bergamota, en cuanto al aporte de furanocumarinas. Por ello se prepararon lociones a partir de los macerados de los cítricos empleados en el Hospital, los cuales son plantas de fácil obtención en mercados capitalinos, como lo son el limón persa (*Citrus latifolia*) y el limón criollo (*Citrus aurantifolia*); a los que se sumó el perejil (*Petroselinum crispum*) y el apio (*Apio graveolens*), por presentar furanocumarinas en alguno de sus órganos vegetales.

Además de ello fue necesario establecer parámetros que permitieran la producción de macerados de calidad, en los cuales se debe de conocer la proporción adecuada solvente-materia vegetal, el tiempo ideal de extracción, la concentración del solvente a utilizar y los mililitros de macerado que equivalen a los 10 mililitros de esencia de bergamota. Todo con la finalidad de generar una formulación adecuada que garantizará una concentración de furanocumarinas, tal que, pueda lograrse el efecto terapéutico.

El encontrar un macerado adecuado permitirá, que en el momento de carecer de esencia de bergamota, el Hospital Roosevelt, pueda recurrir a través del personal del Laboratorio de producción, a la preparación de macerados de calidad que posean eficacia terapéutica, basada en el contenido de furanocumarinas, y con ello el aseguramiento de la calidad del producto que están dispensando.

V. OBJETIVOS

5.1 General

Formular una loción a partir de limón persa (*Citrus latifolia*), limón criollo (*Citrus aurantifolia*), Apio (*Apium graveolens*) y perejil (*Petroselinum crispum*), en una concentración igual o mayor de furanocumarinas a la que aporta la esencia de bergamota (*Citrus bergamia*) en el preparado galénico empleada en el Hospital Roosevelt de Guatemala para el tratamiento de vitíligo y psoriasis.

5.2 Específicos

5.2.1 Estandarizar un método de extracción de furanocumarinas a partir de limón persa (*Citrus latifolia*), limón criollo (*Citrus aurantifolia*), Apio (*Apium graveolens*) y perejil (*Petroselinum crispum*) para una posible sustitución de esencia de bergamota empleada en el Laboratorio de Producción de Farmacia Interna del Hospital Roosevelt de Guatemala.

5.2.2 Determinar la presencia de furanocumarinas y cuantificarlas en el extracto de limón persa (*Citrus latifolia*), limón criollo (*Citrus aurantifolia*), Apio (*Apium graveolens*) y perejil (*Petroselinum crispum*), mediante técnicas cromatográficas y espectrofotométricas.

5.2.3 Formular una loción para el tratamiento de vitíligo y psoriasis que aporte la cantidad de furanocumarinas similar a la esencia de bergamota.

5.2.4 Evaluar la calidad de la loción a base de las tres especies vegetales, mediante pruebas fisicoquímicas y fitoquímicas, en comparación con el estándar de esencia de bergamota.

5.2.5 Evaluar la actividad antioxidante de las maceraciones de las tres especies vegetales en estudio, mediante la prueba de captura de radicales libres DPPH y cuantificar flavonoides y fenoles para correlacionar dicha actividad.

VI. HIPÓTESIS

Por lo menos uno de los extractos etanólicos de limón (*Citrus aurantifolia*), limón persa (*Citrus latifolia*), apio (*Apium graveolens*) y perejil (*Petroselinum crispum*), presenta una concentración igual o mayor de furanocumarinas y/o compuestos fenólicos a la que aporta la esencia de bergamota en el preparado galénico empleado en el Hospital Roosevelt de Guatemala para el tratamiento de vitíligo.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Universo de trabajo y muestra

7.1.1 Población

Limón criollo (*Citrus aurantifolia*), limón persa (*Citrus latifolia*), apio (*Apium graveolens*) y perejil (*Petroselinum crispum*).

7.1.2 Muestra

Macerados de epicarpio de Limón criollo (*Citrus aurantifolia*) y limón persa (*Citrus latifolia*), hojas y tallos de apio (*Apium graveolens*) y perejil (*Petroselinum crispum*), escogidos a base de potencial comercial en los mercados de la capital de Guatemala.

7.2 Recursos

7.2.1 Humanos

7.2.1.1 Seminaristas: Nathalie Lucía Raquel Alvarez, Alejandra Betsabé López Morales y Sofía Magnolia Marroquín Tintí.

7.2.1.2 Asesor: Dra. Sully Margot Cruz Velásquez.

7.2.2 Institucionales

7.2.2.1 Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, LIPRONAT, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

7.2.2.2 Laboratorio de Cromatografía, Unidad de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

7.3 Materiales y métodos

7.3.1 Materiales

- Asperjador de vidrio.
- Balón aforado (10, 50 y 100 mL)
- Barilla de vidrio
- Beakers de vidrio
- Cámaras cromatográficas
- Cronómetro
- Embudo.
- Espátula
- Frascos de vidrio con tapa rosca.
- Gradillas para tubo de ensayo.
- Guantes de jardinería

7.3.2 Equipo

- Agitador tipo Vortex
- Balanza semianalítica y balanza analítica.
- Bomba de vacío.
- Campana de extracción de gases.
- Estufa Eléctrica.
- Espectrofotómetro Agilent 8453
- Lector de microplacas UV BIOTEK ELX 800.
- Micropipeteadores automáticos de 20 a 1000 µL
- Refrigeradora
- Sonificador

7.3.3 Reactivos

- Acetona 99%
- Acetato de etilo
- Ácido acético

- Guantes de nitrilo
- Lentes protectores
- Mascarillas desechables
- Micropipetas de 5-10 µL
- Papel encerado
- Papel filtro
- Papel Kraft
- Papel prensa
- Placa de microtitulación de 96 pocillos con fondo plano
- Placa para cromatografía fina de sílice 60F₂₅₄
- Termómetro en Centígrados
- Ácido clorogénico
- Ácido fórmico
- Ácido ascórbico
- Ácido kójico
- Ácido tricloroacético 10%
- Agua desmineralizada
- Cloroformo
- Cloruro Férrico 0.1%
- Diclorometano absoluto
- Dimetilsulfóxido (DMSO)
- DPPH(1,1-Difenil-2-picrilhidrazil)
- Éter de petróleo
- L-tirosina
- Psoraleno.
- Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico).
- Ter-butilhidroxianisol (BHA).
- Agua desmineralizada.

- Persulfato de potasio.
 - Eugenol.
 - Reactivo de Folin-Ciocalteu.
 - Etanol 95%,
 - Etanol 70%.
 - Etanol 50%.
 - Metanol.
 - Rutina.
 - Quercetina.
- Reactivos específicos para fase móvil de Cromatografía en capa fina.
 - Reactivos específicos para la determinación de metabolitos secundarios.

7.4 Procedimientos

7.4.1 Obtención del Material Vegetal

El material vegetal se compró en el Mercado de la Terminal zona 4 de Guatemala, el cual es el centro de distribución y abastecimiento de frutas, verduras, entre otras cosas, de los mercados y tiendas comunitarias del país. (Disponible en:http://www.mercadosdeguatemala.com/zona_4.html.) Se obtuvo 1 Kg de material vegetal a analizar, 100 g se emplearon en la realización del macerado. Se eligió el material vegetal que presentó de forma íntegra los órganos deseados, sin alteraciones en su color original. Las muestras se procesaron conforme las técnicas convencionales de transporte y almacenado basados en los principios aceptados de buenas prácticas de almacenamiento (WHO, 1998). Se trasladó el material vegetal en bolsas de papel prensa (Si se trasladan en bolsas de plástico deben de permanecer en las mismas el menor tiempo posible).

7.4.2 Lavado y fraccionamiento del organo vegetal

Lavar con abundante agua los epicarpios, hojas y tallos del material vegetal a analizar. Eliminar toda parte del órgano vegetal que se encuentre dañada. Secar la mayor cantidad de agua posible con una manta limpia. Fraccionar el órgano vegetal hasta un tamaño promedio de 0.5 cm² de tamaño, con tijera podadora. Tratar que en los macerados de *A. graveolens* y en los de *P. crispum*, se encuentre un 50% de tallos y un 50% de hojas como material vegetal.

7.4.3 Maceración de la materia vegetal

En un frasco de vidrio con tapa de rosca, introducir la mitad del solvente a utilizar (125 mL de etanol al 70 % y 95 % o 50 mL de etanol al 95%). Sumergir los 100 gramos de materia vegetal, posteriormente agregar el resto de solvente (125 mL de etanol al 70 % y 95 % o 50 mL de etanol al 95%). Cubrir el frasco con papel periódico para evitar el contacto del extracto con la luz, ya que algunos compuestos a extraer como las furanocumarinas son fotosensibles. Dejar macerar durante cinco días. En el quinto día se debe iniciar con las mediciones para evaluar cuantificación y estabilidad de furanocumarinas y otros compuestos. Preparar los macerados con las siguientes proporciones para su análisis:

Cuadro 2. Tipos de macerado a llevar a cabo en el estudio

Especie/órgano vegetal	EtOH 95%	EtOH 95 %	EtOH 70 %
Epicarpio de <i>Citrus latifolia</i>	100 g/250 mL (0.4 g/mL)	100 g/100 mL (1 g/mL)	100 g/250 mL (0.4 g/mL)
Epicarpio de <i>Citrus aurantifolia</i>	100 g/250 mL (0.4 g/mL)	100 g/100 mL (1 g/mL)	100 g/250 mL (0.4 g/mL)
Hojas y tallos de <i>Petroselinum crispum</i>	100 g/250 mL (0.4 g/mL)	100 g/100 mL (1 g/mL)	100 g/250 mL (0.4 g/mL)
Hojas y tallos de <i>Apium graveolens</i>	100 g/250 mL (0.4 g/mL)	100 g/100 mL (1 g/mL)	100 g/250 mL (0.4 g/mL)

Fuente: Datos experimentales Laboratorio LIPRONAT

7.4.4 Obtención de esencia de *Citrus bergamia* y control de calidad

Comprar la Esencia de Bergamota en el laboratorio LAFIMARQ, laboratorio en el cual compra el Hospital Roosevelt de Guatemala. Realizar control de calidad, en donde se medirá el índice de refracción y la densidad, para su posterior aceptación según especificaciones de certificado de calidad.

7.4.5 Elaboración de la curva de calibración de furanocumarinas

Empleando como estándar el psoraleno realizar la curva de calibración, empleando las siguientes 5 diluciones:

Cuadro 3. Concentraciones empleadas para curva de calibración estándar de psoraleno

No. De dilución	Concentraciones del estándar psoraleno empleadas (mg/mL de MetOH)
1	0.01
2	0.02
3	0.03

4	0.04
5	0.05

Fuente: Datos experimentales, laboratorio LIPRONAT

Realizar un barrido de lecturas en la región de UV-Visible de 200 a 900 nm, con la finalidad de identificar picos de mayor absorbancia. Realizar la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 310 nm. Realizar cinco curvas de calibración con un coeficiente de correlación (r^2) igual o mayor a 0.99. Elegir la de curva de calibración que posea el coeficiente de correlación (r^2) más cercano a uno.

7.4.6 Preparación de la dilución del macerado y de la esencia de *C. bergamia* para el análisis cuantitativo de furanocumarinas.

A partir del quinto día preparar una solución de 25µL de cada uno de los macerados en 10 mL de metanol. La solución se preparó a partir de 12 µL de esencia de *C. bergamia* disueltos en 50 mL de metanol.

7.4.7 Caracterización fitoquímica

La caracterización o perfil fitoquímico se realizó por pruebas convencionales de tamizaje fitoquímico por CCF (flavonoides, saponinas, alcaloides, cumarinas y amidas), usando para la visualización y caracterización de los metabolitos reactivos cromógenos universales y específicos para grupos funcionales.

7.4.8 Investigación de flavonoides, método CCF

Se extrajo 1 g de material pulverizado con 10 mL de metanol por 5 min en baño de María a 60°C; se filtró y aplicó sobre cromatoplasmas de silicagel 60 F254. Como estándar se utilizó la solución de flavonoides (quercetina, rutina, ácido clorogénico) al 0.05% en metanol (10 µL). Fase móvil: acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético-agua (100:11:11:27). Detección: Sin tratamiento químico: UV 254nm fluorescencia, zonas azules o amarillas. UV 365 nm, dependiendo de la estructura, fluorescen amarillo, azul o verde. Reactivo de Productos Naturales (NP/PEG). Fluorescencia intensa en UV-365 nm. Solución 1: solución metanólica al 1% de difenilboriloxietilamina (NP). Solución 2: solución etanólica al 5% de polietilenglicol 4000 (PEG).

7.4.9 Investigación de saponinas, método de CCF

2 g de material vegetal seco, se extrajeron con 10 mL de etanol al 70% con reflujo por 10 min y se evaporó a 5 mL. Se aplicaron 25-40 μ L en una cromatoplaque de silicagel 60 F254. Estándar de saponinas al 0.1% en metanol (10 μ L). Fase móvil: Cloroformo-metanol-agua (64:50:10). Detección: Vainillina-ácido sulfúrico y anisaldehído- H₂SO₄: zonas azules, violetas, amarillentas.

7.4.10 Investigación de aceite esencial por CCF

Se extrajo 1 g de material vegetal pulverizado con 10 mL de diclorometano agitando por 15 min. Se filtró y evaporó en baño de María (60°C) a sequedad. Disolver en 1 mL de tolueno y aplicar 20-50 μ L en cromatoplaque de silicagel 60 F₂₅₄. Estándar: solución de tolueno 1:30 de mentol, timol, anisaldehído, anetol, 1,8-cineol (3 μ L). Fase móvil: tolueno-acetato de etilo (93:7). Detección: anisaldehído-H₂SO₄. Zonas azules verdes, rojas y cafés en visible.

7.4.11 Investigación de cumarinas, método de CCF

A 1 g de material vegetal se le adicionó 10 mL de metanol y se calentó 30 min en baño de María. Se filtró y evaporó hasta 1 mL. Se aplicaron 20 μ L en una cromatoplaque de sílica gel 60 F254. Estándar: canela en metanol al 1%, umbeliferona, ácido p-cumárico, cumarina). Fase móvil: Tolueno-acetato de etilo (93:7). Detección: Sin tratamiento químico UV 254 nm fluorescencia. UV 365 nm todas las cumarinas muestras una intensa fluorescencia azul o verde-azul. Solución etanólica de hidróxido de potasio al 5-10%. UV-365 nm fluorescencia azul o verde.

7.4.12 Investigación de alcaloides, método general de CCF

1 g de material vegetal seco y molido, se agregó 1 mL de hidróxido de amonio al 10% (p/v) y se extrajo con 5 mL de metanol. Colocar en baño de María a 60°C durante 5 min. Filtrar y concentrar. Aplicar en una placa de sílica gel 60 F254, utilizando como estándar una solución de atropina y papaverina al 1% en metanol (10 μ L). Fase móvil: Tolueno-acetato de etilo-dietilamina (70:20:10). Detección: Sin tratamiento químico: UV 254nm fluorescencia, UV 365 nm algunos fluorescen azul o amarillo. Reactivo de Dragendorff: Zonas cafés o naranjas en visible, los colores no son estables.

7.4.13 Cuantificación de furanocumarinas

Con las diluciones de cada macerado y de la esencia de *C. bergamia* realizadas leer en el espectrofotometro a una longitud de onda de 310 nm. Con la curva de calibración con el mejor coeficiente de correlación y sus absorbancias, calcular la concentración de compuestos que absorben a 310 nm; en cada una de las disoluciones preparadas de los macerados y de la esencia de *C. bergamia*. Realizar la dilución del macerado y su correspondiente lectura, cada cinco días hasta que ya no hayan cambios en sus concentraciones.

7.4.14 Cuantificación de flavonoides

Cuantificación de flavonoides expresados como rutina (Córdova, 2009; Gudiel, 2009):
Solución madre: Pesar 1.5 g de material vegetal molida y pasar a un balón de reflujo, adicionar 100 ml de etanol al 60 % y poner a reflujo en un baño de agua durante una hora. Dejar enfriar y filtrar, pasar el filtrado a un balón aforado de 250 ml. Agregar otros 100 ml de etanol al 60 % al material vegetal y llevar nuevamente a reflujo durante una hora. Dejar enfriar, filtra y juntar con el filtrado anterior. Aforar hasta 250 ml con etanol al 60 %. Preparación de referencia: Pesar 10 mg de la sustancia de referencia de rutina y disolver en metanol absoluto llevando al aforo a 10 ml.
Solución 1: Colocar 2.0 ml de la muestra y 2.0 ml de cloruro de aluminio al 2 % en un matraz aforado de 25 ml y llevar al aforo con metanol absoluto. Solución 2: Colocar 2.0 ml de la muestra en un matraz de 25 ml y llevar al aforo con metanol absoluto. Solución 3: Colocar 2.0 ml de la solución de referencia y 2.0 ml de cloruro de aluminio al 2 % en un matraz de 25 ml y llevar al aforo con metanol absoluto. Solución 4: Colocar 2.0 ml de la solución de referencia en un matraz aforado de 25 ml y llevar al aforo con metanol absoluto. Procedimiento: Medir la absorbancia de la solución1, después de 25 minutos a 394 nm, usando como blanco la solución 2. Medir la absorbancia de la solución 3, después de 25 minutos a 394 nm, usando como blanco la solución 4.
Cálculos: % de flavonoides en base a rutina = $\frac{A1P2V2}{A2P1V1} * 100$
A2P1V1. Donde: A1 = Absorbancia de la muestra. A2 = Absorbancia de la solución de referencia. P1 = Peso de la muestra (mg). P2 = Peso del estándar. (mg). V1 = Volumen de aforo de la muestra (250ml). V2 = Volumen de aforo de la solución de referencia (10ml)

7.4.15 Determinación de actividad antioxidante

7.4.15.1 Método de CCF

Se aplicaron 10 µL de muestra y 5 µL de los estándares rutina, quercetina, vitamina C, Trolox y ácido clorogénico, (1 mg/mL) en una placa cromatográfica de silica gel 60F 254. Se colocó la placa en una cámara de vidrio saturada previamente con acetato de etilo: ácido acético: ácido fórmico:agua (100:11:11:26). Se secó y asperjó con DPPH (1 mg/mL en metanol). Interpretación: Los extractos con actividad antioxidante presentan decoloración del DPPH en las bandas respectivas (Medinilla, 2012).

7.4.15.2 Método micrométrico

Con pipetas automáticas se preparó una serie de pozos que contienen: Muestra, metanol y solución de DPPH 500 µM. Se pesó 0.5 g de material vegetal, y se diluyó en 5 mL de metanol y se agitó vigorosamente hasta extraer metabolitos completamente. Antes de realizar la curva de lectura se realiza una lectura directa del extracto, así: Pozo 1, blanco control, se agregó 50 µL de metanol; Pozo 2, control, se agregó 150 µL de solución de DPPH; pozo 3, blanco ensayo 1, se agregó 50 µL de muestra; pozo 4, ensayo 1, se agregó 50 µL de muestra y 150 µL de solución de DPPH; pozo 5, blanco ensayo 2, se agregó 15 µL de muestra y 35 µL de metanol; pozo 6, ensayo 2, se agregó 15 µL de muestra, 35 µL de metanol y 150 µL de DPPH. Se calculó el porcentaje de inhibición entre el 70 y 100% y se realizó la curva de lectura; con valores mayores se realizaron diluciones del extracto. Se preparó una curva de lectura con 8 pozos de reacción utilizando para cada pozo el blanco respectivo. La muestra y reactivos para cada pozo siguen las siguientes proporciones: Pozo 1: 50 µL de muestra y 150 de solución de DPPH; pozo 2: 45 µL de muestra, 5 µL de metanol y 150 µL de solución de DPPH; pozo 3: 40 µL de muestra, 10 µL de metanol y 150 µL de solución de DPPH; pozo 4: 35 µL de muestra, 15 de metanol y 150 µL de solución de DPPH; pozo 5: 30 µL de muestra, 20 µL de metanol y 150 µL de solución de DPPH; pozo 6: 25 µL de muestra, 25 µL de metanol y 150 µL de solución de DPPH; pozo 7: 20 µL de muestra, 30 de metanol y 150 µL de solución de DPPH; pozo 8: 15 µL de muestra, 35 µL de metanol y 150 µL de solución de DPPH. A cada pozo se le hizo el respectivo blanco el cual incluye la misma cantidad de muestra y metanol. La microplaca se agitó en un vortex para placas durante 30 seg y se incubó a temperatura ambiente protegiéndolas de la luz durante 30 min. Se leyó en un fotómetro de microplacas a 490 nm. Para calcular el porcentaje de inhibición de cada pozo de reacción se utilizó la siguiente fórmula: $(\text{Absorbancia del control} - \text{Absorbancia del ensayo}) / \text{Absorbancia del}$

control*100. Con los valores de % de inhibición de la curva de lectura (Y) y la concentración aproximada (X) se realizó la regresión lineal y se calculó el valor de r^2 , el cual debe ser lo más cercano posible a 1 para tomar como válida la curva realizada.

7.4.15.3 Determinación de los compuestos fenólicos, método micrométrico

Se preparó una curva patrón con ácido gálico disuelto en agua en concentraciones de 50, 250, 500, 1000 y 1500 mM. En una placa de 96 micropozos se colocó el blanco de reacción en el primer pozo con 25 μ L de metanol, en los siguientes 5 pozos se colocaron las diluciones para la curva patrón de ácido gálico, en los siguientes pozos se colocaron 25 μ L de los extractos, y luego a todos los pozos se agregó 50 μ L de reactivo de Folin y 200 μ L de Na_2CO_3 700 mM. Se mezcló bien la placa y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Se realizó la lectura en un espectrofotómetro de microplacas a 630 nm. Utilizando una curva patrón se calculó la concentración de compuestos fenólicos totales expresados como equivalentes de ácido gálico/g de peso seco (Waterhouse, 2007).

7.4.16 Cuantificación de la actividad Inhibitoria de la tirosinasa

Para el porcentaje de inhibición de la actividad tirosinasa se emplearon diferentes diluciones de los controles, ácido kójico y omeprazol, de 10, 25, 50, 75 y 100 μ g/mL; así como de las diferentes muestras se preparó una curva de cinco diluciones, cada estándar y muestra se trabajó por quintuplicado en tres diferentes corridas, para la elaboración de la curva se tomó en cuenta la concentración de la dilución y el porcentaje de inhibición que presentó, dicho porcentaje se calculó con la siguiente fórmula: $\text{Absorbancia del blanco} - \text{absorbancia de la muestra} * 100 = \% \text{ Absorbancia}$. De la curva trabajada se determinó la ecuación de la recta y se esperaba obtener un r^2 entre 0.95 a 0.99, para considerar válida la corrida. A partir de la ecuación de la recta se determinó el IC_{50} . Empleando la ecuación de la recta del ácido kójico, las absorbancia de la dilución de la muestra que presentó una inhibición entre 60-70%, los datos de dilución y el peso de la muestra se determinó la cantidad de ácido kójico en mg de extracto de muestra analizado; y el promedio y desviación estándar de cada muestra.

