



Universidad Autónoma del Estado de México
Facultad de Ciencias



**“Evaluación de la liberación de un extracto del cultivo celular de
Buddleja cordata por el hidrogel formulado con mucílago de
Opuntia ficus-indica, quitosano e hipromelosa”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

Isaac Martínez Valdespino

Asesora académica:

Dra. María Elena Estrada Zúñiga

Co-asesora académica:

Dra. María Fernanda Ballesteros Rivas

El Cerrillo, Piedras Blancas, 18 de mayo de 2021

Esta tesis se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivos *in vitro* y Fitoquímica del Centro de Investigación en Recursos Bióticos y en el Laboratorio de Síntesis de Membranas del Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable UAEM-UNAM, ambos pertenecientes a la Universidad Autónoma del Estado de México. Con especial agradecimiento por su constante y amplio apoyo en la elaboración y culminación de este trabajo a la Dra. Ma. Elena Estrada Zúñiga y a la Dra. Ma. Fernanda Ballesteros Rivas. Parte de los recursos empleados provienen del proyecto aprobado por COMECYT con el folio 1618-2017.

RESUMEN

Un hidrogel es un sistema capaz de dirigir o suministrar un fármaco a una determinada dosis; éste puede activarse tras algunos minutos o después de algunas horas desde su aplicación y de ser necesario, lograr mantener una dosificación continua del fármaco al organismo de interés por varios días, lo cual ofrece claras ventajas sobre la dosificación directa de fármacos (ej. pastillas e inyecciones). Existe un interés creciente por desarrollar hidrogeles a base de productos de origen natural debido a su bajo costo y a la ineficiencia de algunos métodos de suministro de fármacos que resultan en costos elevados y en toxicidad celular innecesaria. En el presente trabajo se desarrollan diferentes formulaciones de hidrogel a base de polisacáridos de origen natural (mucílago de *Opuntia ficus-indica*, hipromelosa y quitosano) como un sistema de liberación de un extracto crudo de un cultivo celular de *Buddleja cordata* (el cual ha demostrado poseer actividades biológicas). Con el extracto y el mucílago obtenidos mediante el empleo de soluciones hidroalcohólicas, quitosano e hipromelosa, se realizaron cuatro hidrogeles (con 2% de monómeros) por el método de precipitación y evaporación en placa; posteriormente se evaluó el porcentaje de hinchamiento y acorde al modelo de difusión propuesto por Korsmeyer-Peppas, se determinó en cada hidrogel el mecanismo de liberación del extracto de *B. cordata*. Se observó que la conjugación de mucílago de *O. ficus-indica* con hipromelosa en la formación de hidrogel, otorga adherencia a superficies y alta retención de solvente, en cambio los hidrogeles con quitosano presentaron mayor elasticidad y una menor retención de solvente; la liberación del extracto de *B. cordata* en los hidrogeles a base de quitosano estuvo dominada por la permeación del solvente a la matriz, dando lugar a una liberación prolongada, mientras que en el hidrogel con mucílago se observó una liberación del extracto dominada por la degradación del propio hidrogel en el medio solvente. Tales características en los hidrogeles obtenidos podrían ser aprovechadas, para ello es necesario dar continuidad al presente trabajo con la evaluación fisicoquímica y biológica correspondiente.

ABSTRACT

A hydrogel is a system capable of directing or delivering a drug at a certain dose; This can be activated after a few minutes or after a few hours from its application and if necessary, achieve a continuous dosage of the drug to the organism of interest for several days, which offers clear advantages over the direct dosage of drugs (eg pills and injections). There is a growing interest in developing hydrogels based on products of natural origin due to their low cost and the inefficiency of some drug delivery methods that result in high costs and unnecessary cellular toxicity. In the present work, different formulations of hydrogel based on polysaccharides of natural origin (*Opuntia ficus-indica* mucilage, hypromellose and chitosan) are developed as a release system of a crude extract of a *Buddleja cordata* cell culture (which has shown possess biological activities). With the extract and mucilage obtained by using hydroalcoholic solutions, chitosan and hypromellose, four hydrogels (with 2% monomers) were made by the method of precipitation and plate evaporation; later the swelling percentage was evaluated and according to the diffusion model proposed by Korsmeyer-Peppas, the release mechanism of the *B. cordata* extract was determined in each hydrogel. It was observed that the conjugation of *O. ficus-indica* mucilage with hypromellose in the formation of hydrogel, gives adherence to surfaces and high solvent retention, whereas hydrogels with chitosan presented higher elasticity and lower solvent retention; the release of the *B. cordata* extract in the chitosan-based hydrogels was dominated by the permeation of the solvent to the matrix, resulting in a prolonged release, while in the hydrogel with mucilage, a release of the extract dominated by degradation of the hydrogel itself in the solvent medium was observed. Such characteristics in the hydrogels obtained could be used, for this it is necessary to give continuity to the present work with the corresponding physicochemical and biological evaluation.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	8
2. ANTECEDENTES	11
2.1 Hidrogeles: Sistemas de liberación de fármacos	11
2.1.1 Clasificación	12
2.1.2 Propiedades	13
2.1.3 Sistema de liberación	16
2.1.4 Modelo de difusión	17
2.2 Biopolímeros: polisacáridos naturales para la síntesis de hidrogel	19
2.3 Fitoquímica: las plantas como fuente de compuestos bioactivos	22
2.3.1 Clasificación de metabolitos vegetales	23
2.3.2 Técnicas de identificación: screening fitoquímico y espectroscopías	29
2.4 Botánica y fitoquímica de <i>Opuntia ficus-indica</i>	31
2.5 Botánica y fitoquímica de <i>Buddleja cordata</i>	32
2.5.1 Verbascósido	34
2.5.2 Biodisponibilidad y absorción del verbascósido	34
3. JUSTIFICACIÓN	36
4. HIPÓTESIS	37
5. OBJETIVOS	38
5.1 General	38
5.2 Particulares	38
6. METODOLOGÍA	39
6.1 Obtención del material vegetal	39
6.1.1 Obtención del extracto de <i>B. cordata</i>	39
6.1.2 Extracción de mucílago	39
6.2 Caracterización fitoquímica cualitativa del extracto de <i>B. cordata</i>	40
6.2.1 Prueba de fenoles	40
6.2.2 Prueba de diterpenos	40
6.2.3 Prueba de triterpenos-esteroles (prueba de Salkowski y Lieberman – Burchardt)	40

6.2.4 Prueba de saponinas (prueba de espuma).....	41
6.2.6 Prueba de alcaloides (prueba de Dragendorff)	41
6.2.7 Prueba de péptidos (prueba de Biuret).....	41
6.2.8 Prueba de azúcares reductores (prueba de Fehling)	41
6.2.9 Espectrometría de absorción UV-Vis	42
6.3 Caracterización fitoquímica cuantitativa del extracto de <i>B. cordata</i>	42
6.3.1 Determinación del contenido de fenoles totales	42
6.3.2 Determinación del contenido de fenilpropanoides totales (orto-di y orto-tri fenoles).....	43
6.3.3 Determinación del contenido de flavonoides totales.....	43
6.3.4 Determinación del potencial antioxidante	43
6.4 Caracterización fisicoquímica del mucílago y del extracto.....	44
6.4.1 Análisis elemental C-H-N-S.....	44
6.4.2 Análisis termogravimétrico (TGA) y calorimetría de barrido diferencial (DSC)	44
6.4.3 Espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FTIR).....	45
6.5 Preparación de hidrogel	45
6.6 Caracterización del hidrogel	46
6.6.1 Absorción de agua.....	46
6.6.2 Liberación de extracto.....	46
6.6.3 Espectroscopia Infrarroja de transformada de Fourier.....	47
6.6.4 Análisis termogravimétrico y calorimetría de barrido diferencial	47
6.7 Análisis estadística de los resultados	47
7. RESULTADOS.....	48
7.1 Rendimiento y caracterización del material vegetal	48
7.1.1 Extracto de <i>B. cordata</i>	48
7.1.2 Mucílago.....	50
7.2 Caracterización de hidrogel	54
8. DISCUSIÓN	63
9. CONCLUSIÓN	68
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Curva de fuerza vs tensión para materiales.	13
Figura 2 Esquemización de un termograma por DSC clásico.....	15
Figura 3 Ácidos grasos y derivados.	24
Figura 4 Terpenos de importancia.	25
Figura 5 Compuestos aromáticos de importancia.	27
Figura 6 Carbohidratos.....	28
Figura 7 Aminas y alcaloides de importancia.....	29
Figura 8 Curva patrón de absorbancia vs concentración.....	30
Figura 9 <i>Opuntia ficus-indica</i>	31
Figura 10 <i>Buddleja cordata</i>	33
Figura 11 Estructura molecular del verbascósido.....	34
Figura 12 Espectro de absorción UV-Vis del extracto crudo rehidratado <i>B. cordata</i>	49
Figura 13 Termograma TGA/DSC del extracto crudo de <i>B. cordata</i>	50
Figura 14 Mucílago fresco suspendido en etanol 96%.....	50
Figura 15 Termograma TGA/DSC del mucílago deshidratado.....	51
Figura 16 Espectros IR de quitosano, hipromelosa y mucílago, polisacáridos empleados para la síntesis de hidrogel.....	53
Figura 17 Hidrogel obtenido.....	54
Figura 18 Prueba de cajas y bigotes: evaluando %S (S) entre cada tipo de hidrogel (GEL).....	56
Figura 19 Prueba de cajas y bigotes: evaluando el exponente de liberación (n) entre cada tipo de hidrogel (B.GEL).....	57
Figura 20 Termogramas DSC/TGA de hidrogeles obtenidos.....	60
Figura 21 Espectros IR de los hidrogeles obtenidos.....	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales polisacáridos de origen natural.....	19
Tabla 2. Componentes químicos para la formulación de hidrogel.	46
Tabla 3. Resultados de pruebas fitoquímicas cualitativas del extracto de <i>B. cordata</i> ...	48
Tabla 4. Resultados del análisis cuantitativo del extracto de <i>B. cordata</i>	48
Tabla 5. Asignación de bandas acorde a frecuencias observadas en el espectro IR de quitosano, mucílago e hipromelosa.	52
Tabla 6. Porcentaje de hinchamiento de las cuatro formulaciones de hidrogel.	55
Tabla 7. Prueba de rangos múltiples evaluando el porcentaje de hinchamiento (%S) entre cada hidrogel.....	55
Tabla 8. Constante de velocidad de liberación (k) y exponente de liberación (n) obtenidas con el modelo Korsmeyer-Peppas con su nivel de ajuste al modelo (R^2) .	56
Tabla 9. Prueba de rangos múltiples evaluando el exponente de liberación (n) entre cada hidrogel.....	57
Tabla 10. Asignación de bandas IR para glicerol e hidrogel M-HPMC.	61