7.4.17 Preparación de la loción propuesta en este trabajo para tratar el vitíligo

Cuando ya se haya alcanzado una concentración de furanocumarinas constante, se prepara la Loción propuesta en este estudio. La cual estará conformada por el macerado que más furanocumarinas y compuestos fenólicos haya presentado. Prepararla de la siguiente manera:

- Vitix lemon:

Cáscara de: <i>C. latifolia</i> y/o <i>C. aurantifolia</i>	100 g
Etanol al 70%	250 mL

- Vitix jil:

Hoja y tallos de <i>P. crispum</i>	100 g
Etanol al 70%	250 mL

7.4.18 Análisis de la loción

Se realizaron los siguientes parámetros:

7.4.18.1 Pruebas fisicoquímicas:

- Características organolépticas: color, olor y textura.
- Características fisicoquímicas: pH y densidad relativa. pH: se tomó muestra de 10 mL de la loción a volumen en un tubo de ensayo y se midió por potenciometría. Se sumergió el electrodo dentro de la muestra para obtener el valor del pH. Como se realizaron diferentes mediciones sucesivamente, se lavó el electrodo con agua desionizada entre cada medición (Medinilla, 1999).
- Densidad relativa: se utilizó un picnómetro previamente lavado y seco. Una vez obtenidos los pesos necesarios, se determinó la densidad relativa. En donde se empleó como especificación, el rango que se generará entre los valores de densidad del etanol al 70% y el agua desmineralizada.

Densidad del etanol al 70%: 0.789 g/ml.

Densidad del agua desmineralizada: 1 g/ml (Remington, 2000).

7.4.18.2 Determinación de la actividad antioxidante.

7.4.18.3 Determinación características organolépticas:

- Color: se tomó una muestra de 10 mL en un tubo de ensayo y se verificó el color de la loción.

- Olor: se tomó una tira de papel filtro de 10 cm de largo por 1 cm de ancho y se introdujo uno de los extremos en una muestra de 5 mL de loción. Se realizó una encuesta a 25 personas sanas para oler y describir las muestras. Estas personas debieron firmar un consentimiento informado previo a realizar las pruebas.
- Examen físico: Turbidez, sedimentación y separación de fases. Se tomó una muestra de 10 mL de loción en un tubo de ensayo, la muestra debió presentarse traslúcida, no debió presentar residuos sólidos y debía estar homogénea, en una sola fase sin residuos sólidos.

7.4.19 Evaluación de la aceptación del producto

Para determinar la aceptación que tendría el paciente respecto a la loción se realizaron 25 encuestas a personas sanas, teniendo que evaluar según su percepción y criterio, las siguientes características:

- Color.
- Olor.
- Presentación.
- Forma de aplicarla.

7.4.20 Estudio de estabilidad acelerada de la loción propuesta

Preparar una solución madre de cada loción propuesta en este estudio. De cada una de las soluciones madre tomar un alícuota y preparar una disolución. Con las diluciones realizadas leer en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 310 nm. Con la curva de calibración con el mejor coeficiente de correlación y sus absorbancias, calcular la concentración de compuestos que absorben a 310 nm; en cada una de las disoluciones preparadas. Realizar la dilución de la loción y su correspondiente lectura para determinar sus concentraciones de la sustancia activa, en el tiempo cero, a los 90 días y a los 180 días, a una temperatura de $40\pm 2^{\circ}\text{C}$, en cámara de estabilidad.

7.5 **Diseño de la investigación**

Se realizó un estudio experimental de tipo descriptivo.

7.6 **Diseño estadístico**

Se realizó un muestreo no probabilístico a conveniencia de las distintas especies vegetales en estudio. Se prepararon doce macerados, tres para cada órgano vegetal analizado, variando

concentración de solvente extractor y proporción solvente-materia vegetal. Posteriormente se preparó una curva de calibración a 310 nm usando como estándar Psoraleno y posteriormente se midió la concentración de furanocumarinas en cada macerado. Se determinaron las absorbancias de los macerados producidos. Para cada uno de los macerados que presente mayor concentración de furanocumarinas y otros compuestos se realizaron las pruebas cualitativas de coloración y de cromatografía en capa fina de los metabolitos secundarios de cumarinas, flavonoides, saponinas, antraquinonas, taninos y aceites esenciales con la finalidad de realizar un análisis descriptivo. De estos macerados se produjo la loción propuesta en este estudio y se realizó el control de calidad y estudio de estabilidad durante 6 meses. Por último se analizó en las especies que presentan mayor cantidad de furanocumarinas, la capacidad antioxidante que se correlacionan con la actividad antioxidante y otros metabolitos secundarios con actividad antioxidantes, como fenoles y flavonoides que se correlacionan con la actividad antioxidante.

VIII. RESULTADOS

8.1 Obtención del material vegetal

En el cuadro número cuatro se puede observar la procedencia del material vegetal, la parte empleada para la producción de los macerados del estudio. Así como la evaluación de integridad del material vegetal y la cantidad obtenida.

Cuadro 4. Recolección del material vegetal, proveniente del mercado de la terminal zona 4, Guatemala, Guatemala

Nombre Científico De la planta	Nombre Común De la planta	Parte vegetal a estudiar	Cantidad del Material Vegetal Recolectado	Estado
<i>Citrus latifolia</i>	Limón persa	Epicarpio del fruto	1.0 Kg	Fresco
<i>Citrus aurantifolia</i>	Limón criollo	Epicarpio del fruto	1.0 Kg	Fresco
<i>Apium graveolens</i>	Apio	Tallo y hojas	1.0 Kg	Fresco
<i>Petroselinum crispum</i>	Perejil	Tallo y hojas	1.0 Kg	Fresco

Fuente: Datos experimentales, junio 2012.

8.2 Control del proceso de preparación de los macerados

En el cuadro número cinco se observa el control del proceso de preparación de los macerados analizados.

Cuadro 5. Control de procedimiento de preparación de macerado

No.	Material vegetal	Fecha de preparación	Lavado de material	Fraccionamiento	Protección de macerado
1	Epicarpio de fruto de <i>C. latifolia</i>	29/6/2012	Cumple	Cumple	Cumple
2	Epicarpio de fruto de <i>C. aurantifolia</i>	29/6/2012	Cumple	Cumple	Cumple
3	Tallo y hojas de <i>A. graveolens</i>	29/6/2012	Cumple	Cumple	Cumple
4	Tallo y hojas de <i>P. crispum</i>	29/6/2012	Cumple	Cumple	Cumple

Fuente: Datos experimentales, junio de 2012

8.3 Control de calidad de la esencia de *C. bergamia*

En los cuadros número seis se visualiza el control de calidad de la esencia de bergamota, basado en dos propiedades fisicoquímicas importantes: el índice de refracción y densidad.

Cuadro 6. Índice de refracción y densidad de la esencia de bergamota usada como control a 23⁰C

Prueba	Valor reportado	Especificación	Resultado
Índice de refracción	1.473 ± 0.003	1.450 - 1.480	Cumple
Densidad	0.855 ± 0.015	0.835 - 0.873	Cumple

Fuente: Datos experimentales LIPRONAT, 12/6/2012, LUIZI fragrance compounds.

8.4 Curva de Calibración

En el cuadro número siete se presenta los picos de máxima absorbancia que presento el Psoraleno al realizar el barrido espectrofotométrico de 200 nm a 900 nm. En el cuadro número ocho se puede observar las concentraciones y absorbancias de las disoluciones de estándar de Psoraleno empleadas para la preparación de la curva de calibración que se usó para cuantificar a las furanocumarinas presentes en los macerados.

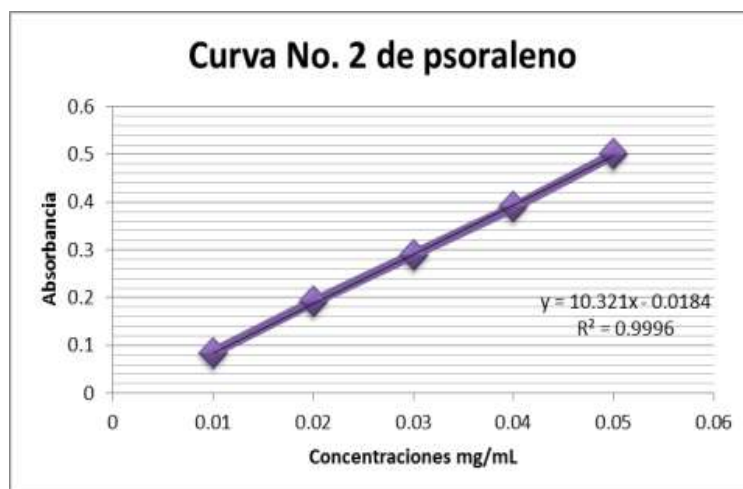
Cuadro 7. Concentración y absorbancia de las diluciones del estándar de Psoraleno en la curva de calibración.

Concentración mg/mL	Absorbancia
0.010	0.084
0.020	0.191
0.030	0.289
0.040	0.390
0.050	0.501

Fuente: datos experimentales 4/6/2012 (LIPRONAT)

En la gráfica número uno se observa la curva de calibración de estándar de psoraleno que se empleó para la cuantificación de furanocumarinas.

Gráfica 1. Curva de calibración estándar de psoraleno



Fuente: datos experimentales 4/6/2012(LIPRONAT)

El coeficiente de correlación lineal fue de 0.9996 y la ecuación de la recta de la curva de calibración que se empleó para la medición de las furanocumarinas fue $Y=10.321x-0.0184$.

8.5 Determinación de macerado idóneo

En el cuadro número nueve y gráficas dos, tres y cuatro se observa el tiempo necesario para que se lleve a cabo una total extracción de furanocumarinas y otros compuestos que absorben a 310 nm, además se visualiza cual es la mejor concentración del solvente extractor y cual es la mejor proporción en la relación solvente-materia vegetal.

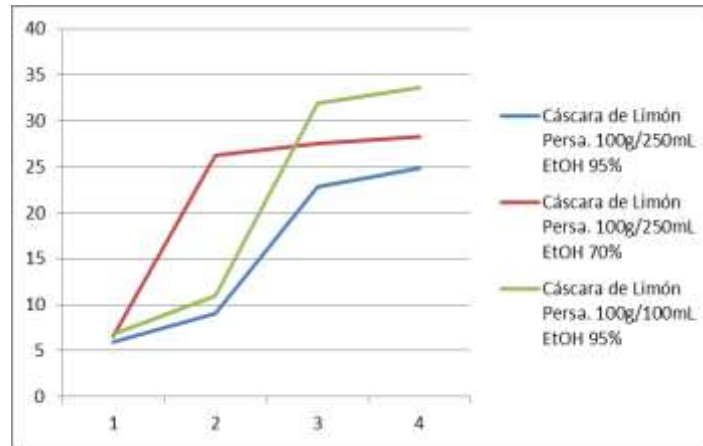
Cuadro 8. Composición de macerado y el tiempo de maceración idóneo para la extracción de furanocumarinas.

Tipo de Macerado	Día 5 (mg/mL psoraleno)	Día 15 (mg/mL psoraleno)	Día 30 (mg/mL psoraleno)	Día 45 (mg/mL psoraleno)
LP 100g:250ml,EtOH 95%	6.01	9.06	22.86	24.90
LP 100g:250ml, EtOH 70%	6.63	26.25	27.49	28.23
LP 100g:100ml, EtOH 95%	6.78	10.92	31.91	33.56
LC 100g:250ml, EtOH 95%	21.34	15.26	27.07	25.53
LC 100g:250ml, EtOH 70%	6.61	27.11	22.11	27.56
LC 100g:100ml, EtOH 95%	7.02	25.32	28.02	28.65
P 100g:250ml, EtOH 95%	6.02	15.26	24.03	24.03
P 100g:250ml, EtOH 70%	7.08	14.62	26.35	25.23
P 100g:100ml, EtOH 95%	3.56	12.32	25.63	26.35
A 100g:250ml, EtOH 95%	1.23	04.23	04.62	04.23
A 100g:250ml, EtOH 70%	1.62	05.45	08.23	08.25
A 100g:100ml, EtOH 95%	1.43	06.65	08.23	08.56

*Nota: A= Tallo y hojas de *Apium graveolens*; P= Tallo y hojas de *Petroselinum crispum*; LC= Epicarpio de *Citrus aurantifolia*; LP= Epicarpio de *Citrus latifolia*.

Fuente: Datos experimentales LIPRONAT, Julio 2012.

Gráfica 2. Concentración de furanocumarinas en extractos de *C. latifolia*

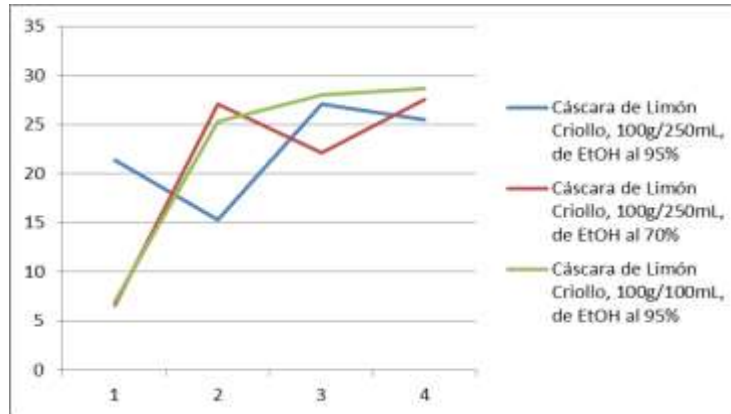


Fuente: Datos experimentales LIPRONAT, Julio 2012, (cuadro 11)

*Nota: 1) día 5; 2) día 15; 3) día 30; 4) día 45.

**Eje vertical= concentración de furanocumarinas; eje horizontal= días

Gráfica 3. Concentración de furanocumarinas en extractos de *C. aurantifolia*

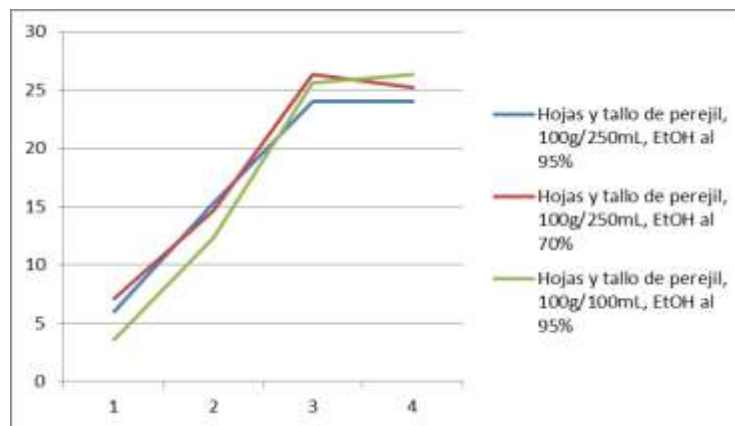


Fuente: Datos experimentales LIPRONAT, Julio 2012, (cuadro 11)

*Nota: 1) día 5; 2) día 15; 3) día 30; 4) día 45.

**Eje vertical= concentración de furanocumarinas; eje horizontal= días

Gráfica 4. Concentración de furanocumarinas en extractos de *P. crispum*

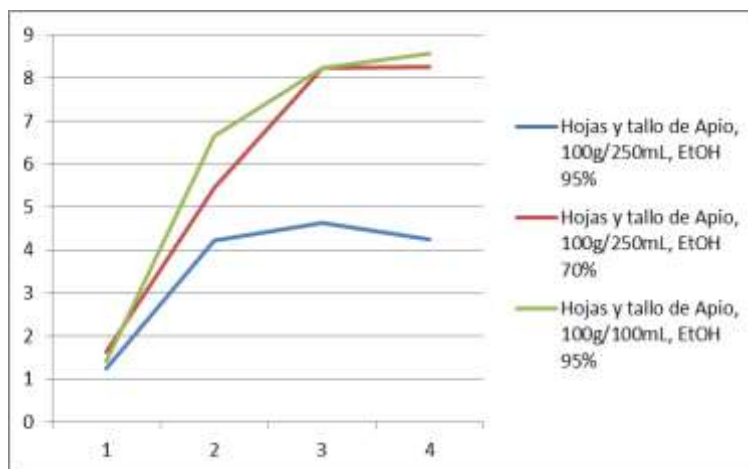


Fuente: Datos experimentales LIPRONAT, Julio 2012.

*Nota: 1) día 5; 2) día 15; 3) día 30; 4) día 45.

**Eje vertical= concentración de furanocumarinas; eje horizontal= días

Gráfica 5. Concentración de furanocumarinas en extractos de *A. graveolens*



Fuente: Datos experimentales LIPRONAT, Julio 2012.

*Nota: 1) día 5; 2) día 15; 3) día 30; 4) día 45.

**Eje vertical= concentración de furanocumarinas; eje horizontal= días

8.6 Cuantificación del volumen que será necesarios para reemplazar a los 10 mL de esencia de *C. bergamia* usados en la loción para tratamiento el vitíligo producida por el Hospital Roosevelt

En el cuadro número diez y gráfica número seis se visualizan tres lecturas a 310 nm, de cada uno de los macerados que presentaron mayor concentración de furanocumarinas, y sus respectivos volúmenes equivalentes a los 10 mL de esencia de *C. bergamia*.

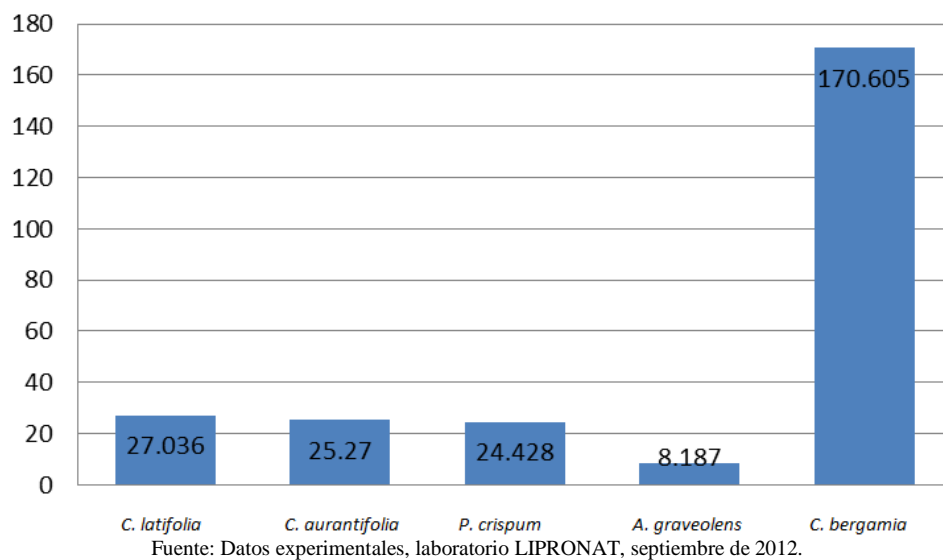
Cuadro 9. Volumen de los macerados necesarios para reemplazar los 10 mL de esencia de *C. bergamia*

Especie	Macerado	mg/mL de furanocumarinas expresadas como psoraleno	Volumen de macerado, equivalente a la esencia de <i>C. bergamia</i> en relación a la concentración de psoraleno
<i>C. latifolia</i>	100 g de materia vegetal en 250 mL de etanol al 70%	27.03 ± 0.66	63.10 mL de macerado de Limón Persa son equivalentes a 10 mL de esencia de bergamota.
<i>C. aurantifolia</i>	100 g de materia vegetal en 250 mL de etanol al 70%	25.27 ± 0.60	67.51 mL de macerado de Limón Criollo son equivalentes a 10 mL de esencia de bergamota
<i>P. crispum</i>	100 g de materia vegetal en 250 mL de etanol al 70%	24.42 ± 0.90	69.84 mL de macerado de Perejil son equivalentes a 10 mL de esencia de bergamota
<i>A. graveolens</i>	100 g de materia vegetal en 250 mL de etanol al 70%	8.18 ± 0.47	208.38 mL de macerado de Apio son equivalentes a 10mL de esencia de bergamota
<i>C. bergamia</i>	Esencia pura densidad de 0.8546 mg/mL	170.60 ± 0.32	NA

Fuente: Datos experimentales, laboratorio LIPRONAT, septiembre de 2012.

*Nota: NA= no aplica

Gráfica 6. Concentración de Furanocumarinas en mg/mL, a través de los días.



8.7 Tamizaje fitoquímico

El cuadro 11 y 12 muestra la descripción de las bandas detectadas en el análisis de cromatografía en capa fina mediante el tamizaje fitoquímico realizado para detectar la presencia de: Alcaloides, flavonoides, cumarinas, aceites volátiles, saponinas y antraquinonas en las muestras estudiadas; además de evidenciar el poder antioxidante de las muestras en estudio, por medio de la prueba de DPPH.

Cuadro 10. Descripción de las bandas presentes en la cromatografía en capa fina realizadas en el tamizaje fitoquímico.

Muestra	Prueba	Banda	Color	Rf	Muestra	Prueba	Banda	Color	Rf
<i>C. latifolia</i>	Alcaloides	1	Azul	0.09	<i>A. graveolens</i>	Alcaloides	1	Verde	0.09
		2	Azul	0.13		2	Rojo	0.80	
		3	Amarillo	0.25		Flavonoides	1	Anaranjado	0.71
		4	Amarillo	0.51		Cumarinas	1	Azul	0.09
		5	Azul	0.75		2	Azul	0.46	
		6	Rojo	0.78		3	Rojo	0.60	
		7	Rojo	0.80		4	Verde	0.81	
	Flavonoides	1	Azul	0.58		Saponinas	1	Amarillo	0.78
		2	Azul	0.60		2	Café	0.81	
		3	Amarillo	0.69		3	Rojo	0.86	
	Cumarinas	1	Verde	0.19	Antraquinonas	1	Amarillo	0.39	
		2	Azul	0.26	2	Violeta	0.79		
		3	Verde	0.63	DPPH		Blanco	++	
		4	Verde	0.72	<i>P. crispum</i>	Alcaloides	1	Rojo	0.06
	Aceites volátiles	1	Café	0.39		2	Amarillo	0.25	
		2	Café	0.63		3	Amarillo	0.50	
		3	Café	0.69		4	Rojo	0.80	
		4	Café	0.80		Flavonoides	1	Amarillo	0.69
	Saponinas	1	Violeta	0.63		Cumarinas	1	Verde	
		2	Amarillo	0.70		2	Verde	0.20	
3		Violeta	0.78	3		Rojo	0.38		
4		Amarillo	0.81	4		Anaranjado	0.46		
5		Violeta	0.86	5		Amarillo	0.60		
Antraquinonas	1	Rojo	0.13	Saponinas	1	Café	0.78		
	2	Rojo	0.16	2	Rojo	0.85			
	3	Amarillo	0.31	Antraquinonas	1	Amarillo	0.38		
DPPH		Blanco	++++	2	Violeta	0.61			
				3	Violeta	0.73			

Fuente: Datos experimentales, laboratorio LIPRONAT, diciembre de 2013

Cuadro 11. Descripción de las bandas presentes en la cromatografía en capa fina realizadas en el tamizaje fitoquímico.