1. INTRODUCCIÓN

Un hidrogel es un sistema polimérico capaz de adsorber y retener definitivamente un líquido, comúnmente agua; tal sistema es una red o matriz porosa y elástica en la cual quedan embebidas partículas del líquido adsorbido, lo anterior lleva a un incremento del volumen y peso del hidrogel (Wang *et al.*, 2016; Sougata *et al.*, 2017). La cantidad de líquido que puede atrapar esta matriz estará relacionada al grado de polimerización y tipo de constituyentes empleados en su síntesis. Puede ser empleado como un sistema de liberación de fármacos (DDS por sus siglas en inglés: Drug Delivery System) y tiene claras ventajas en el modo de administración de fármacos frente a métodos tradicionales como tabletas, cápsulas o ungüentos, pues se puede controlar la dosis suministrada por periodo de tiempo y aplicarse a una región específica, lo que permite una mayor asimilación celular y evita el uso excesivo de compuestos que pueden ser citotóxicos en grandes concentraciones (Wang *et al.*, 2016; Sougata *et al.*, 2017).

En un DDS de hidrogel, el ritmo de liberación de compuestos dependerá del tamaño de poro y de la densidad de la matriz (Garazi *et al.*, 2015). Éste puede estar formado por polímeros sintéticos o naturales como las gomas, mucílago y derivados de celulosa. A partir de polímeros naturales se puede crear un hidrogel líquido, películas elásticas, o sólidos con cierta firmeza; lo anterior dependerá de la concentración de los compuestos y aditivos utilizados, sean enlazantes o plastificantes. Algunos derivados de celulosa como la hipromelosa (HPMC) aumentan la capacidad de retención de agua. Ésta es un éter de celulosa soluble en agua, se utiliza como lubricante oftálmico, en la preparación de tabletas, en la formación de cápsulas, es un excelente formador de películas finas y se usa como aditivo en alimentos. La HPMC se puede encontrar con diferentes niveles de viscosidad, siendo la más utilizada en tabletas aquella de 11250-21000 cps. Otro polímero natural de interés es el quitosano, el cual se obtiene a partir de la quitina, el segundo polímero natural más abundante después de la celulosa que se encuentra de forma natural

como constituyente de los caparazones de artrópodos (insectos, arácnidos, moluscos) y en la pared celular de hongos; es biodegradable, no tóxico, y estable. Existen cientos de estudios acerca del quitosano y su aplicación en recubrimientos e hidrogeles, diferenciándose unos de otros por la formación de enlaces covalentes o puentes de hidrógeno en la matriz. Su característica catiónica le permite formar complejos con sulfatos, citratos, fosfatos y aniones metálicos. Se ha reportado la síntesis de geles líquidos, polvos, películas, tabletas, esferas, microesferas, cápsulas, etc. En formulaciones que incluyen alginato, genipina, heparina, celulosa, pectina, gelatina, queratina, colágeno, alcohol polivinílico (PVA), polietilenglicol (PEG), se han obtenido hidrogeles a base de quitosano sensibles a temperatura, pH, flujos eléctricos, con diferentes grados de solubilidad, etc.; esto ha permitido el desarrollo de infinidad de productos actualmente en el mercado, lo que posiciona al quitosano como el polímero de excelencia y favorito en la formación de matrices de DDS (Narayan *et al.*, 2010; Pawar *et al.*, 2013).

Recientemente se ha comenzado a estudiar al mucílago, un componente polimérico esencial de diversas especies vegetales, estos logran incrementar la viscosidad y tensión de la matriz, permitiendo a las partículas embebidas estar suspendidas el tiempo necesario para ser liberadas uniformemente del sistema (Prajapati *et al.*, 2013). Se sabe que los mucílagos no son tóxicos y algunos son comestibles según la especie vegetal de la cual provengan. Su principal función en especies vegetales es la de otorgar mayor retención de agua en ambientes secos y se les puede encontrar en semillas, tallos u hojas modificadas. Los mucílagos son un polisacárido complejo de galactosa y arabinosa que puede retener diversos productos del metabolismo secundario (Prajapati *et al.*, 2013; Saenz *et al.*, 2004). Una especie vegetal que produce mucílago es *Opuntia ficus-indica*, popularmente conocida en México como nopal, la cual tiene una amplia distribución en el mundo y crece principalmente en zonas áridas (De Leo *et al.*, 2010; Ammar *et al.*, 2012). La producción de nopal anual para 2019 en nuestro país fue de 892,000 toneladas, lo cual nos posiciona como el principal productor a nivel mundial, siendo la Ciudad de México la principal entidad productora (SIAP, 2020). En la medicina tradicional de México el

nopal es utilizado para tratar ulceraciones, gastritis, hiperglucemia, aterosclerosis, diabetes mellitus, hemorroides, colitis, diarrea, heridas de la piel, para el control de colesterol e inclusive se especula que puede disminuir el riesgo de padecer cáncer (Ávila *et al.*, 2014; Ammar *et al.*, 2010). Se han caracterizado algunos compuestos contenidos en sus cladodios, frutos y flores. En extractos apolares de flores se identificaron algunos metabolitos secundarios, tales como: rutina, quercetina, luteína, kaempferol, β -sitosterol, limoneno, pinocamfeol, germacreno, esculina, ácido benzoico, entre otros (Ammar *et al.*, 2010, 2012, 2015; De Leo, *et al.*, 2010). Se ha reportado que el mucílago de flores de nopal favorece el proceso de cicatrización *in vivo* en ratas. Recientemente se han realizado investigaciones científicas que validan propiedades medicinales del mucílago de nopal, éstas asociadas a procesos de cicatrización; también se ha probado la efectividad de extractos de flores de nopal en la inhibición de crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli* (Ammar *et al.*, 2012, 2015; Saenz *et al.*, 2004).

Otra especie medicinal que también está siendo estudiada científicamente para validar sus propiedades medicinales, es *Buddleja cordata*. Esta especie es de amplia distribución en el altiplano mexicano, prefiriendo climas templados. Popularmente es conocida como “tepozán”, a esta especie vegetal se le atribuyen propiedades analgésicas, eupépticas, diuréticas, antisépticas; se ha utilizado tópicamente el macerado de las hojas de esta planta para tratar tumores, abscesos, llagas y quemaduras. Estudios fitoquímicos sobre esta planta identificaron diversos metabolitos secundarios poseedores de actividades biológicas, tales como flavonoides, sesquiterpenoides y feniletanoides (Ávila *et al.*, 2014; Romero *et al.*, 2003) que validan parte de las propiedades medicinales que se le atribuyen. Además, estudios sobre un cultivo celular de la especie han demostrado su potencial como una fuente de algunos de dichos metabolitos secundarios (Gutiérrez-Rebolledo *et al.*, 2018, 2019; Estrada-Zúñiga *et al.*, 2009). No obstante, no existen reportes en la literatura sobre el empleo de polímeros como mucílago, quitosano y HPMC para la formulación de geles que funcionen como matriz para la liberación de un extracto obtenido del cultivo celular de *B. cordata*.

2. ANTECEDENTES

2.1 Hidrogeles: Sistemas de liberación de fármacos

Un fármaco es una sustancia químicamente conocida, diferente a un nutriente, que produce una reacción biológica cuando es suministrada a un ser vivo (Henderson *et al.*, 2016), estas sustancias tienen características específicas que deben tomarse en cuenta para poder aprovecharse y lograr el efecto terapéutico deseado. Para lograr el efecto esperado el fármaco debe: suministrarse a la concentración en cual generará el efecto deseado, lograr una solubilidad adecuada, mantener su estabilidad el tiempo necesario y llegar al sitio blanco sobre el cual actuará (Binghe *et al.*, 2016).