Muestra	Prueba	Banda	Color	Rf	Muestra	Prueba	Banda	Color	Rf	
<i>C. aurantifolia</i>	Alcaloides	1	Azul	0.08	<i>C. bergamia</i>	DPPH	4	Amarillo	0.81	
		2	Azul	0.13			Blanco	++		
		3	Amarillo	0.25			Alcaloides	1	Azul	0.09
		4	Azul	0.41			2	Azul	0.13	
		5	Amarillo	0.51			3	Amarillo	0.25	
		6	Azul	0.75			4	Amarillo	0.51	
		7	Rojo	0.78			5	Azul	0.75	
		8	Rojo	0.80			6	Rojo	0.78	
	Flavonoides	1	Azul	0.58		Flavonoides	7	Rojo	0.80	
		2	Azul	0.60			1	Azul	0.58	
		3	Amarillo	0.69			2	Azul	0.60	
	Cumarinas	1	Verde	0.19		Cumarinas	3	Amarillo	0.69	
		2	Verde	0.27			1	Verde	0.19	
		3	Azul	0.54			2	Azul	0.26	
		4	Azul	0.66			3	Verde	0.63	
	Aceites volátiles	1	Café	0.40		Aceites volátiles	4	Verde	0.72	
		2	Café	0.60			1	Café	0.39	
		3	Café	0.69			2	Café	0.63	
	Saponinas	4	Café	0.80		Saponinas	3	Café	0.69	
		1	Violeta	0.68			4	Café	0.80	
2		Amarillo	0.76	1	Violeta		0.63			
3		Violeta	0.81	2	Amarillo		0.70			
Antraquinonas	4	Amarillo	0.85	Antraquinonas	3	Violeta	0.78			
	1	Amarillo	0.13		4	Amarillo	0.81			
	2	Amarillo	0.25		5	Violeta	0.86			
	3	Rojo	0.33		1	Rojo	0.13			
DPPH	4	Rojo	0.78	DPPH	2	Rojo	0.16			
		Blanco	+++		3	Amarillo	0.31			
						Blanco	++++			
Estándares:	Alcaloides	Atropina	Anaranjado	0.29	Estándares:	Flavonoides	Rutina	Verde	0.19	
		Papaverina	Anaranjado	0.56			Ácido clorogénico	Celeste	0.28	
Estándares:	Cumarinas	Estándar de cumarinas	Azul	0.06	Estándares:	Aceites volátiles	Linalol	Morado	0.40	
			Verde	0.29			Isopulegol	Rojo	0.35	
			Verde	0.48						
Estándares:	Saponinas	Diosgenina	Negro	0.70	Estándares:	Antraquinonas	Antrona	Rojo	0.12	

Fuente: Datos experimentales, laboratorio LIPRONAT, diciembre de 2013

8.8 Porcentaje de flavonoides expresados como rutina.

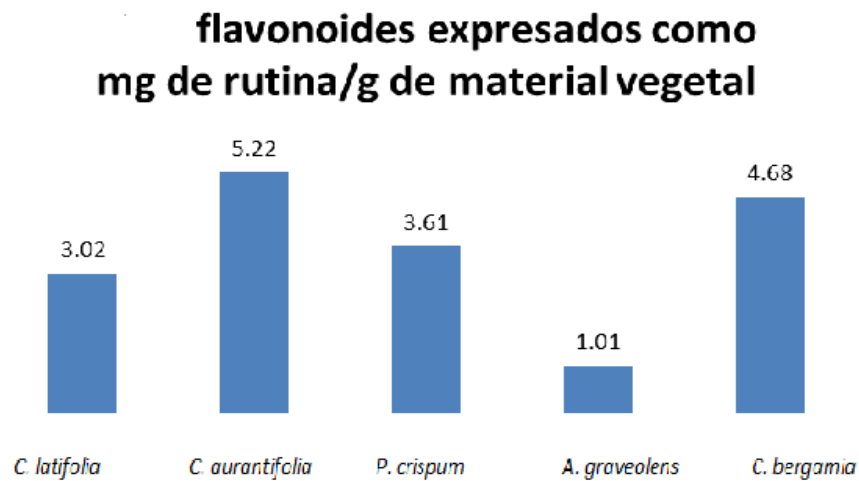
En el cuadro número trece y gráfica número siete se presenta el porcentaje de flavonoides presentes en las especies vegetales en estudio, flavonoides expresados como rutina, cada una con su respectiva desviación estándar.

Cuadro 12. Concentración de flavonoides expresados como rutina

Extracto	% de flavonoides expresados como mg de rutina/g de material vegetal
LC	3.02 ±0.38
LP	5.22±0.93
P	3.61±0.25
A	1.01±0.15
B	4.68±0.23

Fuente: Datos experimentales, laboratorio LIPRONAT, enero 2013

Gráfica 7. Concentración de flavonoides expresados en mg de rutina/ g de materia vegetal



Fuente: Datos experimentales, laboratorio LIPRONAT, enero 2013

8.9 Determinación de actividad antioxidante a través del método micrométrico de DPPH y cuantificación de fenoles totales.

Se determinó la actividad antioxidante a través del método micrométrico de DPPH, y como se puede observar en el cuadro número catorce, el CI50 menor lo presentó *C. aurantifolia*, y los que presentaron el CI50 mayor fueron *P. crispum*, *C. latifolia* y *A. graveolens*. Así mismo, fue equivalente el resultado de concentración de ácido gálico en los macerados de las cuatro especies en estudio. Se puede observar en el cuadro, que *C. latifolia* presentó similar actividad antioxidante al ácido ascórbico y *C. aurantifolia* presentó similar actividad a rutina.

Cuadro 13. Actividad antioxidante de DPPH y cuantificación de fenoles totales por medio de métodos micrométricos

Especie	Actividad antioxidante expresada como CI ₅₀ mg/mL	mg equivalentes de ácido gálico en un extracto de 1 mg/mL
A	1.05	0.15
LC	0.18	2.51
LP	0.10	3.83
P	0.21	0.85
Ácido Ascórbico	0.10	NA
Quercetina	0.06	NA
Rutina	0.19	NA
TBHQ	0.11	NA
<i>C. bergamia</i>	0.11	3.00

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio LIPRONAT, abril 2013.

NA= no aplica

8.10 Cuantificación de actividad inhibitoria de tirosinasa

En el cuadro número quince y gráfica número ocho se puede visualizar como las especies que presentaron la menor actividad inhibitoria de tirosinasa, fueron *C. latifolia*, *P. crispum* y *C. aurantifolia*; mientras que el que presentó la mayor actividad fue *A. graveolens*.

Cuadro 14. Actividad inhibitoria de tirosinasa determinada por metodología micrométrica

Espece	Disolvente	CI ₅₀ µg/mL	Intervalo de confianza al 95%	µg EAK/mg
<i>P. crispum</i>	EtOH 70 %	82.40± 0.88	81.50-83.30	0.10 ± 0.03
<i>A. graveolens</i>	EtOH 70 %	77.50 ± 1.40	76.10-78.90	0.09 ± 0.01
<i>C. aurantifolia</i>	EtOH 70 %	81.30 ± 0.50	80.80-81.80	0.10 ± 0.01
<i>C. latifolia</i>	EtOH 70 %	117.70 ± 1.20	116.50-118.90	0.15 ± 0.01
Ácido kójico	Estándar	1.20 ± 0.07	1.10 -1.30	NA
<i>C. bergamia</i>	Estándar	123.20 ± 0.12	123.08 – 123.32	0.18 ± 0.20

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio LIPRONAT, mayo 2013

EAK: Equivalentes de ácido kójico por mg de extracto NA: No aplica

CI50: Concentración Inhibitoria Media.

8.11 Estudios de estabilidad acelerada

Del cuadro número diesiseis al veintiuno se muestran los resultados obtenidos de la medición de los parámetros de calidad establecidos para la loción con actividad antioxidante, evaluados a los tiempos: 0, 90 y 180 días para los tres lotes. A, B y C.

Cuadro 15. Estudio de estabilidad acelerada tiempo cero, loción *Citrus latifolia*, Vitix Lemon.

Parámetro	Especificación	Resultado		
		Tiempo 0 días		
		Lote A	Lote B	Lote C
Características organolépticas				
Color	Verde oscuro	Cumple	Cumple	Cumple
Olor	Característico cítrico	Cumple	Cumple	Cumple
Examen Físico				
Turbidez	No presenta turbidez	Cumple	Cumple	Cumple
Sedimentación	No presenta sedimentación	Cumple	Cumple	Cumple
Características fisicoquímica				
pH	5.54 – 6.04	Cumple	Cumple	Cumple
Densidad	0.78-1.00 g/mL	Cumple	Cumple	Cumple

Fuente: datos experimentales Laboratorio Donovan Werke Mayo 2013

Cuadro 16. Estudio de estabilidad acelerada tiempo cero, loción *Petroselinum crispum* Vitix Jil.

Parámetro	Especificación	Resultado		
		Tiempo 0 días		
Características organolépticas		Lote A	Lote B	Lote C
Color	Verde oscuro	Cumple	Cumple	Cumple
Olor	Característico alcohólico	Cumple	Cumple	Cumple
Examen Físico				
Turbidez	No presenta turbidez	Cumple	Cumple	Cumple
Sedimentación	No presenta sedimentación	Cumple	Cumple	Cumple
Características fisicoquímica				
pH	5.54 – 6.04	Cumple	Cumple	Cumple
Densidad	0.78-1.00g/mL	Cumple	Cumple	Cumple

Fuente: datos experimentales Laboratorio Donovan Werke Mayo 2013

Cuadro 17. Estudio de estabilidad acelerada tiempo de 90 días, loción *Citrus latifolia*, Vitix Lemon.

Parámetro	Especificación	Resultado		
		Tiempo 90 días		
Características organolépticas		Lote A	Lote B	Lote C
Color	Verde oscuro	Cumple	Cumple	Cumple
Olor	Característico cítrico	Cumple	Cumple	Cumple
Examen Físico				
Turbidez	No presenta turbidez	Cumple	Cumple	Cumple
Sedimentación	No presenta sedimentación	Cumple	Cumple	Cumple
Características fisicoquímica				
pH	5.54 – 6.04	Cumple	Cumple	Cumple
Densidad	0.78-1.00g/mL	Cumple	Cumple	Cumple

Fuente: datos experimentales Laboratorio Donovan Werke Agosto 2013

Cuadro 18. Estudio de estabilidad acelerada tiempo de 90 días, loción *Petroselinum crispum*,

Vitix Jil.

Parámetro	Especificación	Resultado		
		Tiempo 0 días		
		Lote A	Lote B	Lote C
Características organolépticas				
Color	Verde oscuro	Cumple	Cumple	Cumple
Olor	Característico alcohólico	Cumple	Cumple	Cumple
Examen Físico				
Turbidez	No presenta turbidez	Cumple	Cumple	Cumple
Sedimentación	No presenta sedimentación	Cumple	Cumple	Cumple
Características fisicoquímica				
pH	5.54 – 6.04	Cumple	Cumple	Cumple
Densidad	0.78-1.00g/mL	Cumple	Cumple	Cumple

Fuente: datos experimentales Laboratorio Donovan Werke Agosto 2013

Cuadro 19. Estudio de estabilidad acelerada tiempo de 180 días, loción *Citrus latifolia*, Vitix

Lemon

Parámetro	Especificación	Resultado		
		Tiempo 180 días		
		Lote A	Lote B	Lote C
Características organolépticas				
Color	Verde oscuro	Cumple	Cumple	Cumple
Olor	Característico cítrico	Cumple	Cumple	Cumple
Examen Físico				
Turbidez	No presenta turbidez	Cumple	Cumple	Cumple
Sedimentación	No presenta sedimentación	Cumple	Cumple	Cumple
Características fisicoquímica				
pH	5.54 – 6.04	Cumple	Cumple	Cumple
Densidad	0.78-1.00g/mL	Cumple	Cumple	Cumple

Fuente: datos experimentales Laboratorio Donovan Werke Octubre 2013

Cuadro 20. Estudio de estabilidad acelerada tiempo de 180 días, loción *Petroselinum crispum*, Vitix Jil.

Parámetro	Especificación	Resultado		
		Tiempo 180 días		
Características organolépticas		Lote A	Lote B	Lote C
Color	Verde oscuro	Cumple	Cumple	Cumple
Olor	Característico alcohólico	Cumple	Cumple	Cumple
Examen Físico				
Turbidez	No presenta turbidez	Cumple	Cumple	Cumple
Sedimentación	No presenta sedimentación	Cumple	Cumple	Cumple
Características fisicoquímica				
pH	5.54 – 6.04	Cumple	Cumple	Cumple
Densidad	0.78-1.00g/mL	Cumple	Cumple	Cumple

Fuente: datos experimentales Laboratorio Donovan Werke Octubre 2013

8.12 Cuantificación de furanocumarinas en el control de calidad y estabilidad

En el cuadro número veintidos y gráfica nueve y diez se puede observar la concentración de furanocumarinas, usadas como marcador de estabilidad a través del tiempo en cada una de las lociones estudiadas.

Cuadro 21. Concentración de furanocumarinas (mg/mL) expresada como psoraleno.

Nombre de la Loción	0 días	90 días	180 días
Vitix Lemon	27.23 ± 0.75	27.03 ± 0.41	27.13 ± 0.56
Vitix Jil	24.03 ± 0.34	24.06 ± 0.65	23.98 ± 0.25

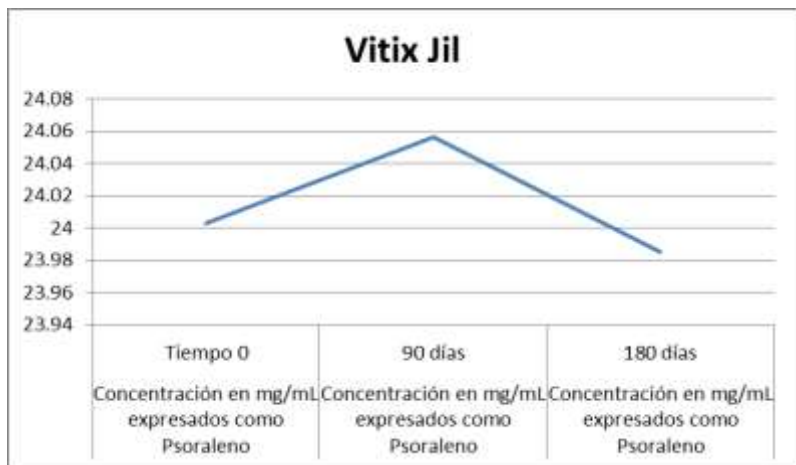
Fuente: Datos experimentales LIPRONAT, Mayo, Agosto y Octubre 2013.

Gráfica 8. Concentración de furanocumarinas como marcador de calidad de la loción Vitix lemon en el estudio de estabilidad.



Fuente: Datos experimentales LIPRONAT, mayo, agosto y octubre 2013.

Gráfica 9. Concentración de furanocumarinas como marcador de calidad de la loción Vitix Jil en el estudio de estabilidad.



Fuente: Datos experimentales LIPRONAT, mayo, agosto y octubre 2013.

8.13 Resultados del ensayo de aceptabilidad del producto

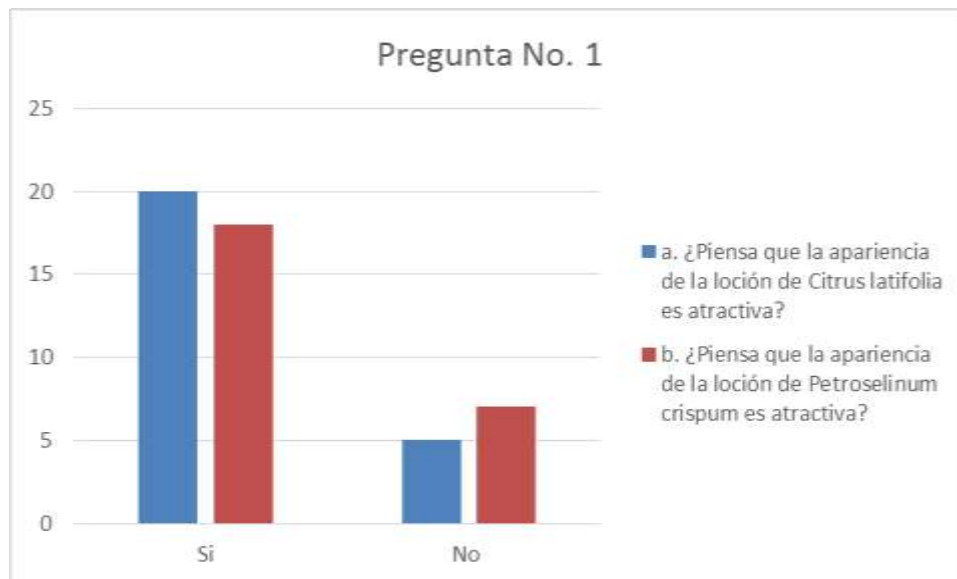
Para determinar la aceptación del producto se realizaron 25 encuestas (Ver anexos) para cada loción, en las cuales se solicitó la opinión de personas sanas sobre características críticas del mismo. Los resultados que se obtuvieron fueron:

Cuadro 22. Resultados pregunta No. 1

a. ¿Piensa que la apariencia de la loción de <i>Citrus latifolia</i> es atractiva?	
Si	No
20	5
b. ¿Piensa que la apariencia de la loción de <i>Petroselinum crispum</i> es atractiva?	
Si	No
18	7

Fuente: Datos experimentales, enero 2014.

Gráfica 10. Pregunta No. 1



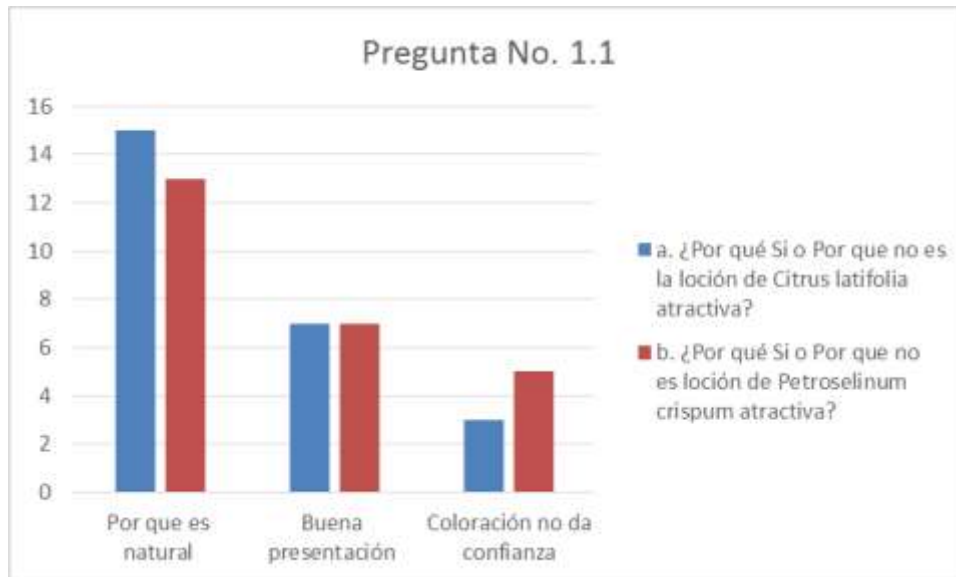
Fuente: Datos experimentales, Enero 2014.

Cuadro 23. Resultados Pregunta No. 1.1

a. ¿Por qué Si o Por qué no es la loción de <i>Citrus latifolia</i> atractiva?	
Por qué es natural	15
Buena presentación	7
Coloración no da confianza	3
b. ¿Por qué Si o Por qué no es loción de <i>Petroselinum crispum</i> atractiva?	
Por qué es natural	13
Buena presentación	7
Coloración no da confianza	5

Fuente: Datos experimentales, Enero 2014.

Gráfica 11. Pregunta no. 1.1



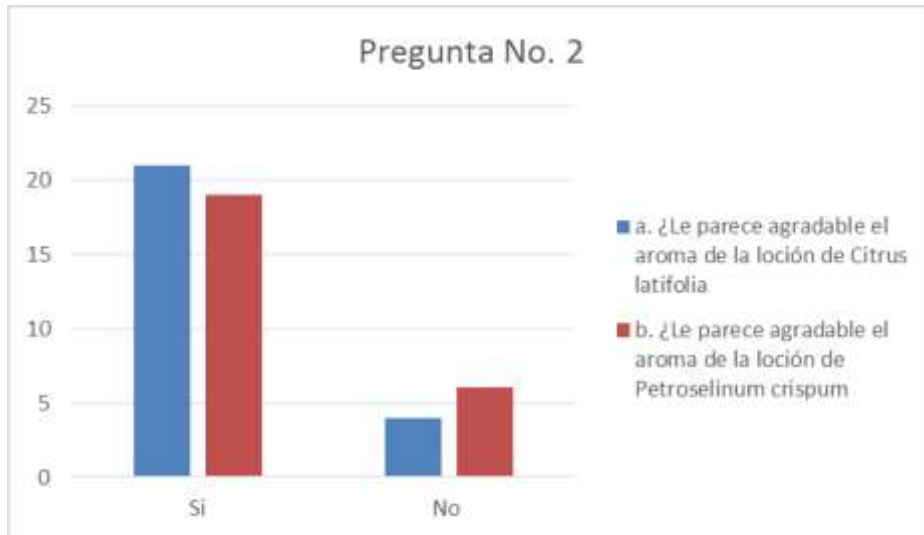
Fuente: Datos experimentales, Enero 2014.

Cuadro 24. Resultados pregunta No. 2

a. ¿Le parece agradable el aroma de la loción de <i>Citrus latifolia</i>?	
Si	No
21	4
b. ¿Le parece agradable el aroma de la loción de <i>Petroselinum crispum</i>?	
Si	No
19	6

Fuente: Datos experimentales, Enero 2014.

Gráfica 12 Pregunta No. 2



Fuente: Datos experimentales, enero 2014

Cuadro 25. Resultados pregunta No. 3

a. ¿Preferiría uno diferente para la loción de *Citrus latifolia*?

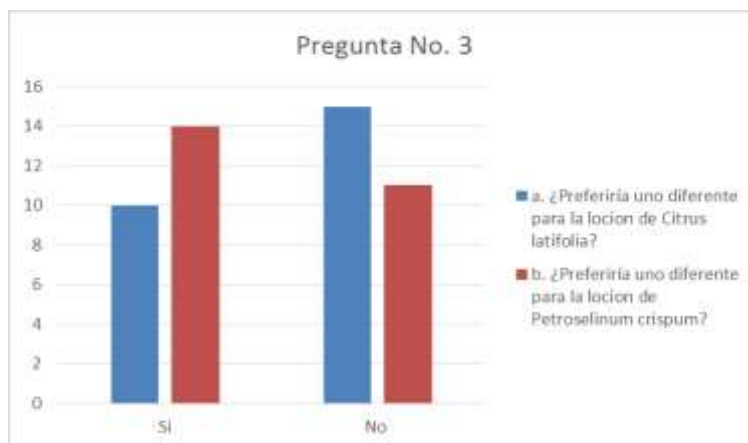
Si	No
10	15

b. ¿Preferiría uno diferente para la loción de *Petroselinum crispum*?

Si	No
14	11

Fuente: Datos experimentales, Enero 2014

Gráfica 13. Pregunta No. 3



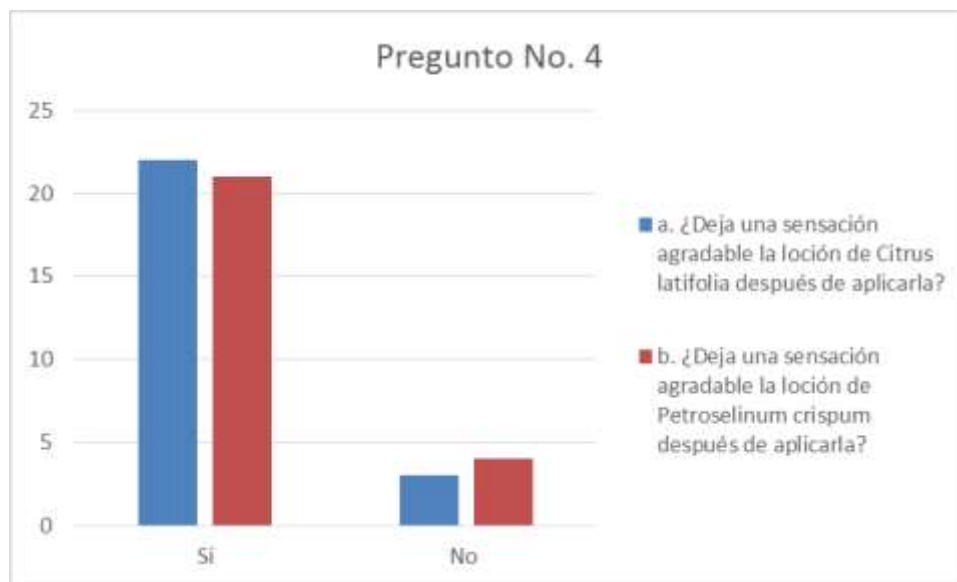
Fuente: Datos experimentales, Enero 2014

Cuadro 26. Resultados Pregunta No. 4

a. ¿Deja una sensación agradable la loción de <i>Citrus latifolia</i> después de aplicarla?	
Si	No
22	3
b. ¿Deja una sensación agradable la loción de <i>Petroselinum crispum</i> después de aplicarla?	
Si	No
21	4

Fuente: Datos experimentales, Enero 2014.