La forma tradicional en la cual se suministran la mayoría de fármacos es por vía oral en forma de tabletas, cápsulas y emulsiones. En segundo término, se suministran vía intra muscular o intra venosa mediante soluciones inyectables; ambas formas de suministro son inespecíficas pues dependen de la absorción por el tracto digestivo y del flujo sanguíneo para llegar al sitio blanco, además, se suministran en concentraciones altas o se requiere de varias dosis para lograr el efecto deseado y se modifican químicamente para conferirles la estabilidad suficiente para sobrellevar su trayecto.

Para resolver los problemas anteriores y hacer específica la forma de suministro y acción de las sustancias activas, se han desarrollado diversos sistemas que otorgan un mayor control de la dosificación. Estos son capaces de liberar a un ritmo constante la droga requerida, pueden iniciar o detener la dosificación según las condiciones en las que se encuentren (variaciones de pH, temperatura, humedad, radiación) y las características de los sistemas pueden adaptarse a la forma de suministro preferida.

Uno de los sistemas que más se está desarrollando es del tipo hidrogel, ya que estos pueden funcionar de forma oral y transdérmica debido a su alta biocompatibilidad, la cual se debe a sus propiedades hidrofílicas y fácil degradación. Un hidrogel es una matriz polimérica tridimensional capaz de adsorber líquido, lo cual ocasiona generalmente un cambio en sus dimensiones y propiedades mecánicas. Estos son excelentes biomateriales pues imitan eficazmente el tejido vivo al ser suaves

y gomosos (Matricardi *et al.*, 2016; Hillery *et al.* 2017). Químicamente, las cadenas poliméricas del hidrogel poseen grupos funcionales amino, carboxilo e hidroxilo, dichos grupos son altamente hidrofílicos y son responsables de la capacidad de un hidrogel de retener agua en su matriz (Vashist *et al.*, 2013). Se les puede sintetizar en forma líquida o sólida, ambas formas retienen líquido, en forma sólida presentan flexibilidad o resistencia a la deformación, estos regresan a su forma inicial al dejar de recibir la fuerza externa, en forma líquida pueden permitir la difusión de compuestos con forma salina con mayor facilidad (Hillery *et al.* 2017).

2.1.1 Clasificación

Se les puede clasificar primariamente en dos grupos según las formas en la que se entrelazan las cadenas poliméricas de la matriz; es un **hidrogel químico o permanente** si las cadenas están enlazadas por uniones covalentes, o bien, es un **hidrogel físico o temporal**, cuando las cadenas poliméricas se encuentran unidas por fuerzas intermoleculares como puentes de hidrógeno, fuerzas iónicas o por compactación molecular. Según la fuente de las materias primas que lo conforman se les puede considerar como **sintéticos** (ej. PEG, PLGA (poly(lactic-co-glycolic acid))) o **naturales** (ej. quitosano, agarosa).

Acorde al tipo de polimerización encontramos a los **homopolímeros**, compuestos de un único monómero hidrofílico, a los **copolímeros**, compuestos de dos distintos monómeros, pero siendo cuando menos uno hidrofílico, y finalmente los de **red de polímeros interpenetrantes**, donde dos redes poliméricas se encuentran unidas por fuerzas intermoleculares, pudiendo una ser a su vez una red química y otra una red física. Basados en su estructura física pueden ser **amorfos** cuando el arreglo macromolecular no está ordenado, **semiamorfos** si existen áreas en las que se tiene un orden macromolecular y otras donde se mantiene un acomodo no ordenado, finalmente un hidrogel es **cristalino** cuando se logra un orden continuo en el arreglo macromolecular de su red.

De acuerdo a la carga iónica de sus elementos se les puede considerar como **neutros**, **aniónicos (-)**, **catiónicos (+)** o **anfóteros** si estos pueden actuar como ácidos o bases (Mishra *et al.*, 2017; Ahmed, 2015).

2.1.2 Propiedades

Una de las principales características a tomar en cuenta al momento de sintetizar un hidrogel es la resistencia mecánica. Esta propiedad está ampliamente ligada a las aplicaciones específicas a las que se podrá destinar el producto. Generalmente se evalúa en su forma hidratada el **módulo de compresión** y la **tensión de rotura (TS)**, se efectúa al aplicar una fuerza en incremento constante o por cierto periodo de tiempo al material, a partir de los datos obtenidos se obtiene una curva creciente de estrés que entre más pronunciada sea, mayor el módulo de compresión será, lo cual se traduce como una mayor rigidez del hidrogel, el máximo de esta curva establece el punto de ruptura del material y da inicio a la caída de la curva (Figura 1). En hidrogeles altamente hidratados generalmente no se obtiene alta resistencia mecánica debido a la distribución irregular de puntos de entrelazado, lo que ocasiona una mala disipación de las fuerzas aplicadas a la matriz (Matricardi *et al.*, 2016; Hillery *et al.* 2017).

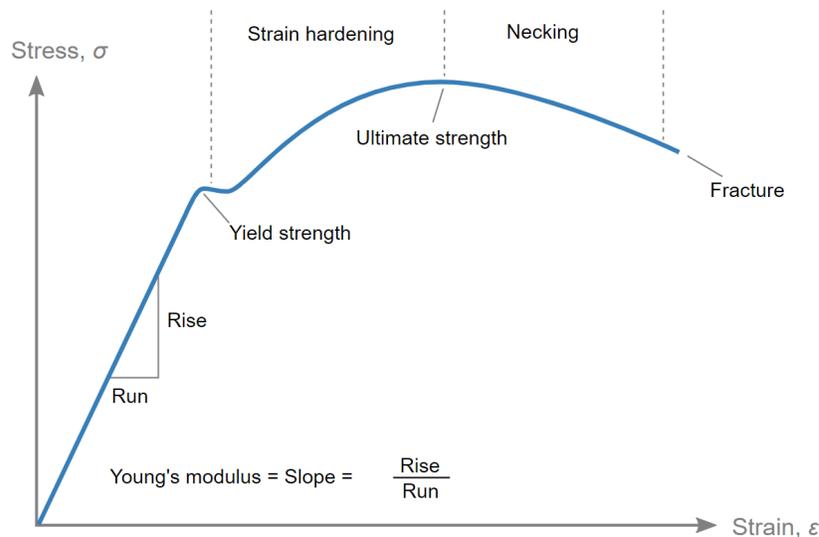


Figura 1 Curva de fuerza vs tensión para materiales. Modificado de Hillery *et al.* 2017

La segunda característica de importancia es el grado de **hinchamiento** del hidrogel, lo cual implica el volumen máximo de líquido que puede retener. El agua puede interaccionar de diferentes maneras con el hidrogel, primariamente puede estar **enlazada** a los grupos polares de la red por puentes de hidrógeno o a los iones de esta por fuerzas electroestáticas, puede no estar unida a las cadenas poliméricas, pero estará **atrapada** físicamente entre la red, y esta podrá estar **libre** en la capa externa del hidrogel y podrá ser removida por centrifugación. Otro factor que influye en el grado de hinchamiento es el tipo de cargas que se encuentran en las cadenas poliméricas, cuando el hidrogel es de tipo catiónico este estará favorecido en condiciones de pH bajo, por el contrario, un hidrogel aniónico podrá absorber mayor volumen de agua en un pH alto.

El porcentaje de hinchamiento se puede determinar con la siguiente ecuación:

$$\% S = \frac{W_s - W_d}{W_d} \times 100$$

donde W_s indica el peso del hidrogel hidratado, W_d el peso del hidrogel deshidratado y %S el porcentaje de hinchamiento. A mayor porcentaje, mayor cantidad de agua estará contenida y por ende mayor será la difusión del soluto que se desea suministrar (Matricardi *et al*, 2016; Hillery *et al*. 2017).

Para conocer más sobre la estructura física de un hidrogel es posible realizar análisis térmico, a través de la **calorimetría diferencial de barrido (DSC)**, técnica que monitorea los cambios asociados a transiciones de fase y reacciones químicas en una muestra en función de la temperatura (T); estos cambios en la muestra son detectados como flujo de calor (Q). Estos procesos son de índole exotérmica (liberación de calor, negativas al flujo) o endotérmica (absorción de calor, positivas al flujo), y son representados en un termograma como deformaciones leves o picos (Figura 2).

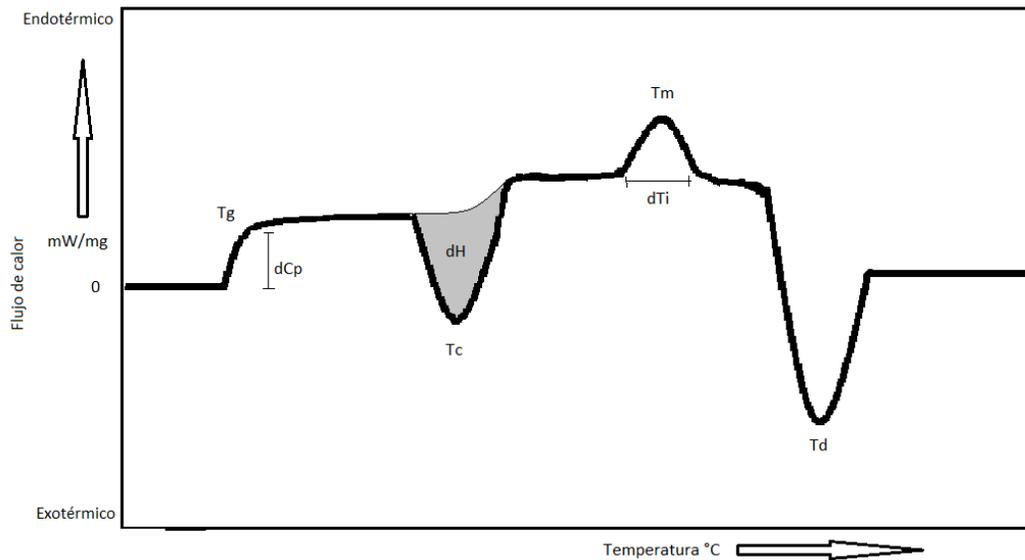


Figura 2 Esquematzación de un termograma por DSC clásico. Modificado de Höhne *et al.*, 2003 y Leyva-Porras C. *et al.*, 2019

Los procesos pueden ser clasificados como de primer orden cuando se tratan de transiciones de fase (cristalización, T_c ; fusión, T_m ; condensación y evaporación) o reacciones químicas (ej. la descomposición térmica, T_d), las cuales son fácilmente identificables como picos pues involucran la absorción o liberación de calor (Figura 2); por otra parte, los procesos de segundo orden no implican cambios en el calor latente de la muestra, pues solo existen variaciones de la capacidad calorífica (C_p), compresibilidad isotérmica (β), coeficiente de expansión térmica (α) y T_g (temperatura de transición vítrea), estas se identifican como ligeras variaciones en la curva de flujo de calor (Höhne *et al.*, 2003; Leyva-Porras C. *et al.*, 2019).

Una segunda técnica es el **análisis termogravimétrico (TGA)**, en la cual se monitorea la pérdida de masa de la muestra en función de la temperatura. Su principal utilidad es para la determinación de compuestos volátiles, la degradación de materiales orgánicos y en conjunto con DSC, sirve para distinguir con mayor precisión los cambios de fase T_m y T_d (Leyva-Porras C. *et al.*, 2019).

2.1.3 Sistema de liberación

Un DDS debe ser capaz de suministrar una dosis mayor a la concentración mínima funcional del fármaco en el sitio de acción donde se requiere sin sobrepasar la máxima concentración tolerable por el organismo. La concentración del fármaco en el sitio de acción estará mediada por la vía de administración empleada, la frecuencia de suministro y el ritmo de eliminación de la droga por acción misma del sujeto. Un hidrogel puede presentar dos tipos de liberación del soluto contenido, puede ser de forma sostenida o prolongada en hidrogeles físicos y de forma controlada en hidrogeles químicos. La **liberación prolongada** se caracteriza por una alta liberación inicial que va disminuyendo con el tiempo, mientras que en la **liberación controlada** la droga es liberada a un ritmo constante predeterminado (Matricardi *et al*, 2016; Hillery *et al.* 2017).

Los mecanismos por los cuales se puede dar la liberación de un fármaco son los siguientes:

- **Degradación:** En esta el fármaco se encuentra vinculado a un polímero de transporte, tal transportador deberá erosionarse lentamente para poder liberar la droga. El polímero podrá **erosionar capa por capa** desde el exterior al interior, logrando mantener una relación lineal de masa/volumen, o podrá **erosionar uniformemente** en la totalidad de su estructura, manteniendo su volumen y perdiendo masa (Matricardi *et al*, 2016).

- **Difusión:** En la cual el fármaco se encuentra dentro de un polímero, a través del cual deberá difundirse para ser liberado. El polímero podrá ser una **matriz** en la cual la permeación del agua controlará la liberación por la apertura de poros a causa del hinchamiento de la red o por mera osmosis, también podrá actuar como un **reservorio**, en la cual una membrana de polímero permeable contendrá una solución del fármaco, esta permitirá la entrada de agua y la salida de solutos (Hillery *et al.* 2017).

2.1.4 Modelo de difusión

El proceso de difusión es descrito por la **primera ley de Fick**:

$$J = -D \left(\frac{dC}{dx} \right)$$

donde J es el flujo, D es el coeficiente de difusión, C la concentración del fármaco y x el área de cobertura. Mientras el polímero contenedor no se disuelva, se puede asumir que mantiene sus dimensiones constantes durante el proceso de liberación y entre más tiempo se mantenga constante el gradiente de concentración del soluto, se podrá considerar una liberación constante, tales suposiciones corresponden a un proceso de liberación de **orden cero**:

$$M = kt$$

donde M es la cantidad de fármaco liberada, t es el tiempo y k la constante de liberación. A partir de esta última ecuación se originan diversos modelos de difusión aplicables a situaciones específicas, la **ecuación de Higuchi** describe la liberación de fármaco por matrices homogéneas o porosas:

$$Q = \frac{M}{A} = \sqrt{D 2 C_0 C_s t}$$

$$Q = \frac{M}{A} = \sqrt{D \frac{\varepsilon}{\tau} (2C_0 - \varepsilon C_s) C_s t}$$

donde $Q=M/A$ es la cantidad de fármaco liberada por unidad de área, D es el coeficiente de difusión del fármaco, C_0 y C_s son la concentración inicial y de solubilidad del fármaco en la matriz, ε corresponde a la porosidad, τ el factor de capilaridad

tortuosa y t es el tiempo. Este modelo no es de orden cero y puede ser expresado como:

$$M = kt^{\frac{1}{2}}$$

El modelo de Higuchi puede ser aplicado solo a sistemas que no se disuelvan y donde el coeficiente de difusión permanezca constante, por lo anterior, la **ecuación de Korsmeyer-Peppas** resolvería la limitante con lo siguiente:

$$Q = \frac{M_i}{M_\infty} = kt^n$$

donde Q es la cantidad fármaco liberado, M_∞ es la cantidad de fármaco en el estado de equilibrio (muy cercano al total cargado en la matriz inicialmente), M_i es la cantidad liberada en el tiempo t , k es la **constante de velocidad de liberación** (relacionada con las modificaciones estructurales y características geométricas de la matriz) y n es el **exponente de liberación** (relativo al mecanismo de liberación). A esta ecuación se le conoce como **Ley de Potencia**, y puede expresarse logarítmicamente como:

$$\log \frac{M_i}{M_\infty} = \log k + n \log t$$

Es posible clasificar los procesos de difusión acorde al valor de n obtenido (Hillery *et al.* 2017; Luciano, 2015):

- **Caso I** (Fickeano): Con $n \leq 0.5$, liberación predominantemente por difusión, se alcanza rápidamente el equilibrio de adsorción en la superficie expuesta del polímero, por lo que solo se dependerá del tiempo de exposición.
- **Caso II** (no Fickeano): Con $n=1$, liberación predominantemente por relajación de la matriz o hinchamiento, el proceso es de orden cero.

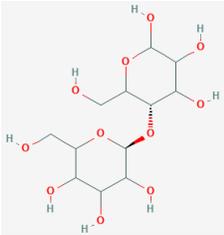
- **Transporte anómalo** (no Fickeano): Valores de $0.5 < n < 1$, la liberación del fármaco se da por difusión e hinchamiento por igual.

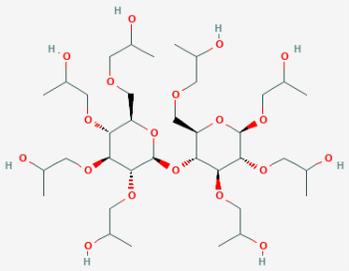
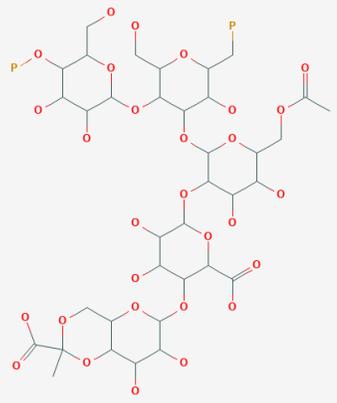
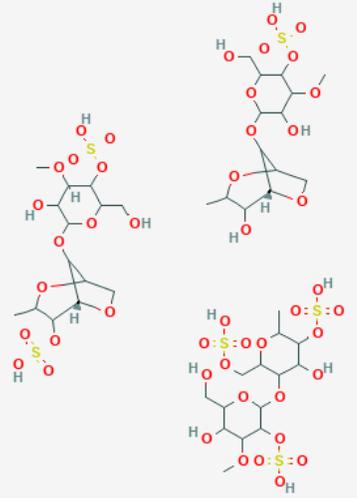
- **Super caso II** (no Fickeano): Valores de $n > 1$, la matriz es fragmentada por el solvente debido a un incremento de la tensión ejercida al núcleo de la matriz.