Gráfica 14. Pregunta No. 4



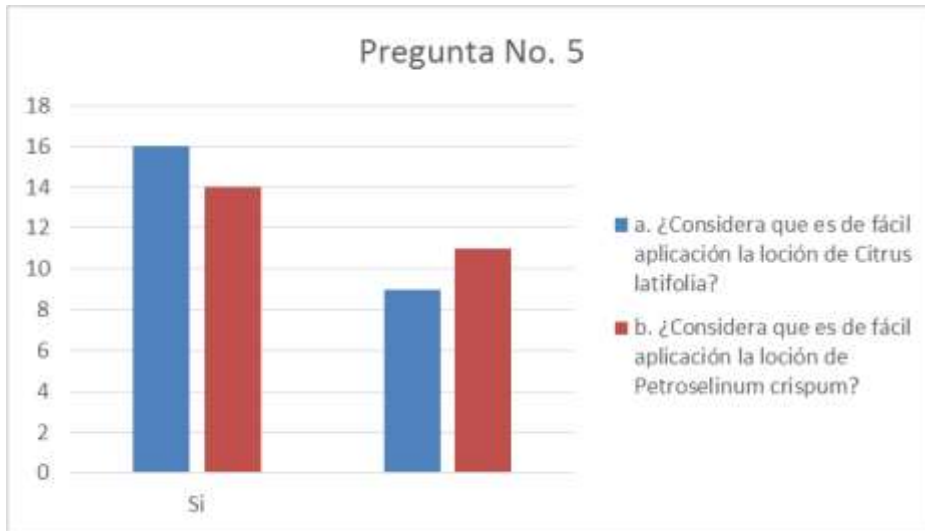
Fuente: Datos experimentales, Enero 2014.

Cuadro 27. Resultados Pregunta No. 5

a. ¿Considera que es de fácil aplicación la loción de <i>Citrus latifolia</i>?	
Si	No
16	9
b. ¿Considera que es de fácil aplicación la loción de <i>Petroselinum crispum</i>?	
Si	No
14	11

Fuente: Datos experimentales, Enero 2014.

Gráfica 15. Pregunta No. 5



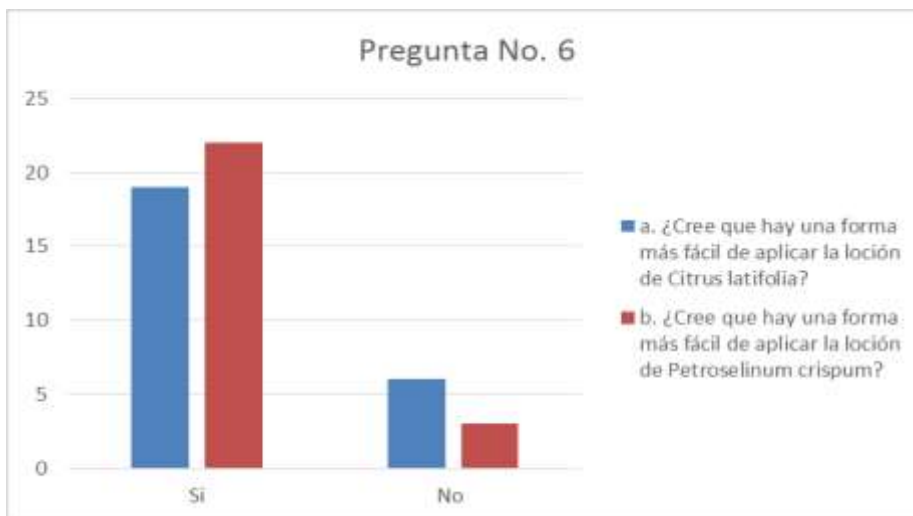
Fuente: Datos experimentales, Enero 2014.

Cuadro 28. Resultados Pregunta No. 6

a. ¿Cree que hay una forma más fácil de aplicar la loción de <i>Citrus latifolia</i>?		
Si	No	
19	6	
b. ¿Cree que hay una forma más fácil de aplicar la loción de <i>Petroselinum crispum</i>?		
Si	No	
22	3	

Fuente: Datos experimentales, Enero 2014.

Gráfica 16. Pregunta No. 6



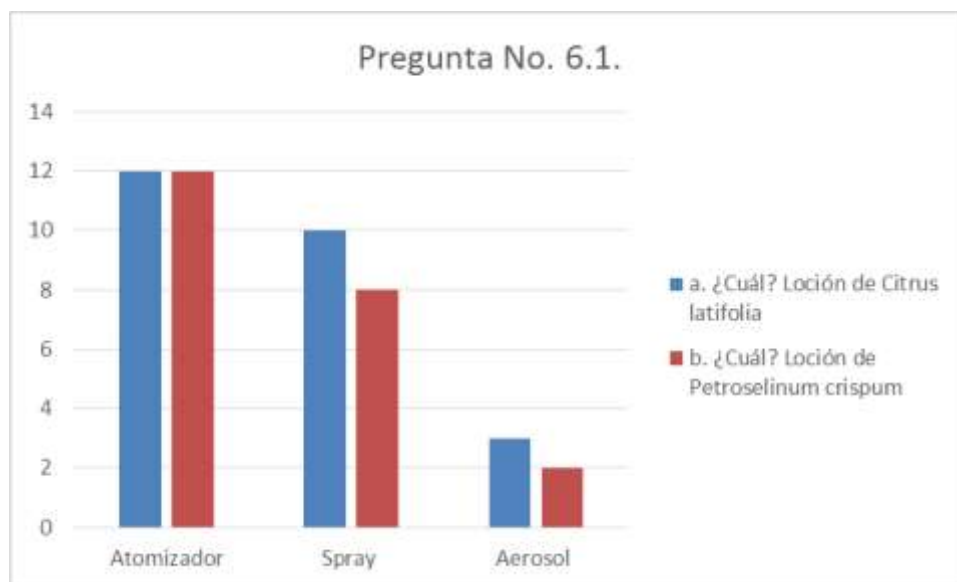
Fuente: Datos experimentales, Enero 2014.

Cuadro 29. Resultados Pregunta No. 6.1

a. ¿Cuál? Loción de <i>Citrus latifolia</i>?	
Atomizador	12
Spray	10
Aerosol	3
b. ¿Cuál? Loción de <i>Petroselinum crispum</i>?	
Atomizador	12
Spray	8
Aerosol	2

Fuente: Datos experimentales, Enero 2014.

Gráfica 17. Pregunta No. 6.1.



Fuente: Datos experimentales, Enero 2014.

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En busca de determinar si la concentración de furanocumarinas presente en los macerados de cada una de las cuatro especies elegidas para este estudio (*C. latifolia*, *C. aurantifolia*, *P. crispum* y *A. graveolens*) es igual o mayor a la de la esencia de bergamota usada en el Hospital Roosevelt para preparar la loción de esencia de bergamota, y así poder formular una loción de calidad para reemplazar el uso de la esencia de bergamota, se procedió a la obtención del material vegetal en el mercado de la terminal zona 4 Guatemala, se eligió este mercado porque es el mayor centro de distribución de frutas y verduras en la ciudad capital, lo que permite que las especies elegidas puedan ser encontradas en cualquier mercado de esta ciudad. Aspecto que es de suma importancia, porque se pretendía que a través de lo reportado en este estudio, el estudiante de química farmacéutica de EDC hospitalario que este cursando en el laboratorio de producción del Hospital Roosevelt, pudiera contribuir con la obtención del material vegetal y su maceración con la seguridad de obtener la especie correcta en el momento que se necesite. Como se puede visualizar en el cuadro número cuatro de resultados el material vegetal empleado en este estudio se encontraba fresco en el momento de la compra y con características morfológicas adecuadas, también se puede observar que se recolectó la cantidad suficiente para cubrir todas las necesidades del estudio.

Para lograr comparar la concentración de furanocumarinas de las especies en estudio con la concentración presente en la esencia de bergamota, se compró la esencia de bergamota para usarla como control, en la misma droguería donde la obtiene el Hospital Roosevelt. Se le realizó el control de calidad que se muestra en el cuadro número seis de resultados, basado en dos propiedades fisicoquímicas importantes para medir la calidad de cualquier esencia, el índice de refracción y la densidad, propiedades que se encontraron dentro del rango de las especificaciones, por lo que se considera que la esencia comprada se encontraba en buenas condiciones de pureza (Pasto, 2003). Como se puede observar en el cuadro número cinco se prepararon los macerados bajo las buenas prácticas de manufactura, cuidando puntos críticos importantes en cualquier extracción sólido-líquido, como el tamaño de la fracción del material vegetal y la protección del frasco con envoltura de papel que evite la entrada de luz y una posible fotorreacción y degradación de las furanocumarinas. (Medinilla, 2013)

Los macerados se prepararon en distintas proporciones solvente-materia vegetal y en distinta concentración del solvente, con la finalidad de definir qué combinación sería la que generaría una mayor extracción de furanocumarinas, para que a partir de la misma se realizaran las

lociones para el vitíligo y la psoriasis que se propusieron en este trabajo. Además de ello se determinó el tiempo de la extracción total de furanocumarinas de la materia vegetal, lo que permitió establecer el tiempo de preparación del macerado, antes de utilizarlo en la loción. Como se puede visualizar en el cuadro número diez, los macerados que más furanocumarinas generaban eran los que poseían como materia vegetal al *C. latifolia*, luego los macerados de *C. aurantifolia*, seguido de los que estaban formados por *P. crispum*, y por último los compuestos por *A. graveolens*. Las cuatro especies vegetales estudiadas presentan evidencia que respalda la presencia de furanocumarinas en su composición química, pertenecen a familias que poseen la características quimiotaxonómicas de furanocumarinas, las dos especies de *Citrus* pertenecen a la familia rutácea, y *P. crispum* y *A. graveolens*, a la Umbelliferae (Arango, 2010). Las dos especies de limón presentan este metabolito secundario en el pericarpio del fruto (Bruneton, 2001), *P. crispum* en hojas y tallo, y *A. graveolens* en semillas principalmente, pero también en hojas y tallo, aunque en mucho menos concentración (Younken, 1995); a pesar de la baja concentración, se quería comprobar si la cantidad de furanocumarinas que el apio posee en tallos y hojas era equivalente a las que tienen la esencia de bergamota utilizada en la loción que se produce en el Hospital Roosevelt. Lo anterior permitió ir visualizando a la cáscara de las dos especies de limón como las que serían seleccionadas para la preparación de las lociones.

Para medir la concentración de furanocumarinas se empleó el método espectrofotométrico de ultravioleta-visible, aprovechando la propiedad de estos metabolitos de absorber en esta región del espectro (Lock, 1997; Fuleki, 1968; Lastra, 2004). Además de ello se realizó cromatografía en capa fina de cumarinas (ver fotografía número siete en anexos y cuadro número once y doce) en donde se evidenció la presencia de furanocumarinas, principalmente en las bandas de las dos especies de limones y en la esencia de bergamota, cuyos Rf coincidieron con el estándar de cumarinas, por su parte en el *A. graveolens* y en el *P. crispum* se evidenciaron furanocumarinas en muy baja proporción. El análisis anterior permitió evidenciar preliminarmente a las furanocumarinas, y luego se realizó la cuantificación en donde primeramente se preparó la curva de calibración, en donde empleando como estándar el psoraleno, el cual es una furanocumarina importante en el tratamiento de vitíligo y psoriasis, y con una estructura química básica característica de las furanocumarinas (Arango, 2010). Se prepararon de esta manera las cinco curvas de calibración (ver anexos) y se empleó la curva número dos (Ver cuadros número ocho y gráfica número uno) por su mejor coeficiente de correlación lineal. En el cuadro número nueve se puede visualizar las concentraciones de furanocumarinas alcanzadas a través del tiempo en cada

una de las proporciones de macerado que se estudiaron. Como se puede observar, de las dos concentraciones de solvente utilizadas en este estudio la que logró una mayor extracción del metabolito de interés fue la de etanol al 70%. A pesar que la capacidad de extracción de ambos solventes varía muy poco, el etanol al 70% posee la ventaja de ser un antiséptico potente, (Comité de Infecciones Intrahospitalarias, 2010) lo que favorece a contrarrestar cualquier ataque microbiano que pueda afectar aún más la piel del paciente o exacerbar su enfermedad (Kelley, 1992). Por lo anterior se eligió al etanol al 70% como el solvente empleado para preparar los macerados que se usaron para la producción de la loción que se recomendaría en este estudio. La proporción del macerado solvente-material vegetal que más cantidad del metabolito logro extraer fue la de 100 g/100 mL EtOH 70 % (ver cuadro número nueve y gráficas número dos, tres y cuatro), sin embargo el material vegetal no quedaba bien solvatado, y el volumen de solución que se obtenía era bajo. Por ello, debido a que la diferencia en concentraciones no era alta y no sobrepasaba la de la esencia de bergamota, se eligió la proporción de 100 gramos del material vegetal en 250 mL de solvente para la preparación de la loción. En ese mismo cuadro de resultados se observa como en la mayoría de macerados el tiempo necesario para alcanzar la saturación del solvente fue alrededor de los 30 días, ya que al medir las furanocumarinas el día 45 no presentaba mayor variación en las concentraciones, comparadas con las del día 30. Por ello el tiempo estipulado en el presente estudio para la maceración debe de ser de 30 días, para luego preparar la loción y poder dispensarla al paciente. Obtenidos estos resultados los macerados que se realizaron para ser comparados con la esencia de bergamota fueron hechos con una proporción material vegetal-solvente de 100g en 250 mL, con etanol al 70% y un tiempo de reposo para la extracción de 30 días.

En el cuadro número diez se pueden observar las tres lecturas de las concentraciones de furanocumarinas de cada uno de los cuatro macerados preparados, uno de cada especie en estudio; cada uno de ellos formulados con las características previamente definidas. Al visualizar la gráfica número seis se puede razonar como estos macerados presentaron una concentración de furanocumarinas menor a la esencia de bergamota, por lo que el volumen que se necesitaría de uno de ellos para sustituir los diez mililitros que se usan en el Hospital Roosevelt de esencia de bergamota para preparar la loción, sería muy grande y afecta la proporción con los demás componentes; por ende desde el punto de vista de la acción terapéutica de las furanocumarinas, ninguno de los macerados puede sustituir el uso de la esencia de bergamota para este preparado galénico del Hospital, pues no tienen similar concentración de furanocumarinas.

La FDA estipuló, que la concentración de furanocumarinas presentes como metoxipsoraleno en un medicamento, debían de ser de 10 miligramos por mililitro (Goodman, 2012), para ser aplicadas como loción antes de la exposición a la terapia ultravioleta (Manual de Prescripción Médica, 2011); la cantidad de furanocumarinas de los macerados sobrepasan esta concentración, por lo que sí podrían sustituir al medicamento de metoxipsoraleno en la terapia con ultravioleta, pero no pueden sustituir a la esencia de bergamota en la loción de bergamota, pues luego de la aplicación de esta última no hay terapia ultravioleta como tal, sino únicamente la exposición al sol. Por lo anterior no se debe de seguir preparando macerados de alguna de estas especies con la finalidad de sustituir el aporte de furanocumarinas que generan los 10 mL de esencia de bergamota en la loción.

A pesar de que los macerados no presentan furanocumarinas en suficiente cantidad para sustituir a la esencia de bergamota, el análisis cualitativo por cromatografía en capa fina (ver cuadro número once, doce y anexo número uno) evidencia la presencia de distintos metabolitos secundarios en cada una de las plantas estudiadas, los cuales según lo observado en el cuadro número uno absorben a distintas longitudes de onda en la región del espectro ultravioleta-visible, aspecto que se ve apoyado en el barrido realizado en la región de 200 a 900 nm (ver cuadro número siete), el hecho de que absorban en varias regiones del ultravioleta visible, permite inferir que estos compuestos poseen una amplia cobertura en la absorbancia de las radiaciones ultravioleta, lo que podría contribuir al efecto terapéutico que estos macerados pudieran llegar a generar (Rojas, 2010).

Sin embargo recientemente se sabe que la efectividad real de la fototoxicidad usada como terapéutica es baja, y se ha propuesto que el estrés oxidativo pudiera estar involucrado en la patogénesis de la degeneración del melanocito en el vitíligo, ya que se ha visto un desequilibrio tisular del sistema oxido-reducción. Estos hallazgos han promovido la utilización de nuevos tratamientos que contribuyan al balance de antioxidantes en la epidermis afectada, es decir se promueve el uso de agentes antioxidantes que logren contrarrestar el estado oxidativo en el que se encuentra el melanocito. Estos tratamientos han tenido éxito, ya que en estudios clínicos fase dos doble ciego se ha demostrado incremento en la pigmentación al aplicárselos (Fernández, 2008). Si bien las cuatro especies analizadas en este estudio no presentan la cantidad de furanocumarinas que presentó la esencia de bergamota, si podrían presentar mayor o igual concentración de antioxidantes, pues para cada una de estas especies se encuentra reportado compuestos fenólicos como flavonoides dentro de su composición química (Bruneton, 2001), por lo que podrían ayudar

a tratar el vitíligo a través de la actividad antioxidante de estos compuestos (Martínez, 2002), a lo que se sumaría la actividad fototóxica de las furanocumarinas que poseen. Respaldadas en la teoría del estado inflamatorio por el desequilibrio redox presente en los pacientes con vitíligo (Fernández, 2008), se analizó la actividad antioxidante de las cuatro especies propuestas comparándolas con las de la esencia de bergamota todo ello pensando en producir lociones para tratar el vitíligo y no la psoriasis, pues dentro de los estudios de la psoriasis no se ha establecido que tenga una relación con el desequilibrio redox. En primer término se realizó la cromatografía en capa fina de flavonoides (ver anexo, fotografía número siete y cuadro número once y doce) en donde se visualizó la presencia de estos metabolitos secundarios en los macerados de *P. crispum*, *C. latifolia* y *C. aurantifolia* y en la esencia de bergamota. Al observar los factores de retención presentados en el cuadro número trece, se puede visualizar que el *C. latifolia*, *C. aurantifolia* y la esencia de bergamota, presentaron una banda con Rf y coloración similar al del ácido clorogénico; también el *C. aurantifolia* presentó una banda con Rf y color similar al de la quercetina, por lo que se evidencia y confirma la presencia de flavonoides en los macerados. Apoyados en la identificación cualitativa de flavonoides en los macerados se procedió a cuantificar el porcentaje de flavonoides expresados como rutina presentes en cada una de las materias vegetales analizadas, como se puede visualizar en el cuadro número trece y gráfica número siete el *C. latifolia* presentó el mayor porcentaje de flavonoides, seguido de la esencia de *C. bergamia*, *C. aurantifolia*, *P. crispum* y por último *A. graveolens*. Lo que permitió inferir que la actividad antioxidante de al menos, *C. aurantifolia*, sería superior a la de la esencia de bergamota. Se analizaron a los flavonoides por ser compuestos fenólicos, los cuales poseen la propiedad de secuestrar radicales libres y otros compuestos oxidados, es decir son antioxidantes por excelencia (Girgin, 2004).

Otra prueba realizada para determinar el aporte antioxidante de los órganos vegetales en estudio, fue la prueba con el radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil, DPPH, el cual al estar en contacto con una sustancia antioxidante se reduce y cambia del color morado intenso a incoloro, y en cromatografía en capa fina se genera decoloración en el área donde ocurre la reducción. (Vertuani, 2004) En la fotografía número ocho (ver anexos) se puede observar la cromatografía en capa fina de DPPH, en donde el macerado que presentó mayor actividad antioxidante fue *C. latifolia*, seguido de *C. aurantifolia*, luego por el *P. crispum* y por último el *A. graveolens*; también en dicha fotografía se puede visualizar como el *C. bergamia* no mostró actividad antioxidante, lo que permitió concluir preliminarmente que estos compuestos si tenían actividad antioxidante, la cual debía ser cuantificada para un mejor análisis. Luego de esta prueba cualitativa, se procedió a

cuantificar la actividad antioxidante por el método micrométrico de DPPH; en donde como se puede observar en el cuadro número quince, el CI50 menor lo presentó *C. latifolia*, lo cual quiere decir que de las cuatro especies estudiadas, está es la que presenta mayor inhibición de radicales oxidativos a menor concentración del extracto, comparado con las otras tres especies (*C. aurantifolia*, *P. crispum* y *A. graveolens*); sin embargo cabe mencionar que las cuatro especies presentaron actividad antioxidante. Algunos compuestos polares presentes en estas especies, deben la actividad antioxidante en parte a la presencia de algunos grupos hidroxilo, los cuales funcionan como donadores de protones y sequestradores de los radicales libres (Martínez, j. & Crespi, L. 1997).

Para respaldar aún más la evidencia de la actividad antioxidante de las especies de plantas estudiadas, se procedió a realizar la cuantificación de fenoles totales en cada macerado; como se había mencionado anteriormente los fenoles son compuestos antioxidantes de mucha importancia para el organismo humano, son el mayor grupo de metabolitos secundarios. (Girgin, 2004). Los polifenoles poseen una estructura química ideal para la actividad como consumidores de radicales libres. Su propiedad como antioxidante, proviene de su gran reactividad como donantes de electrones e hidrógenos y de la capacidad del radical formado para estabilizar y deslocalizar el electrón desapareado (termina la reacción en cadena), además de su habilidad para quelar iones de metales de transición (Vaya, 2001). Los polifenoles poseen una porción hidrofílica y una porción hidrofóbica. Su capacidad antioxidante está directamente relacionada con el grado de hidroxilación del compuesto (Girgin, 2004). Los flavonoides tienen una poderosa acción antioxidante *in vitro*, siendo capaces de barrer un amplio rango de especies reactivas del oxígeno, nitrógeno y cloro, tales como el superóxido, el radical hidroxilo, el radical peroxilo, el ácido hipocloroso, actuando como agentes reductores. Además pueden quelar iones de metales de transición (Halliwell, 2005, Roginsky, 2003). Como se puede visualizar en el cuadro número catorce, el macerado que más fenoles totales expresados como ácido gálico poseía, aún por encima de la esencia de bergamota, era el de *C. latifolia*, seguido de *C. aurantifolia*, luego el de *P. crispum* y por último el de *A. graveolens*; reafirmando de esta manera que el *C. latifolia* es el que posee el mayor poder antioxidante de los cuatro macerados e incluso de la esencia de bergamota, por lo que era el macerado que reunía más características fisicoquímicas que se podrían aprovechar en la terapia del vitíligo y en la formulación de la loción, ya que, aunque por debajo de la esencia de bergamota, era el macerado que más furanocumarinas poseía y el que más poder

antioxidante presentaba, esta última característica la presentó aún más que la esencia de bergamota.