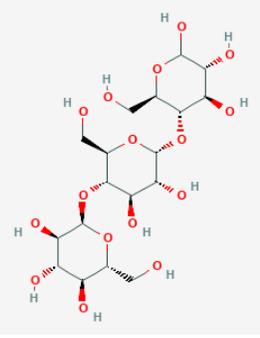
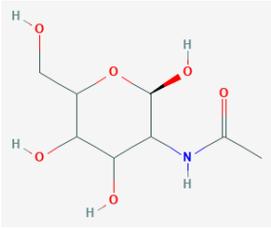
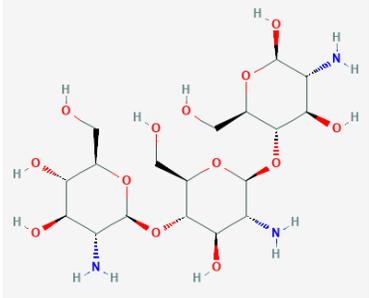
2.2 Biopolímeros: polisacáridos naturales para la síntesis de hidrogel

Un polímero es una macromolécula estructuralmente formada por repeticiones de monómeros unidos entre si covalentemente, estos pueden ser de origen sintético o natural (Ololade, 2016; Harsha *et al.*, 2017). Entre los polímeros sintéticos se encuentran los termoplásticos (polietileno, policloruro de vinilo, politereftalato de etileno) y elastómeros (cauchos). Dentro los polímeros naturales se hayen los polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos encontrados en todos los seres vivos, siendo los polisacáridos los de mayor abundancia. Un polisacárido está formado por más de veinte unidades de carbohidratos, ya sean aldosas (glucosa, galactosa) o cetosas (fructosa). Si están compuestos por repeticiones de un solo carbohidrato serán **homopolisacáridos** (celulosa, quitina, glucógeno y almidón), de lo contrario serán **heteropolisacáridos** (como los peptidoglicanos y glucosaminoglicanos); estos generalmente cumplen funciones de almacenamiento y soporte en los organismos en los que se encuentran (Ololade, 2016; Harsha *et al.*, 2017). En la Tabla 1 se ejemplifican algunos polisacáridos de mayor relevancia en organismos vivos.

Tabla 1. Principales polisacáridos de origen natural.

Compuesto	Origen	Estructura
Celulosa	Vegetal	

<p>Pectina</p>	<p>Vegetal</p>	
<p>Hipromelosa (HPMC)</p>	<p>Modificado de celulosa</p>	
<p>Xantano</p>	<p>Bacteriano</p>	
<p>Carragenina</p>	<p>Alga</p>	

Pululano	Fúngico	
Quitina	Animal (artrópodos)	
Quitosano	Modificado de quitina	

Las imágenes mostradas fueron tomadas de PubChem (nih.gov)

Los polímeros de origen natural poseen ciertas ventajas que los hacen de elección predilecta para la síntesis de biomateriales, tales como: no son tóxicos, tienen amplia aceptación del público por su origen, son altamente biodegradables, no causan efectos adversos al medio ambiente, se tienen en muy alta disponibilidad a nivel mundial y los costos de su extracción son relativamente muy bajos (Harsha *et al.*, 2017).

Existen investigaciones sobre las propiedades y capacidades como DDS de diferentes hidrogeles a base de quitosano, quitina, ácido hialurónico, alginato, agarosa, hidroximetil celulosa, pectina, polimetacrilatos y polivinil-pirrolidina (Boateng *et al.*, 2007; Garazi *et al.*, 2015; Medina-Torres *et al.*, 2003). Estudios sobre la liberación de fármacos antiinflamatorios en tabletas con HPMC demostraron una mayor retención

del fármaco a mayor viscosidad y a mayor área de superficie de contacto en la tableta con el medio ya que el mecanismo de liberación se da por erosión de la matriz, lo anterior es análogo a estudios de películas de hidrogel que contienen HPMC mostrando una excelente permeabilidad en películas de 40 μm a 120 μm , un grado de hinchamiento de 4 a 50 veces su peso seco y degradación en agua desde una hora hasta un mes (Kamel *et al.*, 2008; Guohou *et al.*, 2018). En cuanto a quitosano, existe una inmensidad de estudios sobre encapsulación de compuestos, parches para tratamiento de heridas y DDS; es posiblemente el compuesto más estudiado en las últimas dos décadas (Liu *et al.*, 2018). Recientemente Neufeld en 2018 logró exitosamente la caracterización de un hidrogel de quitosano-pectina para la liberación de progesterona, logrando liberación de 80-100% del fármaco en 24 h dependiendo de la proporción de los monómeros; Mukherjee igualmente en 2018, evaluó el efecto en la cicatrización epidérmica en modelos murinos con hidrogel de quitosano-PVA-alginato logrando una mejoría de hasta un 20% frente al control.

2.3 Fitoquímica: las plantas como fuente de compuestos bioactivos

El reino Plantae o vegetal cuenta actualmente con más de 370,000 especies descritas; a lo largo del desarrollo de la humanidad las plantas jugaron el rol más importante, pues fue gracias a ellas que el hombre pudo proveerse alimento sin necesidad de salir a buscarlo a grandes distancias a través de la caza de animales, pues adoptaron la agricultura como sistema para proveerse alimento y así fue que el hombre paso a ser sedentario, lo que llevó a establecer las grandes urbes donde se forjaron avances tecnológicos y humanísticos que nos llevaron a la época actual. Aunque el principal atractivo de las especies vegetales es el de servir como alimento, estas también son fuente de materiales para la fabricación de herramientas, edificaciones y vestimenta, pues se aprovechan sus características físicas para tales fines, pero hay una aplicación casi tan importante como servir de alimento, su utilidad terapéutica. La utilización de plantas o partes de ellas con fines terapéuticos inició de forma rústica al solo atribuírseles efectos benéficos para dolencias específicas o incluso efectos nocivos, fue hasta el desarrollo y avance de la química como ciencia

formal, que se logró identificar y aislar las sustancias responsables de tales efectos de importancia biológica, justo por esto se inició la investigación fitoquímica y el desarrollo de fármacos con las sustancias extraídas de fuentes vegetales.

La fitoquímica es la ciencia encargada del estudio de los compuestos químicos que se encuentran en las especies vegetales. Esta abarca el aislamiento, caracterización y rastreo del origen metabólico de dichos compuestos fitoquímicos (Crozier *et al.*, 2006; Cseke *et al.*, 2006; Harbone, 1973). Por mucho tiempo estos fitoquímicos fueron la principal fuente para la síntesis de fármacos, se cree que al menos 500 fármacos provienen en cierto modo de fuentes vegetales. Académicamente, a la gran mayoría de estos compuestos con actividad farmacológica se les ubica y clasifica dentro de un grupo denominado como **metabolitos secundarios**, pues son producto del metabolismo secundario de los vegetales. Un metabolito es una sustancia con actividad biológica dentro del organismo, pueden ser primarios cuando están implicados directamente en los procesos de crecimiento, desarrollo y reproducción (proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos y lípidos) o secundarios si no están implicados directamente en el soporte de la vida, sin embargo, se involucran en funciones complementarias como lo es la defensa ante depredadores, la atracción de polinizadores y la resistencia a ambientes adversos (Crozier *et al.*, 2006; Cseke *et al.*, 2006; Harbone, 1973).

2.3.1 Clasificación de metabolitos vegetales

Se pueden clasificar en grandes grupos acorde a su estructura química u origen metabólico, estos son: ácidos grasos y derivados, aromáticos, carbohidratos, aminas y alcaloides, aminoácidos y proteínas, nucleótidos y ácidos nucleicos (Crozier *et al.*, 2006; Cseke *et al.*, 2006; Harbone, 1973), en seguida se describe a grandes rasgos las características distintivas de dichos grupos:

❖ **Ácidos grasos y derivados:** Son ácidos carboxílicos (-COOH) con largas cadenas de hidrocarburos (ej. ácido palmítico, ácido araquidónico, ácido linoleico) que generalmente cumplen funciones de almacén de energía y formación

de membranas (Figura 3), en este se encuentran los hidrocarburos simples, funcionalizados y terpenos, los cuales se describen a continuación:

➤ **Hidrocarburos:** Son cadenas simples de átomos de carbono e hidrógeno, estos pueden ser **saturados** si poseen enlaces simples (C_nH_{2n+2}) o **insaturados** cuando presentan enlaces dobles (C_nH_{2n}) o triples (C_nH_{2n-2}), son altamente insolubles en agua, los hidrocarburos saturados se encuentran comúnmente en forma de ceras recubriendo hojas y frutos (ej. n-nonacosano), por su parte el etileno es el hidrocarburo saturado de mayor abundancia e importancia pues interviene en escisión de hojas y maduración de frutos.

➤ **Hidrocarburos funcionalizados:** Estos contienen en su cadena elementos halógenos (F, Cl, Br, I; ej. laurencina), grupos hidroxilo (-OH; ej. *cis*-3-hexen-1-ol), sulfuro (S^{2-} ; ej. glucosinolatos), grupos carbonilos (R-C=O; ej. citral), grupos cetona (R₂-C=O), grupo éster (R'-COO-R; ej. butirato de etilo).