Posteriormente se decidió evaluar la actividad inhibitoria de tirosinasa por los extractos obtenidos de las cuatro especies en estudio, y así poder determinar cuál de ellas inhibe la producción de melanocitos a menor concentración, y corroborar si su uso es seguro y efectivo en el tratamiento de vitíligo, y también poder descartar que no contribuía de alguna manera al aumento de la despigmentación de la piel (Momtaz, 2008). La tirosinasa es la enzima limitante de la velocidad de la biosíntesis de pigmentos de melanina responsables de la coloración del pelo, piel y ojos, a mayor actividad de tirosina mayor producción de melanina. Como su nombre lo indica en el ensayo de inhibición de la Tirosinasa se inhibe esta enzima, por los fines de este estudio la sustancia que generó menor inhibición es la sustancia que mayor interés despertó para ser usada en la loción que se formularía. Para evaluar la actividad anti-tirosinasa, se utilizó el estándar de ácido kójico, cuya actividad ya ha sido comprobada con anterioridad, este compuesto interrumpe la producción de melanina en la piel, por lo que funciona de patrón. Se determinó que de las cuatro especies en estudio, la que presentó menor actividad anti-tirosinasa, fue *C. latifolia*, lo cual puede deberse a propiedades intrínsecas en su composición química, ya que la presencia de flavonoides, vitaminas y cumarinas podrían generar sinergismo en la no inhibición de la tirosinasa, es decir antagoniza la actividad anti-tirosinasa. Las tres especies que tuvieron un resultado mayor de CI50 de la tirosinasa, se pueden apreciar en el cuadro número quince, su menor actividad en comparación a *A. graveolens* se justifica debido a que *C. aurantium* y *C. latifolia* son de la familia de los cítricos, y por ende presentan ácido ascórbico en su composición fitoquímica, el cual es un inhibidor de la reacción muy eficaz en principio, al reconvertir las quinonas en fenoles; sin embargo la inhibición de la tirosinasa es solamente temporal, al agotarse el ácido ascórbico con el transcurso de la reacción. Además, posteriormente puede ocasionar problemas, ya que el dehidroascórbico formado puede dar lugar a una reacción de pardeamiento específica, la cual puede ser de gran interés para proporcionar pigmentación en las áreas de la epidermis afectadas por el vitíligo (Cjuno, H. & Arrollo, J., 2009).

Debido a que el *C. latifolia* y el *P. crispum* presentaron buena actividad antioxidante, bajo efecto inhibidor de la tirosinasa y cierto contenido de furanocumarinas, se eligieron para ser el componente activo de las dos lociones, una de cada una de estas plantas, para el tratamiento del vitíligo, no se empleó el *C. aurantifolia* por poseer características similares a las de *C. latifolia* por lo que se comportarían de manera similar en la loción y en su estudio de estabilidad; además se

aprovechó las características de *P. crispum* ante la actividad con la tirosinasa. A estas lociones se les realizó su estudio de estabilidad con la finalidad de asentar precedentes tecnológicos sobre la loción, sin embargo serán necesarios estudios sobre el efecto terapéutico de las lociones en la clínica. Puesto que a pesar de que las dos especies seleccionadas para realizar las lociones presentaban mayor actividad antioxidante que la esencia de bergamota, no presentaban mayor actividad antioxidante en la prueba del DPPH, de un preparado vegetal reportado con eficacia clínica en el Centro de Estudios para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas de la Universidad de la Habana, Cuba. (Rojas, 2010)

Del cuadro número diesiseis al veintiuno se muestran los resultados obtenidos de la evaluación de la estabilidad de tres lotes de loción de *C. latifolia* y tres lotes de loción de *P. crispum* (Lotes A, B y C). Loción con actividad antioxidante, la cual se evaluó por medio de pruebas de estabilidad acelerada, establecidas para productos farmacéuticos líquidos. Por lo tanto las características fueron evaluadas en tiempos de 0, 90 y 180 días a una temperatura de $40\pm 2^{\circ}\text{C}$, comparándose contra una muestra control que se preparaba con 15 días de anticipación a la medición.

Se evaluaron características organolépticas, incluyendo color y olor. Características que se mantuvieron después de transcurridos los 180 días, cumpliendo así con las especificaciones establecidas para la forma farmacéutica. Los parámetros físicos evaluados se mantuvieron muy similares entre los tiempos 0, 90 y 180 días de almacenamiento a la temperatura de $40\pm 2^{\circ}\text{C}$, cumpliendo así con las especificaciones establecidas para la preparación.

En cuanto a las características fisicoquímicas evaluadas, se encontró que los valores de pH y densidad relativa están dentro de los parámetros establecidos, según las mediciones que se realizaron a los 0, 90 y 180 días de evaluación.

Los resultados satisfactorios obtenidos de la estabilidad acelerada de los tres lotes de las dos lociones con capacidad antioxidante se puede deber a que el Etanol al 70%, vehículo utilizado para prepararlas tiene la capacidad de actuar como preservante, por lo que fue de gran ayuda para que tanto las características organolépticas como fisicoquímicas se mantuvieran entre los tiempos 0, 90 y 180 días.

A pesar de que se comprobó que las características organolépticas y fisicoquímicas se mantuvieron al variar las condiciones normales de almacenamiento, comprobando así que el producto es estable, es importante además realizar estudios de estabilidad a largo plazo, para poder así establecer el tiempo de vida útil del producto, ya que así se controlan factores que pueden

disminuir la actividad del producto, como lo son el material de empaque, el almacenamiento del producto, la distribución y la zona climática de los lugares en donde se comercializara el producto. (Melgarejo. A. 2011).

Además de realizar el ensayo de la estabilidad acelerada, también es necesario determinar la aceptabilidad del producto. Es por esto que se realizaron 50 encuestas a personas sanas, 25 para cada loción, que debieron utilizar las lociones y evaluar características de su presentación, como lo son el olor, color, forma de aplicar y la sensación que deja después de su uso. (Ver encuesta en anexos)

Como se puede observar en el cuadro número veintitres y gráfica diez las veinticinco personas que evaluaron la loción antioxidante de *Petroselinum crispum*, a trece de ellas le pareció atractiva debido a su naturaleza, ya que un producto natural genera más confianza porque produce menos efectos secundarios que un producto sintético. Sin embargo, también fue desaprobada por los participantes debido a su color, que a diferencia de la loción de *Citrus latifolia*, es más oscura.

A pesar de que el aroma del producto fue aceptable para la mayoría de personas encuestadas (ver cuadro número veinticinco), un gran porcentaje de las mismas dijo que preferiría uno diferente. La utilización de una esencia podría ser de suma utilidad, para lograr enmascarar el principal aroma del producto, que aporta el etanol al 70%, utilizado como vehículo en la elaboración de la loción. La loción de *Citrus latifolia* fue mejor aceptada, ya que el aroma del limón, debido a los aceites esenciales que contiene, es más agradable e intenso que el del perejil, por lo que era más fácil de percibir. (Ver cuadro número veinticinco y gráfica número doce)

El etanol tiene la característica de dejar una sensación refrescante al momento de ser aplicado sobre la piel, es por esto que la mayoría de participantes contestó que la sensación al momento de utilizar ambas lociones fue agradable (ver cuadro número veintisiete y gráfica número catorce), característica que facilitará el uso de la loción por parte del paciente, ya que si ésta dejara una sensación desagradable contribuiría a la deserción del tratamiento, y esto facilitaría el avance de la enfermedad.

En cuanto más fácil sea la forma de aplicar un medicamento o producto, más fácil será que el paciente lo utilice. Es por esto que la forma de aplicar la loción también fue evaluada dentro de la encuesta. Esta arroja datos que nos dicen que existen formas que facilitarían su uso aún más. El atomizador es una de ellas, éste reduciría el tiempo que necesita el paciente para aplicar la loción en las áreas afectadas y esto a su vez ayuda a que su uso sea continuo. (Visualizar cuadros número veintinueve y treinta, y gráficas dieciséis y diecisiete)

En los macerados preparados a pesar de que no se poseía una cantidad mayor o igual de furanocumarinas a la de la esencia de bergamota, si se tenía una concentración mayor de compuestos fenólicos lo que le generaba propiedades antioxidantes, a lo que se sumaba el bajo efecto antitirosinasa y las furanocumarinas que poseían, lo que permite visualizarlas como posibles agentes terapéuticos en el tratamiento del vitiligo, lo cual hay que comprobarlo en estudios *in vivo* y/o clínicos.

X. CONCLUSIONES

- 10.1 De las cuatro especies vegetales estudiadas se determinó que el Limón Persa (*Citrus latifolia*) presentó una mayor cantidad de furanocumarinas expresadas como psoraleno.
- 10.2 El solvente con que se logró una mayor extracción de furanocumarinas del material vegetal fue el Etanol al 70%.
- 10.3 No es posible sustituir el aporte de furanocumarinas que la esencia de bergamota proporciona, ya que ninguno de los macerados presentaron concentraciones equivalentes.
- 10.4 Las lociones preparadas no se pueden emplear para el tratamiento de psoriasis debido a sus bajas concentraciones furanocumarinas.
- 10.5 Los macerados presentaron cumarinas, flavonoides, antraquinonas, aceites esenciales y otros metabolitos secundarios evidenciados en cromatografía en capa fina.
- 10.6 La mayor concentración de flavonoides expresados como rutina se determinó en *C. latifolia*, superando a la esencia de bergamota.
- 10.7 El poder antioxidante de *C. latifolia* se evidenció en la decoloración que presentó en la cromatografía en capa fina mediante la técnica de DPPH.
- 10.8 La concentración de fenoles totales expresados como ácido gálico y la de flavonoides fue mayor en *C. latifolia*, por arriba de la esencia de bergamota, esto le confieren una buena actividad antioxidante, la cual se confirmó al ser el mejor agente reductor en la prueba del DPPH.
- 10.9 La actividad antioxidante de *C. latifolia* y su bajo efecto inhibitor de la tirosinasa comparado con la esencia de bergamota, le confiere potencial para continuar con estudios clínicos para tratar el vitiligo.
- 10.10 Las características organolépticas y fisicoquímicas de las lociones de los lotes A, B y C evaluados, se mantuvieron después de transcurridos los 180 días de almacenamiento, cumpliendo así con las especificaciones establecidas para la forma farmacéutica estudiada.
- 10.11 Las dos lociones preparadas cumplen con los parámetros establecidos para ser usada como producto dermatológico.
- 10.12 La utilización del etanol al 70% como vehículo contribuye a que los tres lotes de las lociones estudiadas mantengan las características que comprueban su estabilidad después de 180 días.

10.13 La sensación refrescante del etanol al 70%, hace que las lociones tengan aceptabilidad entre los consumidores según resultados en la encuesta realizada.

XI.RECOMENDACIONES

- 11.1 No se debe sustituir la esencia de bergamota por el macerado de alguna de las plantas estudiadas, con la finalidad de generar un efecto terapéutico basado en la acción de las furanocumarinas.
- 11.2 Las lociones preparadas en este estudio pueden ser estudiadas para la terapia con rayos ultravioleta, ya que poseen mayor concentración de psoraleno que las indicadas para dicha terapia.
- 11.3 Realizar pruebas preclínicas *Ex vivo* como la del efecto inhibidor de la peroxidación lipídica en homogenado de cerebro y otras *in vitro* como la prueba de la capacidad reductora del hierro férrico, para avalar aún más la capacidad antioxidante de las soluciones y su aporte a contrarrestar el estado de estrés oxidativo presente en el vitíligo.
- 11.4 Realizar estudios clínicos con las lociones estudiadas pues su actividad antioxidante ligada a su concentración de furanocumarinas y su bajo poder inhibitorio de la tirosinasa, son características que deben de ser aprovechadas en la terapéutica del vitíligo.
- 11.5 Buscar otras plantas nativas solas o combinadas para generar un preparado con alto poder antioxidante, que pueda ser probado en pacientes con Vitíligo sin ningún tipo de riesgos.
- 11.6 Crear programas multidisciplinarios de atención al paciente con Vitíligo, para contrarrestar la patología tratando todos los factores que la desencadenan.
- 11.7 Realizar Master de producción y POE para asegurar las buenas práctica de manufactura en la producción de la loción por los estudiantes de EDC hospitalario de la Carrera de Química Farmacéutica que cursan por el Laboratorio de Producción del Hospital Roosevelt Guatemala.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 12.1 Aguilar, J. (1966). Relación de unos aspectos de la flora útil de Guatemala. 2da. Edición. Guatemala. Tipografía Nacional Guatemala. pp 140, 364.
- 12.2 Alboroz, A. (1980) Productos Naturales: estudio de las sustancias y drogas extraídas de plantas. Universidad Central de Venezuela, Carácas. 616p.
- 12.3 Arango, G. J. (2010). Introducción al Metabolismo Secundario, Compuestos derivados del Ácido Shikimico. Colombia. Universidad de Antioquia. 36p.
- 12.4 Avilan, L. y C. Rengifo. (1988). Los cítricos. 1era. Edición. Editorial América. Caracas, Ven. P. 56.
- 12.5 Baurin, N., Arnoult, E., Scior, T., Do, Q. & Bernard, P. (2002). Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 82(1): 155-158.
- 12.6 Bellanato, J. e Hidalgo, A. (1971) Infrared analysis of essential oils. Heyden y Son Ltd., Londres 1536 p.
- 12.7 Bruneton J. (2001) Farmacognosia: Fitoquímica Plantas Medicinales, Zaragoza España, Editorial ACRIBIA S.A. 2da edición. Pp 261-275.
- 12.8 Cáceres, A. (1996). Plantas de uso medicinal en Guatemala. Editorial Universitaria. Colección de Monografías. Volumen No. 1. Universidad de San Carlos de Guatemala 314 p.
- 12.9 Casañola, G., Marrero, Y., Hassan, M., Ather, A., Khan, K., Torrens, F. & Rotondo, R. (2007). Dragon method for finding novel tyrosinase inhibitors: Biosilico identification and experimental in vitro assays. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 42(1): 1370-1381.
- 12.10 Castillo, M. (2005) Proyecto de factibilidad para la producción y comercialización del limón, en el municipio de el Júcaro, departamento de El Progreso. Facultad de Ingeniería. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- 12.11 Chevallier. A. (1984). Diccionario de las Alteraciones y Falsificaciones de las sustancias. Madrid. España. Universidad Complutense de Madrid. Imprenta Manuel Alvarez, Estudio 9. 214p

- 12.12 Chiari, M., Joray, M., Ruiz, G., Palacios, S. & Carpinella, M. (2010). Tyrosinase inhibitory activity of native plants from central Argentina: isolation of an active principle from *Lithrea molleoides*. *Food Chemistry*, 120(1), 10-14p.
- 12.13 Cjuno, H., Arrollo, J. (2009). Inhibición de la actividad enzimática de la tirosinasa con EDTA, quitosano y papaína. México. Revista para Ingeniería Química. 12(2): 42-48.
- 12.14 Comité de Infecciones Intrahospitalarias. (2010) Normas de Uso de Antisépticos. Chile. Hospital Padre Hurtado. 16 p.
- 12.15 Córdova D., Menéndez C., et. al. (2009) Determinación y Cuantificación de la actividad antioxidante de especies nativas y su posible fuente para el desarrollo de nutricoséuticos. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Licenciatura de Química Farmacéutica. Guatemala.
- 12.16 Curto, E., Kwong, C., Hermersdorfer, H., Glantt, H., Santis. C., Virador, V. & Dooley, T. (1999). Inhibitors of mammalian melanocyte tyrosinase: *in vitro* comparisons of alkyl esters of gentisic acid with other putative inhibitors. *Biochemical Pharmacology*, 57(1), 663-672.
- 12.17 Duckworth, H. & Coleman, J. (1969). Physicochemical and kinetic properties of mushroom tyrosinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 245(7), 1613-1625.
- 12.18 Fang, D., Tsuji, Y. & Setaluri, V. (2002). Selective down-regulation of tyrosinase family gene TYRP1 by inhibition of the activity of melanocyte transcription factor, MITF. *Nucleic Acids Research*, 30 (15), 3096-3106.
- 12.19 Fernández, H. N., Martínez, G. (2008) Vitíligo: Actualización Bibliográfica. La Habana. Centro de Estudios para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. San Lázaro y L, Ciudad de La Habana 4, Cuba.
- 12.20 Ferrándiz. C. Dermatología Clínica. (2001). España. Editorial ELSEVIER. Segunda edición. 1002 p.
- 12.21 Fonnegra R., Jimenez S. (2007) Plantas medicinales aprobadas en Colombia. Colombia. 2da Edición. Editorial Universidad de Antioquia. 44-46 p.
- 12.22 Fuleki. T., Francis. F. T. (1968). Quantitative Methods for Anthocyanins Extraction and Determination of Total Anthocyanins in strawberries. *Journal of Food Science*.
- 12.23 Girgin, F., Yildirim, E. (2004). Anti-inflammatory effects of dietary antioxidants. *Curr. Med. Chem.* 3: 19-30.

- 12.24 Goodman., Gilman. (2012). Las bases Farmacológicas de la Terapéutica. Estados Unidos. 12va. L. Edición. Editorial Mc GrawHill. 1089p.
- 12.25 Gudiel L. (2009). Evaluación Fitoquímica y actividad antioxidante de *Polypodium triseriale* SW. (calahuala). Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Licenciatura de Química Farmacéutica. Guatemala. 35-36 p.
- 12.26 Halliwell, B. Rafter, J., Jenner, A. (2005) Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects, antioxidant or not. *Am J Clin Nutr.* 268p
- 12.27 Hertl M. (2005) Autoimmune Enfermedades de la piel, pathogenesis, diagnóstico. Alemania. 3ra, edición. Springer Wien New York. 442 p.
- 12.28 House, P. y Lagos-Witte, S. 1989. Manual Popular de 50 Plantas Medicinales de Honduras. Litografía López, S. Honduras. pp 70, 71, 76, 77.
- 12.29 Kelley. Medicina Interna. (1992). Argentina. Segunda edición. Editorial panamericana. Tomo I. 1148p.
- 12.30 Kim, Y. M, Yun, J., Lee, C., Lee, H., Min, K. & Kim, Y. (2002) Oxyresveratrol and hidroxystilbene compounds, inhibitory effect on tyrosinase and mechanism of action. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(18), 16340-16344.
- 12.31 Kuklinski C. (2000) Estudio de Drogas y Sustancias Medicamentosas de Origen Natural. Barcelona. Editorial Omega. 100-102p.
- 12.32 Kyeong, R., Kim, G., Hyun, C. Sang, D. & Ho, N. (2011). Compounds with tyrosinase inhibition, elastase inhibition and DPPH radical scavenging activities from the branches of *Distylium racemosum* Sieb. et Zucc. *Phytotherapy Reserch*, 25(1), 1451-1456.
- 12.33 Lastra. Váldez H. Rodriguez E. (2004). Método cualitativo para cuantificación de taninos en el extracto acuoso de romerillo. *Revista Cubana de Plantas Medicinales.* 5(1). Recuperado desde: http://www.bvs.sld.cu/revistas/pla/vol5_1_00/pla05100.htm.
- 12.34 Lee, K., Kim, B. J. & Kim, J. H. (1997). Biological screening of 100 plant extracts for cosmetic use (1): Inhibitory activities of tyrosinase and DOPA auto-oxidation. *International Journal of Cosmetic Science*, 19(1), 291-298.
- 12.35 Lin, Y., Hsu, F., Chen, C., Chern, J. & Lee, M. (2007). Constituents from the Formosan apple reduce tyrosinase activity in human epidermal melanocytes. *Phytochemistry*, 68(1), 1189-1199.

- 12.36 Lin, Y., Sheu, M., Huang, C., y Ho, Hsiu (2009). Development of a Reversed-phase High-Performance Liquid Chromatographic Method for Analyzing Furanocoumarin Components in Citrus Fruit Juices and Chinese Herbal Medicines. Taiwan. 47(3), 211-215.
- 12.37 Lincoln Taiz; E. Zeiger (2006), «13», Secondary Metabolites and Plant Defense (4 edición), Plant Physiology.
- 12.38 Lock. O. (1997). Colorantes Naturales. Pontificia Universidad Católica del Perú. Fondo Editorial. P.p. 71-83
- 12.39 Manga P, Sheyn D, Yang F, Sarangarajan R, Boissy RE. A. (2006) role for tyrosinase related protein in 4-terbutylphenol-induced toxicity in melanocytes_ implications for vitiligo. 1652-62.
- 12.40 Manual de Prescripción Médica, Recurso académico para profesionales de la salud. Manual de referencia farmacológica. American Pharmacists Association. Estados Unidos. Editorial Lexicomp. 19 edición. 1108p.
- 12.41 Marroquín, N. (2011). Comparación de la Actividad Antioxidante, detección y cuantificación de flavonoides y compuestos fenólicos en tres especies de la familia passifloracea (*Passiflora edulis*, *Passiflora incarnata*, *Passiflora ligularis*). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- 12.42 Martínez Roca, L. (2012) Tratamiento Integrado Dermatología y Cirugía, Materiales Académicos de Medicina China. Tarragona. Fundación Europea de Medicina Tradicional China. Universidad de Beijing. 107.
- 12.43 Martínez, J., & Crespi, L (1997). Extracción mediante un SOXTEC® de la materia grasa de algodones procedentes de diferentes áreas productoras. Comparación extracción con diclorometano o sucesivas diclorometano-metanol. *Revista de Fitoterapia*. 226-230p.
- 12.44 Martínez, S., González, J., Culebras, J.M., Tuñón, M. (2002) Los flavonoides: Propiedades y Acciones Antioxidantes. España. Universidad de León. Departamento de Fisiología. 271-278.
- 12.45 Mau, JL. Lin H. C. Song. (2002). Antioxidant properties of several speciality mushrooms. Food Res. 25.
- 12.46 Medinilla B. (2009) Manual de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, .

- 12.47 Medinilla, B. (2013) Manual de Laboratorio de Fitoquímica. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. 20p.
- 12.48 Melgarejo, A. (2011). Evaluación de la estabilidad acelerada de una loción, con capacidad antifúngica, antibacteriana y antilevadura preparada a partir de extracto seco de rizoma de *Smilax domingensis* (Zarzaparrilla), en solución etanólica al 70%. (Tesis Licenciatura). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. USAC. Guatemala.
- 12.49 Mercado de la Terminal zona 4 de Guatemala. Revisado en: http://www.mercadosdeguatemala.com/zona_4.html.
- 12.50 Momtaz, S., Mapunya, B., Houghton, P., Edgerly, C., Hussein, A., Naidoo, S. & Lall, N. (2008). Tyrosinase inhibition by extracts and constituents of *Sideroxylon inerme* L. stem bark, used in South Africa for skin lightening. *Journal of Ethnopharmacology*, 119(1), 507-512.
- 12.51 Mondragón Cedeño, A. L. (2002). Formatos para consentimiento informado. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 227-254.
- 12.52 Muñoz O., Montes M., Wilkomirsky T. (2004) Monografías plantas medicinales de uso en Chile química y farmacología. Chile. 2da Edición. Editorial Universitaria S.A. 33-35 p.
- 12.53 Muñoz, M., Gutiérrez D. Determinación de Actividad Antioxidante de Diversas Partes del Árbol *Nicotina glauca*. Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro. Recuperado desde: <http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2008/7VeranoUAQ/14MunozJuarez.pdf>
- 12.54 Nakashima, S., Matsuda, H., Oda, Y., Nakamura, S., Xu, F. & Masayuki, Y. (2010). Melanogenesis inhibitors from the desert plant *Anastatica hierochuntica* in B16 melanoma cells. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 18(1), 2337-2345.
- 12.55 Neves . (2002). Prueba de Bergapteno en Corteza de *Brosimum gaudichaudii* a través de la producción de melanina en actinomicetos. Brasil. Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE. 465-472.
- 12.56 Om P. Sharma. (2008) Revisión de ensayo antioxidante de DPPH. Artículo ELSEVIER. 2:154-160.
- 12.57 Osuna. L, Tapia M., Aguilar A. 2005. Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales, estudio etnobotánico, fitoquímico y farmacológico. España. Universitat de Barcelona. 60-63 p.