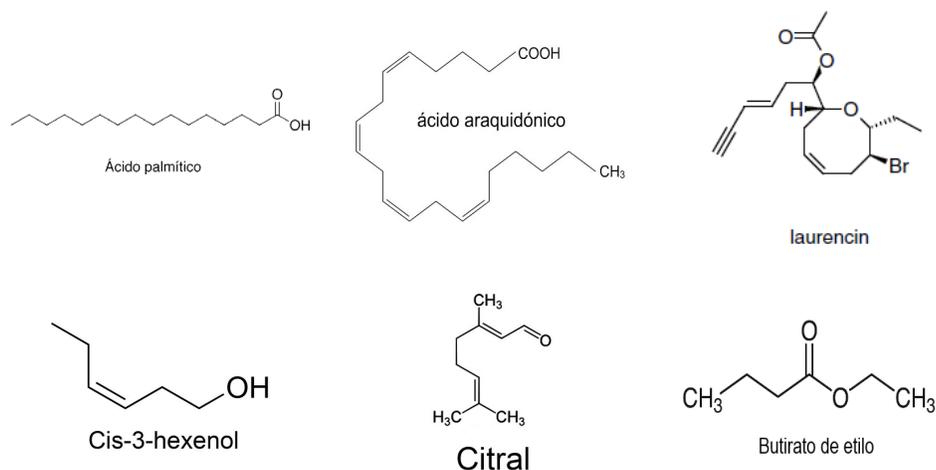


Figura 3 Ácidos grasos y derivados. Las imágenes mostradas fueron tomadas de Cseke *et al.*, 2006.

➤ **Terpenos:** Son un grupo conformado por compuestos cuya estructura está basada en unidades de 2-metilbutano (Figura 4), provienen del isopentil-difosfato obtenido a través de la ruta del ácido mevalónico (MVA) o desoxi-D-xilulosa (DOX). Estos pueden actuar como hormonas (giberelinas), insecticidas, herbicidas y atrayentes de polinizadores. Se subclasifican en

hemiterpenos (C₅), monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅), diterpenos (C₂₀), sesquiterpenos (C₂₅), triterpenos (C₃₀) y carotenoides (C₄₀).

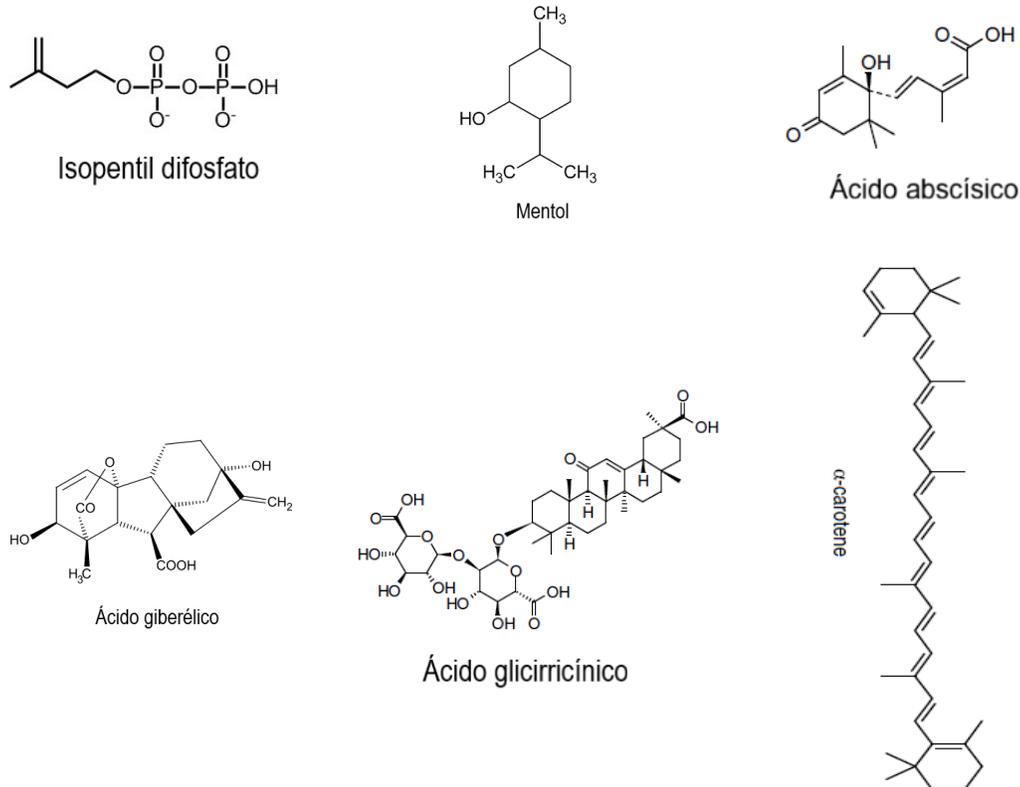


Figura 4 Terpenos de importancia. Las imágenes mostradas fueron tomadas de Cseke *et al.*, 2006.

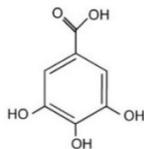
❖ **Aromáticos:** Son un extenso grupo de compuestos conformados por un anillo aromático ligado un hidroxilo (-OH). Tienden a ser solubles en agua pues se encuentran frecuentemente conjugados con azúcares y son en parte responsables de la coloración, aroma y sabor de las plantas (Figura 5), en estos se encuentran los fenoles simples, fenilpropanoides, flavonoides y taninos.

➤ **Fenoles simples:** Son monómeros de polifenoles (ej. ácido gálico, ácido salicílico, ácido vanílico y catecol); se encuentran comúnmente ligados a la lignina y se liberan por hidrólisis ácida de los tejidos vegetales.

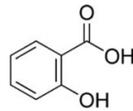
➤ **Fenilpropanoides:** Formados por una cadena de tres carbonos unidos al fenol (ej. ácido cafeico, eugenol). Se derivan de la fenilalanina, los más importantes son los ácidos hidroxicinámicos, pues intervienen en la resistencia a enfermedades, confieren gran parte del aroma de las plantas.

➤ **Flavonoides:** Formados por dos anillos de benceno unidos por una unidad de propano, estos se originan a partir de la flavona. Se subdividen en flavonas, flavononas, isoflavonas, flavonoles, calconas y antocianinas (ej. quercetina, rotenona). Las antocianinas son el grupo principal que da las tonalidades rojas.

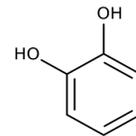
➤ **Taninos:** Son oligómeros formados por múltiples grupos fenólicos, les dan sabor amargo a los tejidos vegetales. Se subdividen en condensados de flavonoles o hidrolizados (azúcar con ácido gálico).



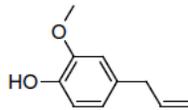
ácido gálico



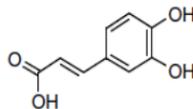
Ácido salicílico



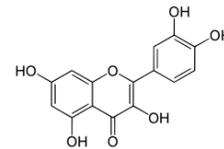
Catecol



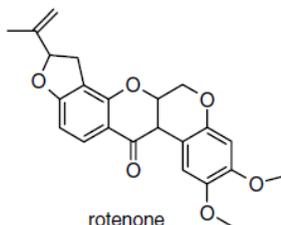
eugenol



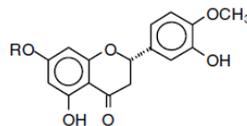
Ácido cafeico



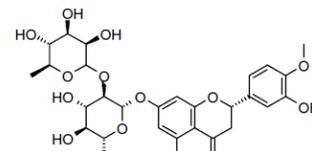
Quercetina



rotenone



hesperidin



neohesperidin

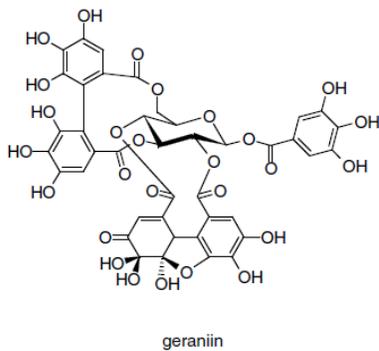
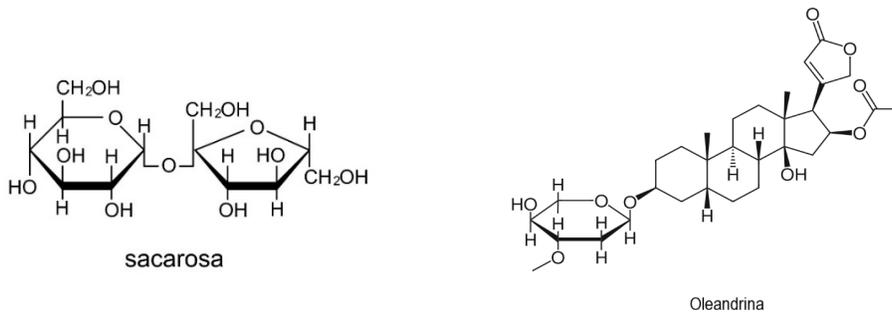
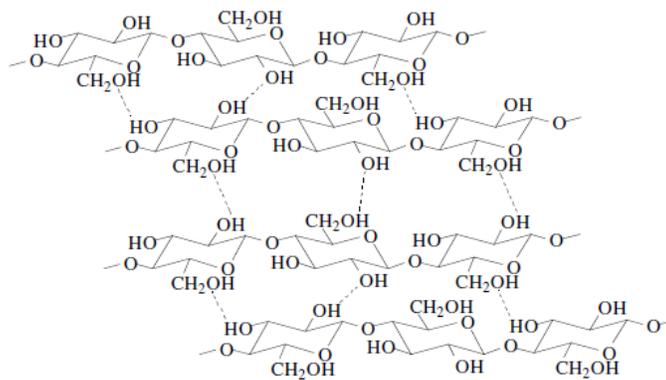


Figura 5 Compuestos aromáticos de importancia. Las imágenes mostradas fueron tomadas de Cseke *et al.*, 2006.

❖ **Carbohidratos:** Son producto primario de la fotosíntesis y la principal fuente de energía en plantas. Son compuestos poli-hidroxilados altamente solubles en agua, presentan la composición general $C_nH_{2n}O_n$, comúnmente se almacenan en forma de celulosa y almidón a base de monómeros de sacarosa, su segunda función de importancia es el hacer más hidrosolubles el resto de metabolitos mediante la formación de glucósidos de terpenos, fenoles y alcaloides (Figura 6). Se subdividen en monosacáridos y polisacáridos.

- **Monosacáridos:** Presentan un único grupo aldehído (**aldosas**, ej. glucosa, xilosa) o cetona (**cetosas**, ej. ribulosa, fructosa).
- **Polisacáridos:** Son carbohidratos de alto peso molecular, provenientes de la unión de largas cadenas de monosacáridos (ej. celulosa, colágeno).





Celulosa

Figura 6 Carbohidratos. Las imágenes mostradas fueron tomadas de Cseke *et al.*, 2006.

❖ **Aminas y alcaloides:** Son compuestos en los que está presente el nitrógeno, son altamente volátiles (Figura 7) y se subdividen en alifáticas, aromáticas y alcaloides.

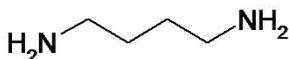
➤ **Aminas alifáticas:** Comprenden aminas primarias (monoaminas) desde la metilamina hasta la hexilamina, se incluyen poliaminas como putrescina y espermina, son generalmente responsables del aroma a putrefacción de algunas plantas pues es utilizado para atraer algunos insectos.

➤ **Aminas aromáticas:** Son compuestos con nitrógeno dentro un anillo de benceno, son conocidas por sus efectos psicoactivos en animales (ej. mescalina, serotonina).

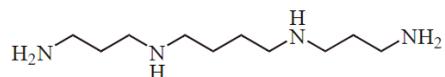
➤ **Alcaloides:** Son compuestos derivados de aminoácidos (principalmente fenilalanina, tirosina y triptófano) que contienen uno o más átomos de nitrógeno en forma heterocíclica, son el grupo con mayor actividad farmacológica. Con efectos psicoactivos se encuentra la morfina, cocaína y atropina, con efectos más moderados la cafeína y nicotina.



Metilamina



Putrescina



Espermina

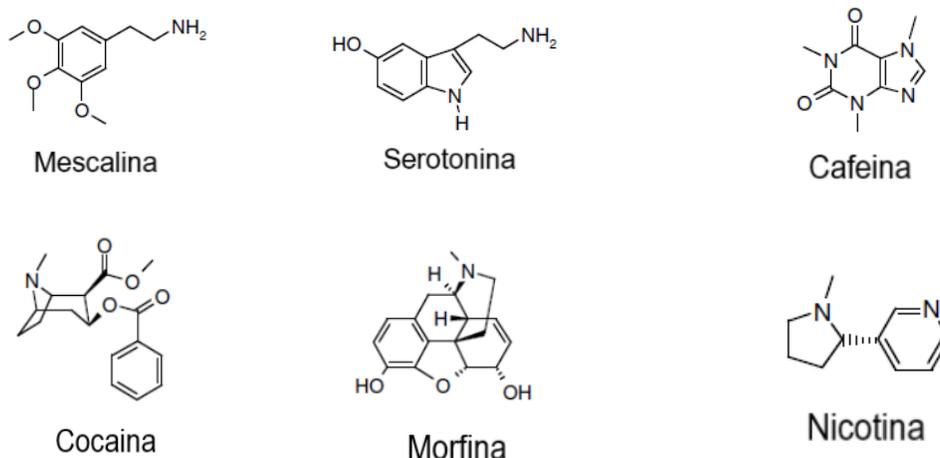


Figura 7 Aminas y alcaloides de importancia. Las imágenes mostradas fueron tomadas de Cseke *et al.*, 2006.

2.3.2 Técnicas de identificación: screening fitoquímico y espectroscopías

El proceso de análisis fitoquímico dependerá de la naturaleza de la muestra a analizar, primeramente, se debe determinar la solubilidad en solventes polares (sustancias generalmente ricas en grupos -OH) o apolares; para los fines del presente trabajo se hablará de técnicas aplicables a sustancias solubles en agua (solvente polar). Las pruebas de análisis básicas se llevan a cabo mediante reacciones químicas colorimétricas y análisis espectroscópicos, concretamente la absorción o transmisión de energía a determinadas longitudes de onda del espectro electromagnético.

Las pruebas colorimétricas básicas se basan en las características químicas de cada grupo de compuestos fitoquímicos y su capacidad para reaccionar con agentes reductores u oxidantes en medio líquido, dando como resultado cambios de color en la solución, formación de precipitados, emisión de gases, algunos de los cuales pueden ser cuantificados por medio de equipos espectrofotométricos en longitudes de onda pertenecientes a la radiación ultra violeta (UV) y luz visible (Harbone, 1973).

La espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-vis), aprovecha la capacidad de las sustancias de absorber energía a determinada longitud de onda, la región del espectro que abarca dicha técnica corresponde desde los 190 nm hasta los 800 nm.

Esta técnica se considera cuantitativa pues es posible relacionar el valor de la absorbancia (A) con el de la concentración (c) de la sustancia, para tal fin se aplica la **ley de Beer-Lambert**:

$$A = \epsilon bc$$

donde ϵ es el coeficiente de absorción y b la longitud recorrida por el haz de luz. Dado a que la medida de la celda cuadrada de cuarzo esta estandarizada a 1 cm y a la similitud con la ecuación ordinaria de la recta, puede expresarse como:

$$y = mx + b$$

Al graficar la absorbancia obtenida de un gradiente de concentración de la sustancia a analizar o un patrón equivalente (Figura 8), podemos obtener el coeficiente de absorción de la muestra (m) a una longitud dada y la concentración (x) correspondiente a cada valor de absorbancia (y), siendo b una constante de ajuste.

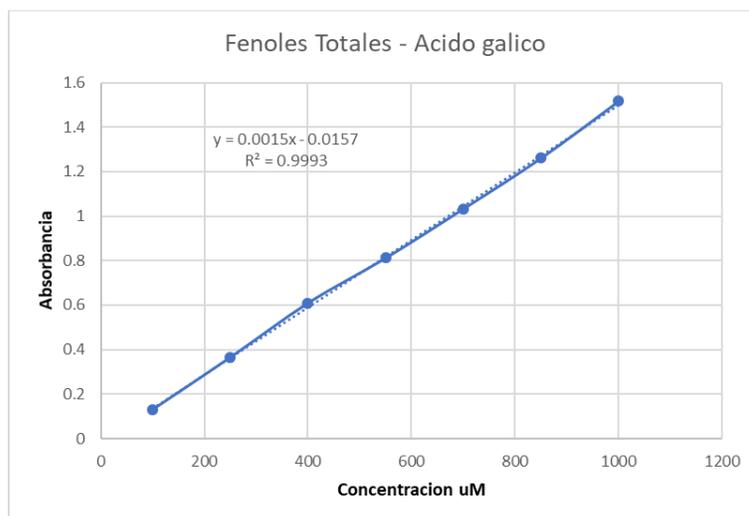


Figura 8 Curva patrón de absorbancia vs concentración.

Es posible identificar el grupo químico al que puede pertenecer una muestra, principalmente sustancias puras pueden presentar múltiples bandas de absorción en el espectro UV-vis, acorde a la estructura química de la muestra.

2.4 Botánica y fitoquímica de *Opuntia ficus-indica*

El género *Opuntia* está ampliamente distribuido en México, siendo nuestro país el de mayor riqueza biológica de tal género. Desde tiempos prehispánicos se cultivan principalmente las especies *O. ficus-indica*, *O. xocoxtle*, *O. megacantha* y *O. streptacantha*, siendo la primera la cactácea más importante en México y el mundo, debido a su uso como alimento humano y forraje. *O. ficus-indica* es una planta arbustiva, presenta cladodios verdes semi-ovalados y alargados de hasta 50 cm de longitud, tiene areolas separadas con un par de espinas curvadas, siendo más gruesos en la base y más delgados en la corona; sus frutos poseen pulpa rica en azúcares y abundante agua, crecen directamente del pericarpelo de floración, sus tépalos pueden ser amarillos o anaranjados (Figura 9). Es el resultado de la selección humana iniciada hace aproximadamente 8000 años, su nombre común, nopal, proviene del náhuatl “Nopalli”.



Figura 9 *Opuntia ficus-indica*. La imagen mostrada fue tomada de Naturalista.mx

Los cladodios del nopal son ricos en un polisacárido a base de ramosa, arabinosa, galactosa, xilosa y ácido galacturónico (Sepulveda *et al.*, 2007), se le conoce como mucílago, se almacena en células mucilaginosas del parénquima,

presentándose a mayores concentraciones en cladodios de mediana edad (2 años). Tiene la principal función de retener agua, por ello es de importancia en la industria alimenticia y recientemente se inicia la investigación para su uso en formulaciones farmacéuticas gracias a sus propiedades viscosas.