- 12.58 Pasto, D. Johnson, C. (2003) Determinación de estructuras químicas. España. Editorial Reverté, S. A. 73p.
- 12.59 Plantas de uso Medicinal en Centro América. 1995. Editorial Llerena. OPS/OMS. Guatemala. pp 78, 79, 80.
- 12.60 Ramos, K., Herrera, Y., Vega, N. Portal, C. (2012). Actividad antioxidante *in vitro* y toxicidad de extractos hidroalcohólicos de hojas de Citrus spp. (Rutaceae). Cuba. 17: 369-378.
- 12.61 Reglamento Técnico Centroamericano. COMIECO XXXIII. Productos Farmacéuticos. Estudios de Estabilidad para uso Humano. Anexo. Resolución No. 148-2005. ICS 11.120.10 Guatemala: Comisión Guatemalteca de Normas. 1-5p.
- 12.62 Remington (2000). Farmacia. Estados Unidos. 20 edición. Editorial medico Panamericana. 1796p.
- 12.63 Roginsky, V. (2003). Chain-breaking antioxidant activity of natural polyphenols as determined during the chain oxidation of methyl linoleate in Triton X-100 micelles. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 414: 261-270.
- 12.64 Rojas, J., Fernández, N. Efectos antioxidantes de una mezcla de principios activos de origen natural con actividad potencial en el tratamiento del Vitíligo. Cuba. Universidad de La Habana, Cuba. Centro de Estudios para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas. Instituto de Farmacia y Alimentos.
- 12.65 Sandberg SL , MR Berenbaum (1989). «Leaf-tying by tortricid larvae as an adaptation for feeding on phototoxic *Hypericum perforatum*». *Journal of Chemical Ecology* 15 (3): 875–885.
- 12.66 Swingle, W. y P. Reece. (1967). The botany of citrus and its wild relatives. In: Reuther; L. Batchelor; H. Webber (eds). The Citrus Industry. Vol. I. Berkeley University of California. 190-430p.
- 12.67 Taiz L. y Zeiger E. (2006) Fisiología Vegetal. España. Universidad Jaume. 529p.
- 12.68 Ul-Haq, A., Malik, A., Khan M., Ul-Haq, A., Khan, S., Ahmad, A. & Choudhary, M. (2006). Tyrosinase inhibitory lignans from the methanol extract of the roots of *Vitex negundo* Linn and their structure–activity relationship. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13(1), 255-260.
- 12.69 Vasco C. (2008). El total de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de los frutos importantes de Ecuador. Artículo ELSEVIER. 22:167-170

- 12.70 Vaya, J., Aviram, M. (2001) Nutritional Antioxidants: Mechanisms of action, analyses of activities and Medical Applications *Curr. Med. Chem.* 1: 99-117P.
- 12.71 Venereo, G. J. (2002) Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. Cuba. Instituto Superior de Medicina Militar “Dr. Luis Díaz Soto”. 129p.
- 12.72 Vertuani S, Angusti A, Manfredini S. 2004. The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. *Curr Pharm Des.* 10: 1677–1694.
- 12.73 Wagner H, Blatt S., (1984). Plant Drug Analysis a thin layer chromatography Atlas. Berlin Heidelberg New York Tokyo. 299-301p.
- 12.74 Waterhouse, A.L. (2002) Determinación de fenoles totales. II.1-11.18.In: Wrolstad, R. (Ed). Protocolos actuales en Química Analítica Alimentaria. John Wiley & Sons: New York.
- 12.75 Yildirim M. y Baysal V. erel, A. et. al. (2005) Is the combination of calcipotriol and UVA effective in vitiligo. 302p.
- 12.76 Younken. H. W. (1986). Tratado de Farmacognosia. México. Editorial Atlante. 654p.

XIII. ANEXOS

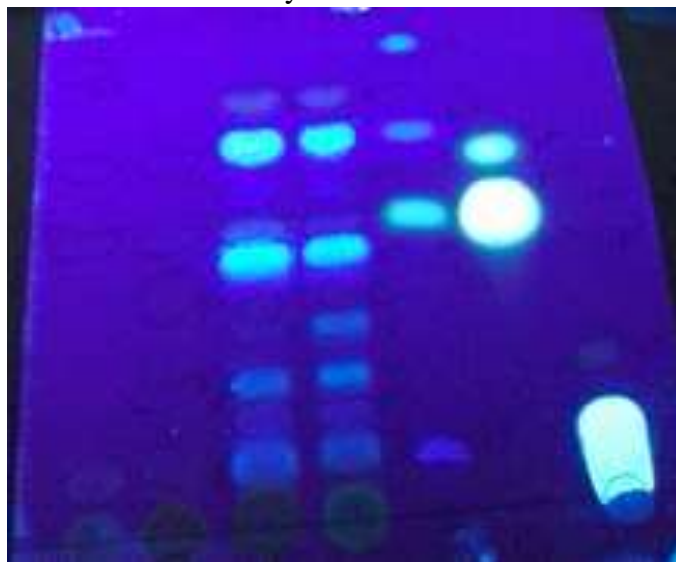
Anexos 1.

Fotografía 1. Realización de la curva de calibración para la cuantificación de las furanocumarinas.



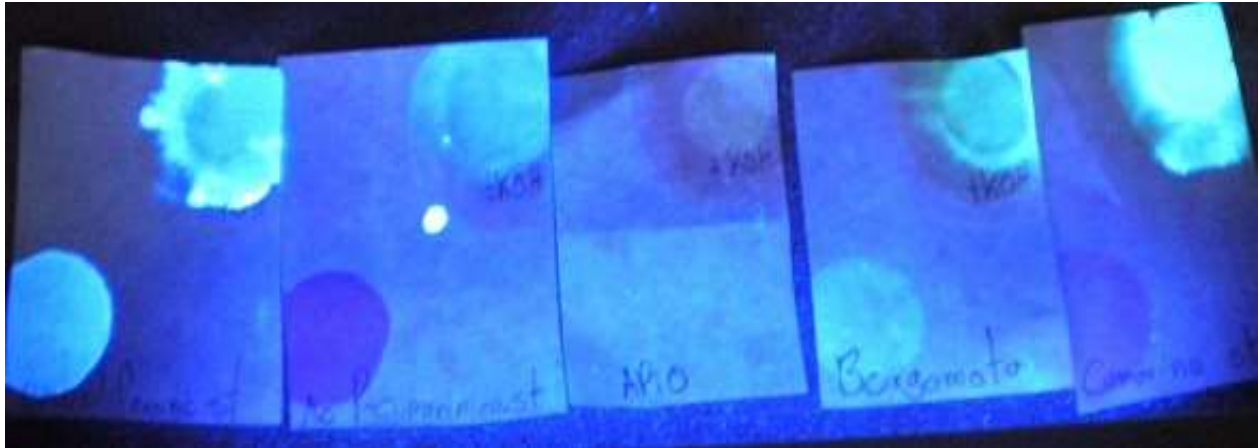
Fuente: Datos experimentales Laboratorio LIPRONAT, fecha: 4/6/2012

Fotografía 2. Cromatografía capa fina para identificación de cumarinas. Orden de sembrado de sustancias (de derecha a izquierda): *A. graveolens*, *P. crispum*, *C. latifolia* y *C. aurantifolia*, esencia de bergamota, estándar de cumarina y estándar de umbeliferona.



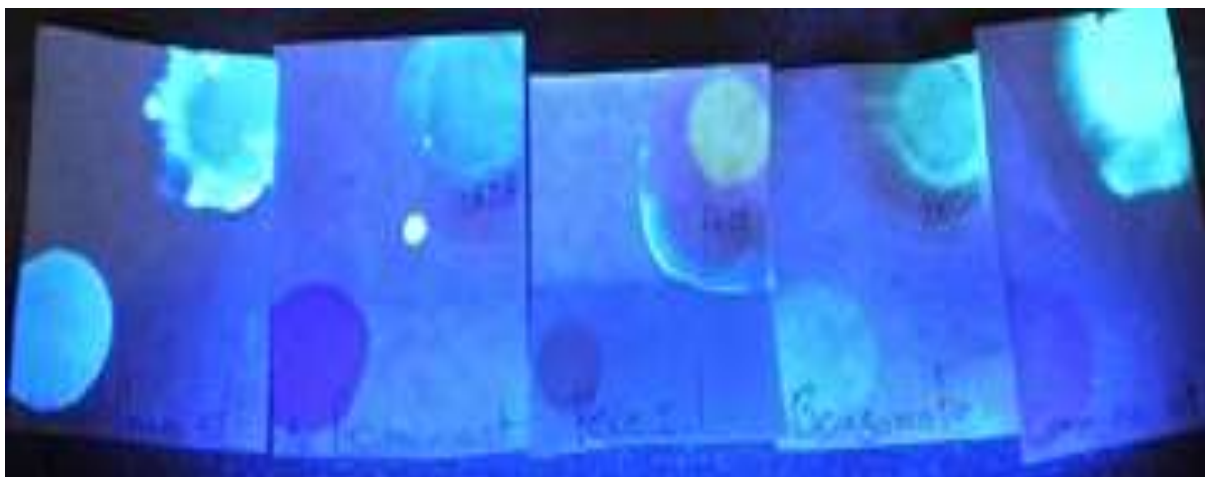
Fuente: Datos experimentales Laboratorio LIPRONAT, fecha: 13/5/2012

Fotografía 3. Prueba Macroscópica identificación de cumarinas, análisis en *Apium graveolens* comparada con estándares. Orden de las sustancias analizadas (de izquierda a derecha): estándar de Umbeliferona, estándar de ácido ρ -cumarínico, macerado de *A. graveolens*, esencia de bergamota y estándar de cumarinas.



Fuente: Datos experimentales Laboratorio LIPRONAT, fecha: 13/5/2012

Fotografía 4. Prueba Macroscópica identificación de cumarinas, análisis en *P. crispum* comparada con estándares. Orden de las sustancias (de izquierda a derecha): estándar de Umbeliferona, estándar de ácido ρ -cumarínico, macerado de *P. crispum*, esencia de bergamota y estándar de Cumarinas.



Fuente: Datos experimentales Laboratorio LIPRONAT, fecha: 13/5/2012

Fotografía 5. Prueba Macroscópica identificación de cumarinas, análisis en *Citrus latifolia* comparada con estándares. Orden de las sustancias analizadas (de izquierda a derecha): estándar de Umbeliferona, estándar de ácido p -cumarínico, macerado de *Citrus latifolia*, esencia de bergamota y estándar de Cumarinas.



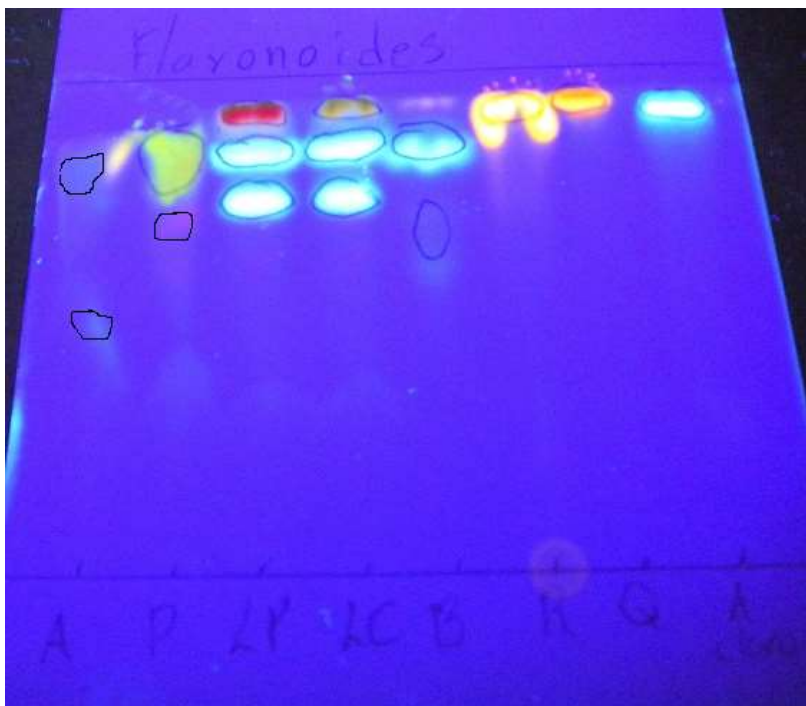
Fuente: Datos experimentales Laboratorio LIPRONAT, fecha: 13/5/2012

Fotografía 6. Prueba Macroscópica identificación de cumarinas, análisis en *Citrus aurantifolia* comparada con estándares. Orden de las sustancias (de izquierda a derecha): estándar de Umbeliferona, estándar de ácido paracumarínico, macerado de *Citrus aurantifolia*, esencia de bergamota y estándar de Cumarinas.



Fuente: Datos experimentales Laboratorio LIPRONAT, fecha: 13/5/2012

Fotografía 7. Cromatografía capa fina, identificación de flavonoides. Orden de sembrado de sustancias (de derecha a izquierda): *A. graveolens*, *P. crispum*, *C. latifolia* y *C. aurantifolia*, esencia de bergamota, estándar de rutina, estándar de Quercetina y estándar de ácido clorogénico.



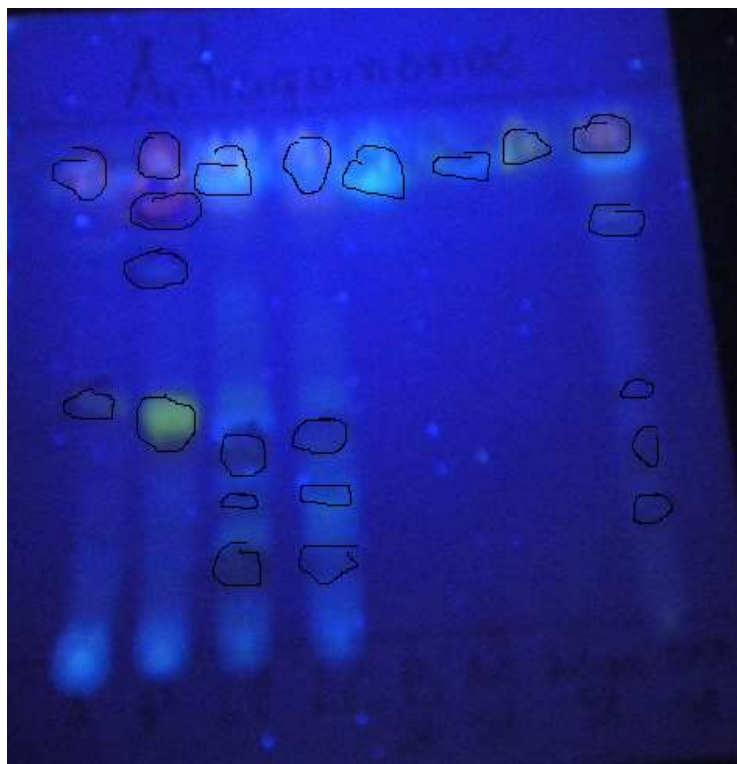
Fuente: Datos experimentales Laboratorio LIPRONAT, fecha: 15/11/2013

Fotografía 8. Cromatografía capa fina identificación del poder antioxidante por el método de DPPH. Orden de sembrado de sustancias (de derecha a izquierda): *A. graveolens*, *P. crispum*, *C. latifolia* y *C. aurantifolia*, esencia de bergamota, estándar de Trolox, Estándar de TBHQ, estándar de Rutina, Estándar de Quercetina y estándar de vitamina C.



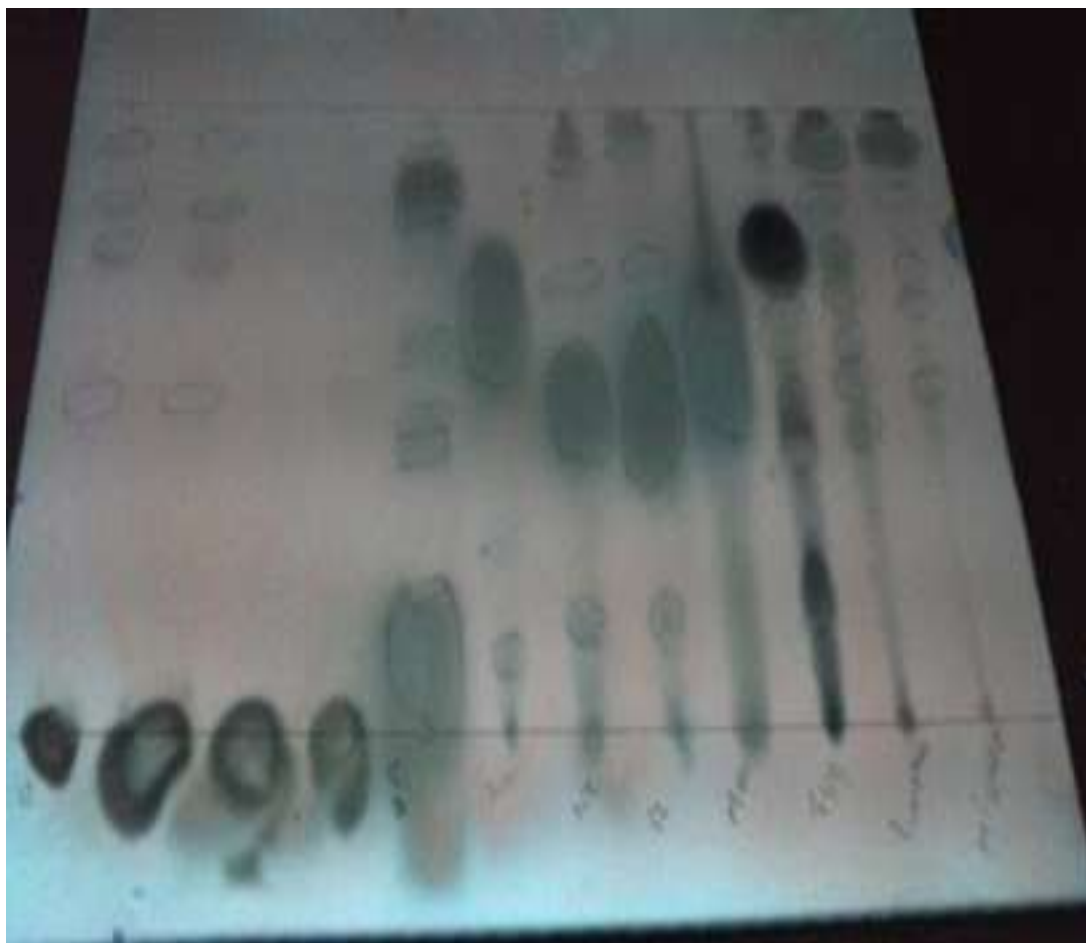
Fuente: Datos experimentales Laboratorio LIPRONAT, fecha: 19/11/2012

Fotografía 9. Cromografía capa fina identificación de antraquinonas. Orden de sembrado de sustancias (de derecha a izquierda): *A. graveolens*, *P. crispum*, *C. latifolia* y *C. aurantifolia*, esencia de bergamota, estándar de antraquinonas.



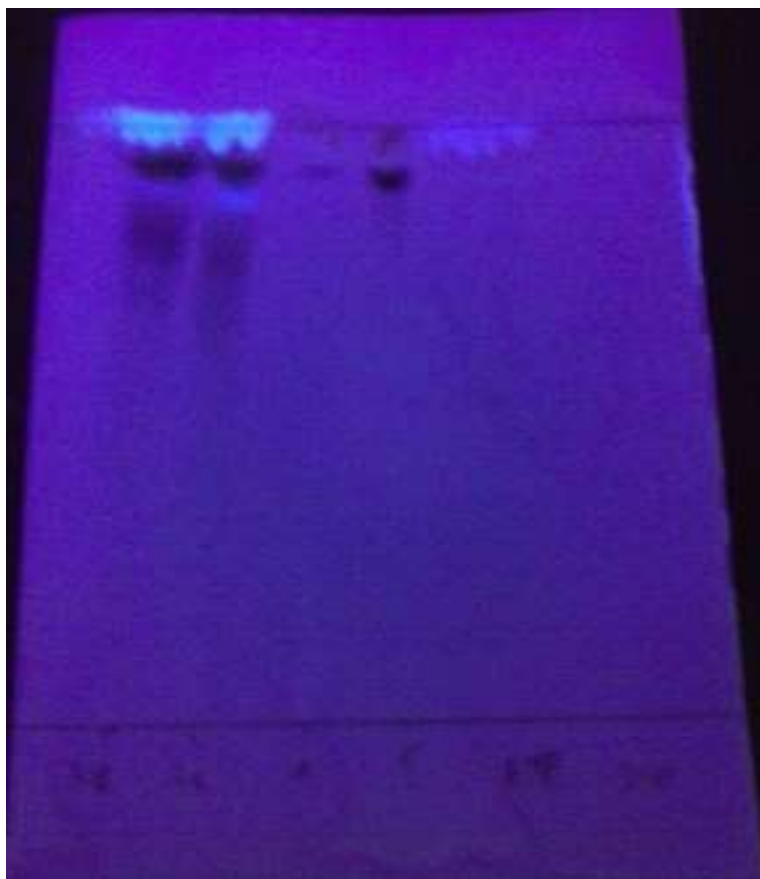
Fuente: Datos experimentales Laboratorio LIPRONAT, fecha: 20/11/2012

Fotografía 10. Cromatografía capa fina identificación de aceites esenciales. Orden de sembrado de sustancias (de derecha a izquierda): *A. graveolens*, *P. crispum*, *C. latifolia* y *C. aurantifolia*, esencia de bergamota.



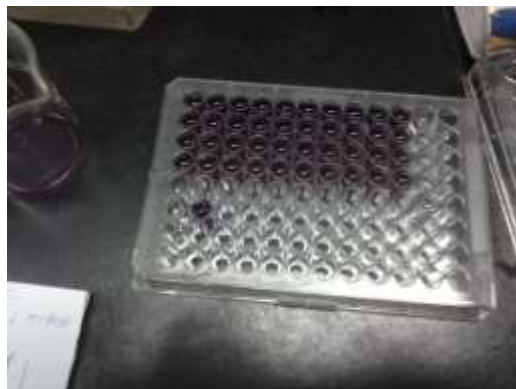
Fuente: Datos experimentales Laboratorio LIPRONAT, fecha: 21/11/2012

Fotografía 11. Cromatografía capa fina identificación de saponinas. Orden de sembrado de sustancias (de derecha a izquierda): *A. graveolens*, *P. crispum*, *C. latifolia* y *C. aurantifolia*, esencia de bergamota, estándar de saponinas.



Fuente: Datos experimentales Laboratorio LIPRONAT, fecha: 21/11/2012

Fotografía 12. Cuantificación micrométrica de la actividad antioxidante de los órganos vegetales estudiados, por el método de DPPH.



Fuente: Datos experimentales Laboratorio LIPRONAT. febrero 2013.

Fotografía 13. Cámara de Estabilidad con Temperatura y Humedad controlada. Ubicada en Laboratorios Donovan Werke.



Fuente: datos experimentales.

Fotografía 14. Sensores de temperatura y humedad de la cámara de Estabilidad con Temperatura y Humedad controlada.



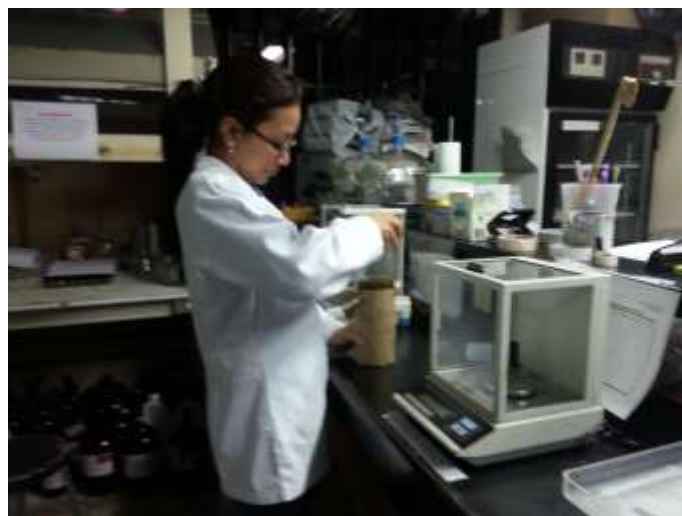
Fuente: datos experimentales.

Fotografía No. 15. Estanterías dentro de la Cámara de estabilidad en las que fueron ubicadas las muestras de las Lociones Vitix Lemon y Vitix Jil.



Fuentes: datos experimentales.

Fotografía 16. Preparación del macerado de *C. lantifolia* y *P. crispum* con Etanol al 70%.



Fuente: Laboratorio LIPRONAT.

Fotografía 17. Medición de pH de las lociones: Vitix Jil y Vitix Lemon, por medio del potenciómetro marca Metler Toledo.



Fuente: datos experimentales.

Anexo 2.

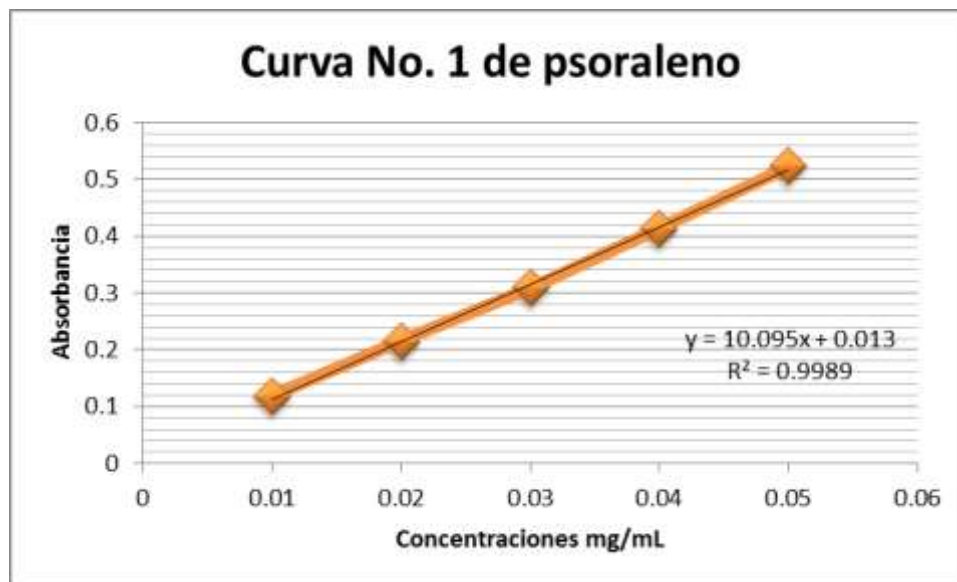
Curvas de Calibración de estándar de Psoraleno, para cuantificación de Furanocumarinas.

Cuadro 1. Concentración y absorbancia de las disoluciones de estándar de Psoraleno para la primera curva de calibración.

Concentración mg/mL	Absorbancia
0.01	0.11825
0.02	0.21512
0.03	0.30844
0.04	0.41404
0.05	0.52356

Fuente: datos experimentales, 4/6/2012

Gráfica 1. Primera curva de calibración de Psoraleno:



Fuente: datos experimentales, 4/6/2012

Cuadro 2. Coeficiente de Correlación lineal y ecuación de la recta de la primera curva de calibración de psoraleno.

Coeficiente de correlación lineal R^2	0.9989
Ecuación de la Recta	$Y = 10.095x + 0.013$

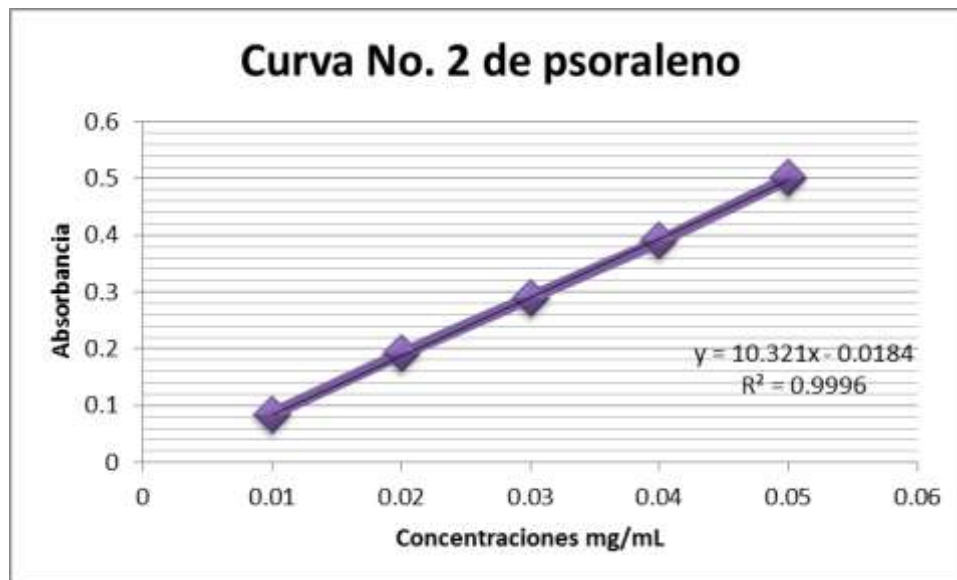
Fuente: datos experimentales, 4/6/2012

Cuadro 3. Concentración y absorbancia de las disoluciones de estándar de Psoraleno para la segunda curva de calibración.

Concentración mg/mL	Absorbancia
0.01	0.08432
0.02	0.19123
0.03	0.28954
0.04	0.39011
0.05	0.50091

Fuente: datos experimentales 4/6/2012

Gráfica 2. Segunda curva de calibración de estándar de Psoraleno:



Fuente: datos experimentales 4/6/2012

Cuadro 4. Coeficiente de Correlación lineal y ecuación de la recta de la segunda curva de calibración.

Coeficiente de correlación lineal R^2	0.9996
Ecuación de la Recta	$Y=10.321x-0.0184$

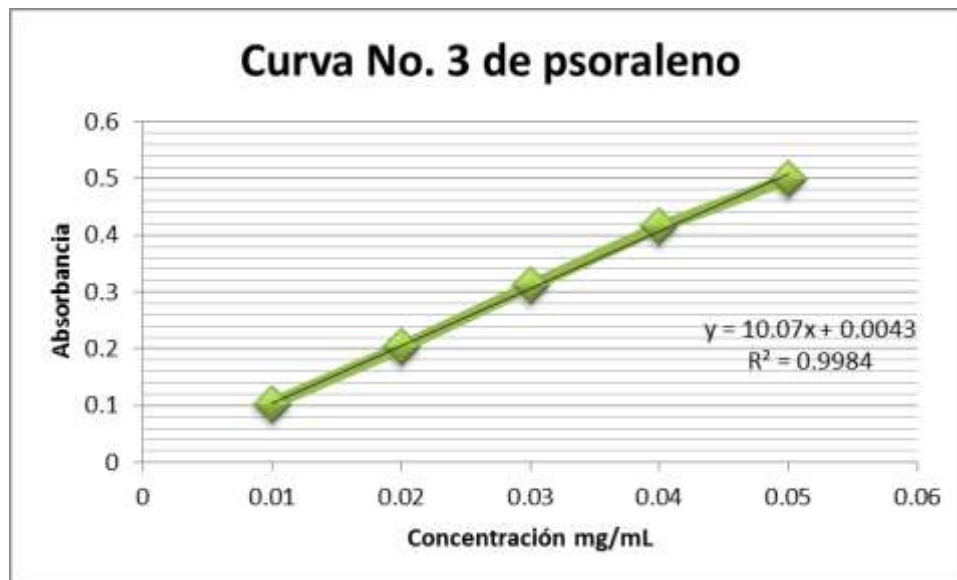
Fuente: datos experimentales 4/6/2012

Cuadro 5. Concentración y absorbancia de disoluciones de estándar de Psoraleno para la tercera curva de calibración.

Concentración mg/mL	Absorbancia
0.01	0.10248
0.02	0.2031
0.03	0.3115
0.04	0.41518
0.05	0.49994

Fuente: datos experimentales 6/6/2012

Gráfica 3. Tercera curva de calibración estándar de Psoraleno



Fuente: datos experimentales 6/6/2012

Cuadro 6. Coeficiente de Correlación lineal y ecuación de la recta de la tercera curva de calibración.

Coeficiente de correlación lineal R^2	$0.9984x + 0.0043$
Ecuación de la Recta	$Y = 10.07$

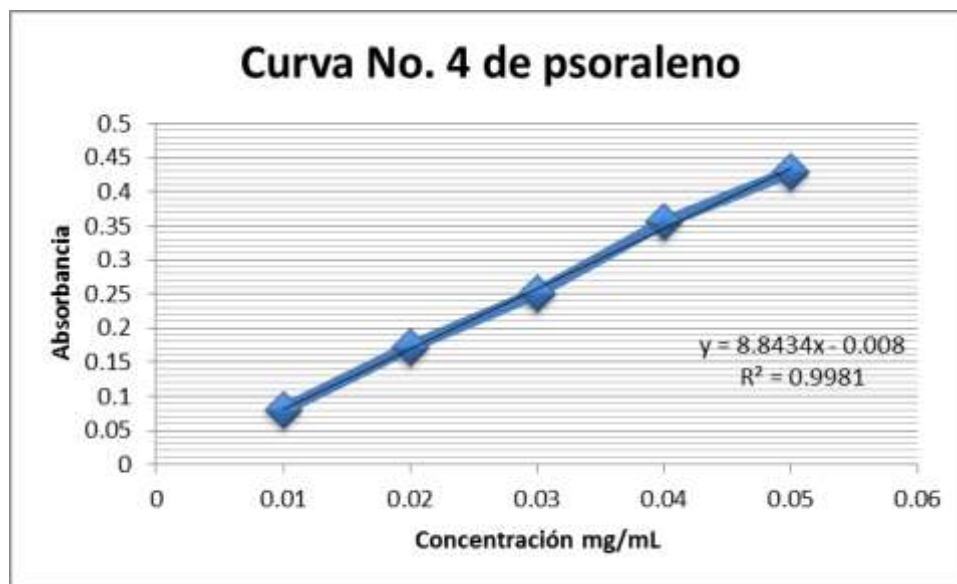
Fuente: datos experimentales 6/6/2012

Cuadro 7. Concentración y absorbancia de disoluciones de estándar de Psoraleno para la cuarta curva de calibración.

Concentración mg/mL	Absorbancia
0.01	0.079379
0.02	0.17133
0.03	0.25092
0.04	0.35495
0.05	0.42974

Fuente: datos experimentales 7/6/2012

Gráfica 4. Cuarta curva de calibración de estándar Psoraleno.



Fuente: datos experimentales 7/6/2012

Cuadro 8. Coeficiente de Correlación lineal y ecuación de la recta de la cuarta curva de calibración.

Coeficiente de correlación lineal R^2	0.9981
Ecuación de la Recta	$Y=8.8434x-0.008$

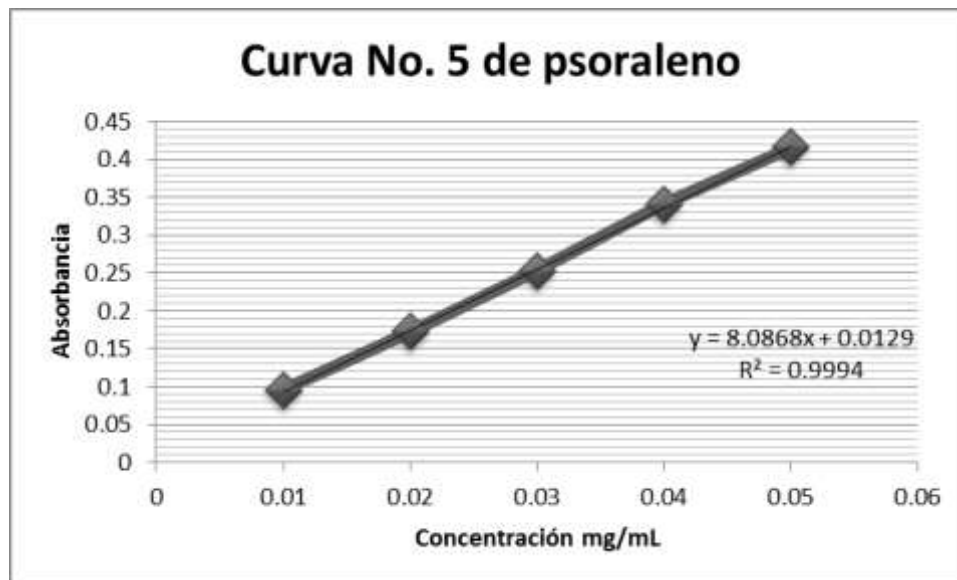
Fuente: datos experimentales 7/6/2012

Cuadro 9. Concentración y absorbancia de disoluciones de estándar de Psoraleno para la quinta curva de calibración.

Concentración mg/mL	Absorbancia
0.01	0.09551
0.02	0.17255
0.03	0.25266
0.04	0.34103
0.05	0.41561

Fuente: datos experimentales 8/6/2012

Gráfica 5. Quinta curva de calibración de estándar Psoraleno.



Fuente: datos experimentales 8/6/2012

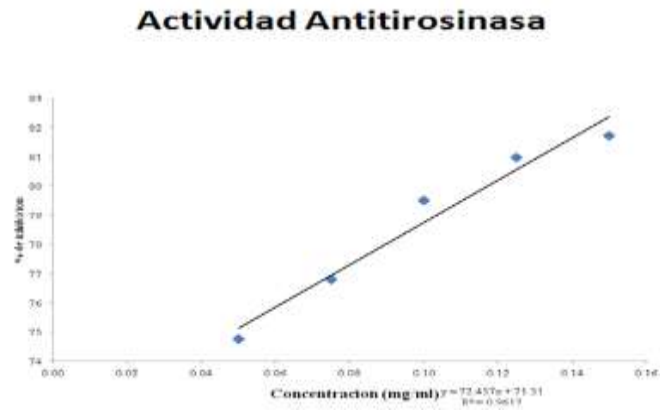
Cuadro 10. Coeficiente de Correlación lineal y ecuación de la recta de la quinta curva de calibración.

Coeficiente de correlación lineal R^2	0.9994
Ecuación de la Recta	$Y=8.0868x+0.0129$

Fuente: datos experimentales 8/6/2012

Anexo 3.

Gráfica 8. Curva de calibración para determinación de actividad anti-tirosinasa



Fuente: (Almeda D., Astorga L., Orellana A., Sampuel L. & Sierra P. 2014)

Anexo 4.

Información General de las Lociones Elaboradas:

a) Composición:

b.1) Vitix Lemon:

Etanol al 70%	250 mL
Cáscara de Limón persa	100 mg

b.2) Vitix Jil:

Etanol al 70%	250 mL
Hojas de perejil	100 mg

b) Características de la loción:

Prueba	Especificación Vitix Lemon	Especificación Vitix Jil
Apariencia	Líquido traslúcido	Líquido opaco
Olor:	Característico cítrico	Característico alcohólico
Color:	Verde claro	Verde intenso
pH:	5.54 – 6.04	5.54 – 6.04
Densidad:	0.790 – 1.000	0.790 – 1.000

Fuente: Monografía registro sanitario Producto Terminado.

c) Características del Envase:

Envase	Especificación Vitix Lemon	Especificación Vitix Jil
Capacidad	120 mL	120 ML
Material	PET	PET
Color	Ámbar	Ámbar
Tapadera	Plug	Plug

d) Etiquetas de la loción:

- Loción a base de Cáscara de limón (*Citrus latifolia*):

Composición: Cada 125 mL de loción contienen: Cáscara de limón (<i>Citrus latifolia</i>) 100 g Vehículo c.s.	Vitix Lemon Loción antioxidante	Modo de uso: Aplicar con la ayuda de algodón en las áreas afectadas
Producto elaborado en Guatemala por Laboratorio de Investigación de Productos Naturales LIPRONAT	En afecciones de la piel como Vitiligo y Psoriasis	Vía de administración tópica
	Composición: 120 mL	Precauciones: Utilizar únicamente durante la noche. Consérvese en un lugar fresco y seco.

- Loción a base de Hojas de Perejil (*Petroselinum crispum*).

Composición: Cada 125 mL de loción contienen: Hojas de perejil (<i>Petroselinum crispum</i>) 100 g Vehículo c.s.	Vitix Jil Loción antioxidante	Modo de uso: Aplicar con la ayuda de algodón en las áreas afectadas. Aplicar durante el día, evitando la exposición al sol.
Producto elaborado en Guatemala por Laboratorio de Investigación de Productos Naturales LIPRONAT	En afecciones de la piel como Vitiligo y Psoriasis	Vía de administración tópica.
	Contenido: 120 mL	Consérvese en un lugar fresco y seco.

Anexo 5:

Condiciones en que se realizó el estudio acelerados de estabilidad en las dos lociones.

Tabla 1. Condiciones de almacenamiento de estudio de estabilidad.

Condiciones del estudio de estabilidad	
Sustancias que no requieren refrigeración ni congelación	
Tiempo 6 meses (180 días)	
CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO	ANÁLISIS
40 °C ± 2°C con 75% ± 5% de humedad relativa para formas farmacéuticas sólidas	Inicial
	90 días
	180 días
40 °C ± 2°C para formas farmacéuticas líquidas y semisólidas	Inicial
	90 días
	180 días
40 °C ± 2°C para todas las demás formas farmacéuticas	Inicial
	90 días
	180 días

Fuente: Reglamento Técnico Centroamericano.

Anexo 6.

Desviaciones estándar parámetros cuantitativos:

Cuadro 1. Fechas y temperatura de los lotes analizados.

Lote: <i>Citrus aurantifolia</i> y <i>Petroselinum crispum</i>	Temperatura	Tiempo 0 días	Tiempo 90 días	Tiempo 180 días
A	40±2°C	06/05/2013	05/08/2013	05/11/2013
B	40±2°C	07/05/2013	06/08/2013	05/11/2013
C	40±2°C	08/05/2013	07/08/2013	05/11/2013

Fuente: Datos experimentales laboratorio LIPRONAT y Laboratorio DONOVAN.

Cuadro 2. pH Lote A. (*Citrus aurantifolia*)

Tiempo de Medición	Medición	Resultado	Promedio	Desviación Estándar
0 días	1	5.60	5.586	0.012
	2	5.58		
	3	5.58		
90 días	1	5.59	5.586	0.006
	2	5.58		
	3	5.59		
180 días	1	5.61	5.583	0.025
	2	5.58		
	3	5.56		

Fuente: Datos experimentales Laboratorio DONOVAN.

Cuadro 3. pH Lote A. (*Petroselinum crispum*)

Tiempo de Medición	Medición	Resultado	Promedio	Desviación Estándar
0 días	1	5.71	5.70	0.006
	2	5.70		
	3	5.71		
90 días	1	5.68	5.69	0.017
	2	5.68		
	3	5.71		
180 días	1	5.67	5.66	0.0100
	2	5.65		
	3	5.66		

Fuente: Datos experimentales Laboratorio DONOVAN.

Cuadro 4. pH Lote B. (*Citrus aurantifolia*)

Tiempo de Medición	Medición	Resultado	Promedio	Desviación Estándar
0 días	1	5.60	5.60	0.012
	2	5.60		
	3	5.62		
90 días	1	5.57	5.56	0.012
	2	5.57		
	3	5.55		
180 días	1	5.58	5.57	0.010
	2	5.57		
	3	5.56		

Fuente: Datos experimentales Laboratorio DONOVAN.

Cuadro 5. pH Lote B. (*Petroselinum crispum*)

Tiempo de Medición	Medición	Resultado	Promedio	Desviación Estándar
0 días	1	5.70	5.69	0.015
	2	5.71		
	3	5.68		
90 días	1	5.69	5.68	0.011
	2	5.67		
	3	5.69		
180 días	1	5.71	5.69	0.020
	2	5.67		
	3	5.69		

Fuente: Datos experimentales Laboratorio DONOVAN.

Cuadro 6. pH Lote C (*Citrus aurantifolia*)

Tiempo de Medición	Medición	Resultado	Promedio	Desviación Estándar
0 días	1	5.62	5.60	0.020
	2	5.60		
	3	5.58		
90 días	1	5.61	5.60	0.006
	2	5.61		
	3	5.60		
180 días	1	5.58	5.57	0.006
	2	5.58		
	3	5.57		

Fuente: Datos experimentales Laboratorio DONOVAN.

Cuadro 7. pH Lote C (*Petroselinum crispum*)

Tiempo de Medición	Medición	Resultado	Promedio	Desviación Estándar
0 días	1	5.66	5.67	0.017
	2	5.69		
	3	5.66		
90 días	1	5.70	5.70	0.010
	2	5.71		
	3	5.69		
180 días	1	5.68	5.68	0.010
	2	5.67		
	3	5.69		

Fuente: Datos experimentales Laboratorio DONOVAN.

Cuadro 8. Densidad Relativa 20C⁰, Lote A. (*Citrus aurantifolia*)

Tiempo de Medición	Medición	Resultado	Promedio	Desviación Estándar
0 días	1	0.795	0.7893	0.006
	2	0.789		
	3	0.784		
90 días	1	0.795	0.7953	0.001
	2	0.796		
	3	0.795		
180 días	1	0.795	0.793	0.002
	2	0.791		
	3	0.793		

Fuente: Datos experimentales Laboratorio DONOVAN.

Cuadro 9. Densidad Relativa 20C⁰, Lote A. (*Petroselinum crispum*)

Tiempo de Medición	Medición	Resultado	Promedio	Desviación Estándar
0 días	1	0.800	0.798	0.002
	2	0.795		
	3	0.798		
90 días	1	0.802	0.804	0.007
	2	0.812		
	3	0.799		
180 días	1	0.799	0.797	0.007
	2	0.792		
	3	0.801		

Fuente: Datos experimentales Laboratorio DONOVAN.

Cuadro 10. Densidad Relativa 20C⁰, Lote B. (*Citrus aurantifolia*)

Tiempo de Medición	Medición	Resultado	Promedio	Desviación Estándar
0 días	1	0.801	0.801	0.010
	2	0.813		
	3	0.790		
90 días	1	0.810	0.805	0.005
	2	0.803		
	3	0.801		
180 días	1	0.810	0.814	0.006
	2	0.812		
	3	0.821		

Fuente: Datos experimentales Laboratorio DONOVAN.

Cuadro 11. Densidad Relativa 20C⁰, Lote B. (*Petroselinum crispum*)

Tiempo de Medición	Medición	Resultado	Promedio	Desviación Estándar
0 días	1	0.810	0.811	0.002
	2	0.813		
	3	0.809		
90 días	1	0.799	0.798	0.002
	2	0.800		
	3	0.796		
180 días	1	0.801	0.811	0.010
	2	0.820		
	3	0.813		

Fuente: Datos experimentales Laboratorio DONOVAN.

Cuadro 12. Densidad Relativa 20C⁰, Lote C (*Citrus aurantifolia*)

Tiempo de Medición	Medición	Resultado	Promedio	Desviación Estándar
0 días	1	0.799	0.801	0.008
	2	0.795		
	3	0.810		
90 días	1	0.797	0.801	0.004
	2	0.801		
	3	0.805		
180 días	1	0.799	0.818	0.020
	2	0.823		
	3	0.831		

Fuente: Datos experimentales Laboratorio DONOVAN.

Cuadro 13. Densidad Relativa 20C⁰, Lote C (*Petroselinum crispum*)

Tiempo de Medición	Medición	Resultado	Promedio	Desviación Estándar
0 días	1	0.823	0.809	0.012
	2	0.801		
	3	0.804		
90 días	1	0.810	0.807	0.004
	2	0.804		
	3	0.806		
180 días	1	0.821	0.814	0.006
	2	0.809		
	3	0.812		

Fuente: Datos experimentales Laboratorio DONOVAN.

Anexos 7.

Encuesta de Aceptabilidad y Consentimiento Informado para prueba de lociones en encuesta de estabilidad.

Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia
Escuela de Química Farmacéutica

Loción a base Limón, Vitix Lemon

Instrucciones:

A continuación se le presenta una serie de preguntas, después de aplicarse y conocer la loción proporcionada por favor marque con una X la respuesta que usted considere mejor.

Nombre de la loción: _____

Sexo: M F Edad: _____ Fecha: _____

1. ¿Piensa que la apariencia de la loción es atractiva?

Si

No

1.1. ¿Porqué?

2. ¿Le parece agradable el aroma de la loción?

Si

No

3. ¿Preferiría uno diferente?

Si

No

¿Cuál? _____

4. ¿Deja una sensación agradable la loción después de aplicársela?

Si

5. ¿Considera que es de fácil aplicación?

Si

No

6. ¿Cree que hay una forma más fácil de aplicarla?

Si

No

6.1. ¿Cuál? _____

FIN

Gracias por su colaboración

Anexo 8:

Consentimiento Informado

- **Título de la investigación:**

Investigación de la aceptabilidad de dos lociones, una formulada a partir de limón Persa (*Citrus aurantifolia*), denominada Vitix Lemon, y otra formulada a partir de Perejil, denominada Vitix Jil, como sustitutos de la loción de esencia de Bergamota utilizada en el Hospital Roosevelt para tratamiento de Vitíligo.

- **Objetivo de la investigación:**

El objetivo de la investigación es comprobar la aceptabilidad de dos lociones una formulada a partir de limón y otra a partir de perejil en pacientes sanos, con entendimiento general de cualidades organolépticas a cuidar en una loción.

- **¿Qué se propone en este estudio?**

Determinar si las dos lociones preparadas en este estudio, Vitix Lemon y Vitix Jil, son agradables a las personas que las utilizan, con la finalidad de disminuir las el rechazo a un preparado farmacéutico que se puede presentar en personas que se encuentran sensibles por su estado patológico.

- **Cantidad de los participantes:**

La cantidad de participantes será de 25 sujetos voluntarios para cada loción, considerándose este número de pacientes una muestra representativa de la población.

- **Tiempo requerido:**

Una semana.

- **Riesgos y beneficios:**

El estudio conlleva el riesgo de presentar reacciones adversas tales como la presencia de Irritación y manchas en el lugar en que se aplique la loción, si se exponen al sol por mucho tiempo. Evaluar la preparación farmacéutica en su aceptabilidad, para disminuir la deserción en el tratamiento de vitíligo.

- **Alergias:**

Si es usted alérgico(a) a el limón o perejil hágaselo saber a alguno de los investigadores, ya que podría presentar reacciones adversas tales como la aparición de salpullido, rash u otra manifestación que podría poner en peligro su bienestar físico, y por lo cual no podrá participar en el estudio.

- **Compensación:**

No se dará ninguna compensación económica por participar.

- **Confidencialidad:**

El proceso será estrictamente confidencial. El nombre del paciente no será utilizado en ningún informe cuando los resultados de la investigación sean publicados.

- **Participación voluntaria:**

La participación es estrictamente voluntaria.

- **Derecho de retirarse del estudio:**

El participante tendrá el derecho de retirarse de la investigación en cualquier momento. No habrá ningún tipo de sanción o represalias.

- **A quien contactar en caso de preguntas:**

Sofía MarroquínTintí: 41515245; 22426702

Alejandra López Morales: 42436738

Nathalie Alvarez H. 53546207; 78448166

AUTORIZACION

He leído el procedimiento descrito arriba. El (la) investigador(a) me ha explicado el estudio y ha contestado mis preguntas. Voluntariamente doy mi consentimiento para que Yo

_____, participe en el estudio de Sofía Marroquin, Alejandra Lopez, Nathalie Alvarez sobre Formulación de una loción a partir de (Citrus aurantifolia) limón, (Apium graveolens) apio y (Petroselinum crispum) perejil, como sustitutos de la esencia de Bergamota utilizada en el Hospital Roosevelt para tratamiento Vitíligo.

Firma

Fecha

Anexo 9.

Fichas Técnicas

Limón Persa

Citrus latifolia Tan. (Rutaceae)

Otros nombres populares

Lima de Tahití, limón criollo, limón pérsico, limón mesina, limón sin semilla o lima Bearss (nombrada así en honor de John T. Bearss, quien desarrolló esta variedad sin semillas hacia 1895 en un vivero de Porterville, California). Los cítricos tienen su origen en las regiones tropicales y subtropicales de Asia, de donde se difundieron al resto del mundo (Avilan, 1988).

Partes usadas por sus propiedades medicinales

Jugo del fruto, semillas y cáscara de fruto.

Cómo es la planta

Angiosperma, hojas alternas, ovaladas con márgenes enteros. El árbol es de porte aparrado, con ramas inferiores que tienden a posarse sobre la tierra. Alcanza una altura de 6 a 7 m. y un diámetro de 5 a 6 m. Su tronco es corto y sus ramas crecen en varias direcciones. Fruto tipo hesperidio. Los frutos sin semilla, son normalmente más grandes que los del Limón nacional o "indio", como se le llama. Aunque siempre son verdes, cuando están maduros tienen un color ligeramente amarillo y son blandos al tacto (Avilan, 1967).

Dónde crece

Es la especie de los cítricos más sensible al frío, ya que es la más tropical y presenta floración casi continua. Por lo que requiere para vegetar climas de tipo semitropical. En los climas tropicales, el limonero crece y fructifica con normalidad, sin embargo, los frutos que produce no tienen buena calidad, al ser demasiado gruesos y tener poca acidez. El clima más adecuado para el cultivo del limonero es de tipo mediterráneo libre de heladas. Los períodos de sequía seguidos de precipitaciones juegan un importante papel en la floración (Castillo, 2005).

Composición química



1) Rama con frutos
Citrus latifolia Tan. (Rutaceae)

Composición fitoquímica de la parte medicinal

Como se produce y cuando se colecta

El árbol necesita temperaturas entre 22 y 28°C para su buen desarrollo. Requiere lluvias de mil doscientos a dos mil milímetros al año, y si se riega con frecuencia, crecerá y dará flores constantemente. Crece en terrenos con una altitud de doscientos a novecientos metros sobre el nivel del mar. Los mejores cultivos se obtienen en suelos francos, franco arenoso y profundo, con buena humedad.

La siembra necesita cuidados especiales por parte del agricultor. El limonero debe plantarse en hoyos de treinta centímetros de diámetro y medio metro de profundidad. El sembrador tiene que cuidar que las plantas queden al nivel del suelo o ligeramente arriba. Si parte del tallo queda enterrado en el suelo se tendrán problemas de enfermedades, y si el cuello de la raíz queda por arriba del suelo, las plantas pueden ladearse y las raíces se destapan con los riegos. También se tiene que elegir cuidadosamente la distancia entre las plantas. Si están muy juntas, compiten entre ellas por los nutrientes; si están muy separadas, disminuye la producción de limones.

La cosecha se lleva a cabo cada veinte días de forma manual, usando guantes de algodón y unas tijeras especiales para cortar el pedúnculo. A fin de reducir pérdidas, debe tenerse mucho cuidado en cada paso de la recolección, que incluye escoger, sujetar, desprender y manejar los frutos (Castillo, 2005).

Usos medicinales populares

El jugo del fruto y el polvo del fruto desecado tienen un amplio uso medicinal, solo o en combinaciones. Por vía oral se usa para tratar afecciones respiratorias (amigdalitis, bronquitis, catarro, cefalea, gripe, inapetencia, neumonía, resfrio, tos), gastrointestinales (diarrea, disentería, estomatitis, flatulencia, gastralgia, gastritis, fiebre tifoidea, náusea, vómito) escorbuto, fiebre, gonorrea, hepatitis, hipertensión, ictericia, paludismo, sarampión, reumatismo, y neuralgia.

Las pepitas machacadas con azúcar, se dice que son antihelmínticas.

Tópicamente se usa el jugo puro o diluido en lavados para tratar candidiasis, erisipela, escarlatina, exantema, heridas, herpes, infecciones, llagas, quemaduras, y tiña. En gargarismos para infecciones de la boca y garganta; el jugo o esencia en colirios se usa para conjuntivitis (Castillo, 2005).

Propiedades medicinales demostradas

Se le atribuye propiedad antiséptica, astringente, balsámica, cicatrizante, depurativa, desecante, digestiva, diurética, emenagoga, febrífuga, hipotensora, refrescante, sudorífica y vermífuga. Usos medicinales: el zumo de limón, si se suministra rápidamente, es un antídoto eficaz para la irritación bucal y la inflamación dolorosa resultado de morder aroideas como *Dieffenbachia* spp., *Xanthosoma* spp., *Philodendron* spp., y sus semejantes. Se ha aplicado también para aliviar los efectos de los corales urticantes (Castillo, 2005).

Otros usos de la planta

El principal uso es el consumo en fresco, tanto para la elaboración casera de zumos y refrescos, como aliño o condimento para multitud de platos. En los últimos años se ha incrementado el uso industrial para la obtención de zumos naturales y concentrados, aceite

esencial, pulpas, pectinas, flavonoides, entre otros. y últimamente la producción de ácido cítrico natural con destino a la confección de conservas naturales (Castillo, 2005).

Efectos tóxicos de la planta

La exposición excesiva al aceite de la cáscara del limón Tahití puede causar dermatitis. Rodar los limones entre las manos antes de exprimirlo con el fin de extraer más jugo, cubre las manos con un película de aceite, y este será transferido a cualquier otra parte del cuerpo que se toque antes de lavarse las manos. Subsecuente exposición a la luz solar da lugar a menudo zonas marrones o rojas que pican intensamente, y la formación de ampollas a veces graves. La savia del árbol y los arañazos por las espinas pueden causar erupción en individuos sensibles (Ramos, 2012).

Limón Criollo

Citrus aurantifolia S.

Otros nombres populares:

Lima, lima chichona, lima de chichi, limón agrio, limón liso, limonero.

Partes usadas por sus propiedades:

Han demostrado tener propiedades las hojas, tallos y fruto, así como su aceite esencial.

Cómo es la planta:

Es un árbol pequeño de unos 4m de altura, de ramificación irregular y espinas fuertes y agudas. Las hojas son más anchas en la punta y en el centro que en la base, el soporte de la hoja es un polo alado. Sus flores son pequeñas, solitarias y blancas. Los frutos son pequeños, de 3 a 6 cm de largo, y de color verde amarillento cuando son maduros. La pulpa es abundante, muy ácida y las semillas son de color blanco y pequeñas (Osuna, 2005).

Dónde crece:

Principalmente habita en climas cálido y semicálido, además de semiseco y templado, desde el nivel del mar hasta los 2600 m. Adaptada a distintos hábitats, es cultivada en huertos familiares, asociada con vegetación circundante de bosque tropical caducifolio, subcaducifolio y perennifolio, matorral xerófilo, pastizal, bosque mesófilo de montaña y bosque mixto de pino-encino.

Composición química:

El jugo contiene ácidos orgánicos, vitamina C y B, flavonoides. Piel del

limón: aceite esencial (limonene 90%, citral), cumarinas (limetina), derivados flavónicos.



Composición fitoquímica de la parte medicinal:

Árbol que ha sido ampliamente estudiado y del que se han aislado los siguientes compuestos: ácido cáprico, caprílico, decanoico, fórmico, hidrociánico, isovalérico, laúrico, mirístico, monanóico, oxálico, esteárico; Alcoholes: decil, dodecil, ergosterol, etílico, metil

antralinato, nolil, fenetil; Pirocatecol; isovaleraldehído; Monoterpenos: borneol, Aldehídos: acetaldehído, benzaldehído, decanal, furfural, carveno, citral; Flavonoide: quercetina; Saponinas; Aceite: limoneno; Otros compuestos: triptamina; quinolina; carvona, cresol, guayacol, esperidina, narcotina, En las hojas se han identificado: alcaloides: aceite esencial: derivados terpénicos: limoneno, linalol, nerol; principios amargos; flavonoides; heterósidos flavónicos como hesperidósido; flavón: diomósido (Cáceres, 1996).

Cómo se produce y cuándo se colecta:

Al igual que otras plantas cultivadas, el limón sutil fue propagado inicialmente por semillas; pero en la actualidad, la propagación vegetativa por injerto es la más utilizada para mantener las características de los progenitores en las nuevas generaciones. En el caso del limón sutil, las formas de multiplicación vegetativa son: por brotes de ramas enraizadas en las plantas adultas, mediante acodo aéreo cuando se dispone injertando yemas y/o brotes sobre patrones seleccionados por su compatibilidad y las condiciones del medio ambiente (Cáceres, 1996).

Usos medicinales populares:

El limón es ampliamente utilizado para el tratamiento de la diarrea y de las diferentes disenterías (roja, blanca y la que presenta moco) así también como desparasitante, antihelmíntico y antamibiano. Para el tratamiento de estos padecimientos se emplean diversas partes de la planta como son el fruto (es el más utilizado), su jugo y el pericarpio así como sus hojas y retoños (Osuna, 2005).

También se recomienda con mucha frecuencia por sus propiedades curativas en los nervios, para problemas respiratorios como: catarro, dolor de garganta, gripe, infección de la garganta y resfrío.

Propiedades medicinales demostradas:

Árbol frutal y medicinal, del que se han demostrado sus propiedades antibacterianas principalmente, tanto de las hojas, tallos y fruto, como de su aceite esencial. Además de antimicótico y astringente.

Otros usos de la planta:

La mayor parte de los frutos frescos se usan en limonadas y otras bebidas, pasteles, té y para sazonar mariscos y otros alimentos. Se usan también para embotellas el jugo y en la fabricación de bebidas carbonatadas. Un producto derivado de importancia es el aceite de limón que se usa en cosméticos y preparación de sazones (Osuna, 2005).

Apio

Apium graveolens L.

Otros nombres populares:

Apium graveolens L. var. *Dulce* Pers., el más cultivado y comercializado como apio; y *Apium graveolens* L. var. *rapaceum* D.C., apio nabo, cultivado para usar sus raíces que acumulan muchas reservas alimenticias; tiene pecíolos más delgados que el apio y popularmente se dice que desde el punto de vista medicinal es el más efectivo.

Apio, apio borde, apio de agua, apio palustre, celerí, sédano-rapa (España); apio de España, apio de monte, apio silvestre (Venezuela). En varios países también se le llama: apio dulce, arranchana (Fonnegra, 2007).

Partes usadas por sus propiedades medicinales:

Hojas (especialmente los pecíolos); en algunas ocasiones se usan las raíces muy raramente los frutos. Las hojas tienen el nombre farmacológico de *Apium graveolentis herba*, antes *Herba apium graveolentis*.

Cómo es la planta:

Planta herbácea, bianual, hasta de 50 cm de altura. Tallo hueco, acanalado, succulento, con surcos externos o estrías profundas. Hojas lobuladas, lisas, brillantes, verde amarillosas, pecíolos largos, más o menos triangulares. Flores blancas o blanco verdosas, reunidas en umbelas. Frutos planoconvexos o esféricos, estriados, oscuros, acanalados, aromáticos (Fonnegra, 2007).

Dónde crece:



Composición química:

Los frutos son ricos en aceite esencial (hasta un 3%) constituido principalmente por d-limoneno (60%), apiol, ácido linoleico, ácido palmítico, ácido petroselinico, selineno (sesquiterpeno presente en casi un 10%), sedanólido y sedanenólido (butilftálidos) y derivados del ácido sedanónico (ambos son las lactosas responsables del olor característicos). Se ha detectado la presencia de alcaloides (no identificados) en los frutos, cumarinas y furanocumarinas (Muñoz, 2004).

Composición fitoquímica de la parte medicinal:

Existen estudios en animales que constatan el efecto diurético y antiespasmódico de los frutos de apio, pero aún no se encuentra suficientemente demostrada su efectividad y seguridad en personas. Según Arreche (1992) es diurético y carminativo. Se ha demostrado que el extracto acuoso disminuye la artritis en ratas. Es hipotensor en animales y humanos. Los ftálicos son sedantes y tienen propiedades antiepilépticas en ratones y ratas. El aceite es antifúngico *in vitro* (Wren, 1994).

Cómo se produce y cuándo se cultiva:

Requiere climas templados y húmedos, con temperaturas entre 15 y 21°C. Se propaga por semillas en un sustrato fino. Las plántulas se trasplantan a una distancia de 30 a 60 cm entre sí, en suelos ricos en nutrientes y húmedos, bien regadas no inundadas.

Usos medicinales populares:

Es considerado uno de los principales tónicos estomacales y aperitivos, emenagogo, febrífugo, digestivo amargo, estomáquico, afrodisíaco, estimulante suave, reconstituyente en los estados de debilidad, diurético, sedante, carminativo y expectorante. Se utiliza para reducir la tensión sanguínea e incrementar la excreción del ácido úrico. Se considera un gran depurativo de la sangre, antiséptico urinario, antiinflamatorio (Dolencias reumáticas), antiescorbútico. Se usa para sanar personas con ictericia, hidropesía, reumatismo y gota. Ingerido crudo, el apio se usa para combatir la afonía, el hipo y la dismenorrea. Se dice que el consumo del tallo fresco estimula el flujo de la leche tras el parto. En cataplasmas, las hojas se utilizan para limpiar llagas y úlceras y facilitar el encoramiento. La decocción de la raíz se usa como diurético, contra los cálculos y arenillas del sistema urinario y del hígado. Además, es estimulante del hígado. Se usa para reducir los cálculos de vejiga y actúa contra el reumatismo (Fonnegra, 2007).

Propiedades medicinales demostradas:

Antiinflamatorio

Otros usos de la planta:

Se cultiva como hortaliza para condimentar carnes, cocidos, sopas y ensaladas. Se comen las ramas tiernas crudas o cocidas, para lo cual se añaden al final de la cocción. Tiene un sabor fresco característico, es de textura crujiente.

Efectos tóxicos de la planta:

Contraindicado en embarazo. En personas sensibilizadas, el apio puede desencadenar reacciones alérgicas, que pueden llegar incluso al shock anafiláctico. El aceite de las semillas puede aumentar la fotosensibilidad, por lo cual cuando se va a recibir el sol, no debe aplicarse externamente sin utilizar bloqueadores solares. No se deben administrar el aceite o dosis altas de semillas durante el embarazo, ya que actúan como estimulantes uterinos y pueden causar aborto (Fonnegra, 2007).

Perejil

Petroselinum crispum

Otros nombres populares:

Se le llama perejil crespo y algunas veces perejil rizado, alpichala (Aguilar, 1966).

Partes usadas por sus propiedades medicinales:

Las raíces, las semillas (Fonnegra & Jiménez ,2007).

Como es la planta:

Planta herbácea bianual, de hasta 1 m de altura, aromática. Raíz larga, cónica, blanca y ocre. En su primer año forma una roseta terrestre de hojas verde oscuras, brillantes; compuestas, divididas hasta tres veces. Durante su segundo año produce un tallo ramificado de hojas alternas y que termina en umbelas de flores verde amarillosas. Fruto diaquenio, oval. (Fonnegra & Jiménez ,2007)

Donde crece:

Se propaga por semillas; algunas veces se cultiva en un tiesto, matera o maceta, situando en un lugar cálido, cerca de una ventana



Composición química:

La raíz contiene flavonoides (apiña), poliacetilenos (falcarinol), aceite esencial (0.3 a 0.7%) con apiol, miristicina y beta-felandreno, furanocumarinas (bergapteno, oxipeucedanina, isoimperatorina) (Fonnegra & Jiménez ,2007).

Composición fitoquímica de la parte medicinal:

Flavonoides, principalmente apigenina, antiinflamatorios, que inhiben la liberación de histamina y que actúan como eliminadores de radicales libres. El apiol es antipirético y los ftálicos son sedantes en los ratones (Fonnegra & Jiménez ,2007).

Como se produce y cuando se colecta:

Los frutos y las raíces se deben recolectar jóvenes; antes de que se lignifiquen, se limpian cuidadosamente, se cortan longitudinalmente y se secan a una temperatura no mayor de 40°C. El material fresco es más eficaz que aquel que ha sido secado (Fonnegra & Jiménez ,2007).

Usos medicinales populares:

Se emplea como diurético, urológico, espasmolítico, carminativo, aperitivo, antiséptico, expectorante, antirreumático, sedante, estimulante uterino. Se considera que evita y cura los cólicos menstruales, alivia las intoxicaciones por exceso de bebidas alcohólicas, ejerce una potente acción sobre los aparatos urinario y digestivo al provocar la relajación de los músculos; tonifica y vigoriza las glándulas suprarrenales; en dosis pequeñas estimula el apetito y la digestión. Masticando la planta o los frutos se curan las ulceraciones de la boca y se controla el mal aliento (halitosis). La decocción de la raíz se usa como aperitivo, estimulante y sudorífico; se utiliza en caso de ictericia, hidropesía, afecciones de las vías urinarias, riñones y retención de la orina. Una gasa empapada con el jugo de la raíz fresca se aplica externamente como vulnerario y antiflogístico (contra picadura de insectos). La decocción o la infusión de las semillas secas se usa como tónico, estomacal, excitante, antineurálgico, vermífugo y para mitigar las excitaciones nerviosas (Fonnegra & Jiménez,2007).

Propiedades medicinales demostradas:

Antiespasmódico y antiflatulento (OPS/OMS, 1995).

Otros usos de la planta:

Se cultiva ampliamente como hortaliza por sus hojas y por sus raíces; sus hojas rizadas son utilizadas como aderezo decorativo. El perejil de hojas planas tiene mayor sabor y es apreciado para aromatizar quesos y en culinaria. El perejil es la fuente más rica de vitamina A de todo el reino vegetal (OPS/OMS, 1995).

Efectos tóxicos de la planta:

Las dosis altas de la infusión de la raíz provocan congestión de las mucosas digestivas y contracciones uterinas, por tanto, está contraindicado el uso en las mujeres embarazadas. En grandes dosis, cualquier preparado de raíz o semillas de perejil, puede resultar tóxico o tener una acción nefasta sobre los riñones y sobre el SNC (ocasiona desvanecimientos). Provoca irritación del músculo uterino y puede ocasionar hemorragias fuera de la menstruación o provocar flujos menstruales más abundantes de lo normal. El aceite esencial ejerce acción irritante sobre los riñones (House, 1989).

Nathalie Lucía Raquel Álvarez Hernández
Autora

Alejandra Betsabé López Morales
Autora

Sofía Magnolia Marroquín Tintí
Autora

Dra. Sully Margot Cruz Velásquez
Asesor

Lic. Julio Chinchilla
Revisor

MSc. Hada Mariera Alvarado Beteta
Directora de Escuela

Dr. Rubén Velásquez Miranda
Decano