Aún no está ampliamente estudiada la efectividad del uso de mucílago como componente en la síntesis de hidrogel (Saenz *et al.*, 2004). Se reportó la microencapsulación de ácido gálico, un compuesto de tipo fenólico de origen natural, en micro esferas de mucílago de nopal (en forma de polvo) como una alternativa de uso para aditivos en alimentos funcionalizados (Medina-Torres *et al.*, 2013). Existe el estudio sobre la síntesis de películas de mucílago plastificadas con glicerina, sorbitol y PEG 200/400 con la finalidad de ser comestibles, reportándose un 35-58% de solubilidad, siendo aquellas que contienen glicerina las más aptas para consumo (Rim *et al.*, 2018).

2.5 Botánica y fitoquímica de *Buddleja cordata*

Las especies del género *Buddleja* comprenden alrededor de 100 especies arbóreas y arbustivas, el 50% crece en el continente americano y en México existen aproximadamente 15 especies (Romero *et al.*, 2003). Son promisorias para su uso en sistemas silvopastoriles, se utilizan como forrajeras y además tienen diversos usos medicinales; en particular, *B. cordata*, *B. nitida* y *B. skutckii* se emplean en las construcciones rurales, como combustible y para fabricar herramientas. Las especies de *Buddleja* como forrajeras tienen la ventaja de ser perennifolias (Deneb *et al.*, 2009).

Buddleja cordata es un árbol de 1 a 20 m de altura con tronco de 10 a 45 cm de diámetro en la base, corteza rugosa de color café a negruzca con ramas jóvenes cuadrangulares (Figura 10). Se encuentra ampliamente distribuido en México, principalmente en el altiplano, extendiéndose hasta Guatemala. Se desarrolla en una gran variedad de hábitats, sobre todo en lugares con vegetación secundaria, parcelas de cultivo y ambientes urbanos, tanto en Guanajuato, como en Querétaro y en el norte de Michoacán (Deneb *et al.*, 2009). Tolerancia condiciones de sequía, por lo que puede desarrollarse en suelos erosionados y a altitudes de 1500 a 3200 m (Romero *et al.*,

2003). Se reconocen tres subespecies, las cuales se diferencian por el tipo de pubescencia en el envés de sus hojas, por el color de sus flores y el tamaño de sus inflorescencias.



Figura 10 *Buddleja cordata*. La imagen mostrada fue tomada de Naturalista.mx

Esta especie se conoce popularmente como tepozán, y se le atribuyen propiedades analgésicas, eupépticas, diuréticas y antisépticas, de los cuales estudios fisicoquímicos de semillas, hojas, corteza y raíz han demostrado sus propiedades bactericidas y amebicidas (Romero *et al.*, 2003). Algunas comunidades indígenas han utilizado tópicamente macerados de las hojas de esta planta para tratar tumores, abscesos, llagas y quemaduras. Estudios químicos sobre esta planta identificaron flavonoides bioactivos, sesquiterpenoides antifúngicos, feniletanoides antimicrobacteriano y fenilpropanoides antibacteriales. El género *Buddleja* sintetiza particularmente linarina y verbascósido, los cuales reportan una absorción máxima a de 291nm y 334nm en longitud de onda respectivamente, y del cual se ha reportado propiedad antioxidante y fotoprotectora para el verbascósido y antiinflamatoria para linarina (Ávila *et al.* 2014).

2.5.1 Verbascósido

También se le conoce como kusaginín y acteósido (Figura 11); se encuentra entre los más abundantes de los ésteres disacáridos de cafeoilo. El verbascósido se ha detectado principalmente en las especies *Verbascum*, pero también se ha encontrado en más de 200 especies de plantas, dentro de todos los órganos de estas plantas y también se ha reportado su presencia en desechos de la producción de aceites comestibles de olivo. Posee capacidad antiinflamatoria por la inhibición de histamina y ácido araquidónico liberados por las células bajo estrés inflamatorio, dicha actividad depende de la presencia de Ca^{2+} y la correlación de la inhibición de la fosfolipasa A_2 en alergias de tipo I y de la el óxido nítrico sintasa (Kalina *et al.*, 2014).

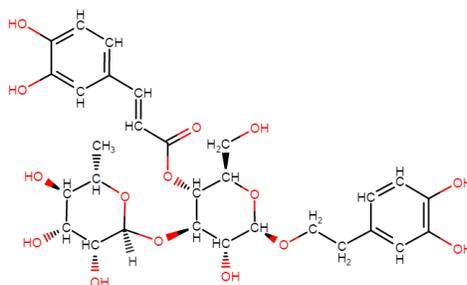


Figura 11 Estructura molecular del verbascósido. ($\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{O}_{15}$) $\text{PM}=624.588$ g/mol. La imagen mostrada fue tomada de PubChem (nih.gov)

2.5.2 Biodisponibilidad y absorción del verbascósido.

El efecto sistemático de los polifenoles en plantas depende de la biodisponibilidad de estos a través de las paredes gastrointestinales. Numerosos estudios han resultado en un rango de concentraciones μM a mM en plantas y al ser ingeridos no excederían el orden nM en el plasma sanguíneo. Estos polifenoles son digeridos por la microbiota local del colon y son fácilmente absorbidos por el sistema circulatorio (con un máximo de concentración del verbascósido en el plasma a los 15 minutos de la ingesta en ratas), donde llegan subsecuentemente a los tejidos blanco donde ejercerán sus efectos terapéuticos (Kalina *et al.*, 2014).

Estudios realizados por Ávila Acevedo sobre el efecto de extractos de *B. cordata* contra daños la piel por UV, mediante técnica de extracción de piel con cinta para

ratones, reportó una absorción cutánea de 33.4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de un extracto con verbascósido y linarina. En puercos también se ha reportado una absorción por la piel de 0.27 nmol/cm^2 (Ávila *et al.* 2014).

La biodisponibilidad de los polifenoles en el tracto digestivo depende de su tamaño molecular, su grado de polimerización y su nivel de solubilidad. Se presume que la facilidad de absorción del verbascósido es similar al de la catequina y diversos flavonoides, mientras que es de mayor dificultad su absorción por vía cutánea, para lo cual se sugiere el uso de liposomas o lipogeles (Kalina *et al.*, 2014).

En estudios adicionales para extractos de cultivos celulares de *B. cordata*, se demostró: actividad antiinflamatoria *in vivo* a una dosis de 250 mg/kg en un modelo murino para la inflamación aguda y crónica, sin generar toxicidad a una dosis de 2 g/kg (Gutiérrez-Rebolledo *et al.*, 2018, 2019); actividad fotoprotectora contra radiación UV-B en cultivos celulares de fibroblastos 3T3 swiss, obteniendo una viabilidad celular del 73% con una concentración de extracto crudo de 2.5 g/L (Gómez, 2018); efecto nefroprotector en células pancreáticas de ratones diabéticos con dosis diarias de 300mg/Kg por 30 días sin mostrar un efecto hipoglucemiante (Pichardo, 2018); efecto antibacteriano contra *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) con una inhibición celular de 23.3 % a una concentración de extracto crudo de 64 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Cejudo, 2019).

3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente existe una infinidad de fármacos, sin embargo, muchos de ellos pueden presentar biodisponibilidad ineficiente, una rápida absorción, efectos secundarios adversos que pueden incluir hepatotoxicidad o ser ineficaces como antibióticos por la resistencia generada en microorganismos. Ante ello, la industria farmacéutica tiene el reto de producir nuevas formulaciones que sean efectivas y con el menor efecto adverso, por lo que se está poniendo un gran interés a la liberación controlada de principios activos basándose en moléculas derivadas de plantas (Wang *et al.*, 2016; Sougata *et al.*, 2017). Como un derivado vegetal, emplear al mucílago de nopal como excipiente en la liberación controlada de principios activos para el tratamiento de enfermedades o heridas, esta principalmente asociado a sus propiedades químicas, su bajo costo de obtención, además, es un polímero no tóxico y posee una buena capacidad de retención de agua (Prajapati *et al.*, 2013; Immene *et al.*, 2015). El mucílago actualmente se utiliza como aditivo en alimentos y en la síntesis de artículos desechables biodegradables. En el presente trabajo se propone el uso de mucílago, quitosano e hipromelosa para sintetizar hidrogel, con lo que se espera obtener un DDS de fácil fabricación, de origen natural y libre de sustancias tóxicas que lo diferenciaran positivamente de DDS existentes cuyos procesos de fabricación llegan a ser costosos, y elaborados con materiales sintéticos y tóxicos. Para probar el desempeño del hidrogel propuesto, se evaluará su capacidad para liberar al extracto del cultivo celular de *B. cordata*, el cual representa una fuente de compuestos bioactivos, tal como el verbascósido, que podría representar una alternativa para la problemática farmacológica planteada inicialmente (Espinoza-González *et al.*, 2016; Ávila Acevedo *et al.*, 2014, 1999). La implementación de un DDS para administrar un extracto del cultivo celular de *B. cordata*, el cual contiene en alta concentración verbascósido, podría representar una alternativa para administrarse prolongadamente.

4. HIPÓTESIS

Diferentes combinaciones de quitosano, hipromelosa y mucílago de *O. ficus-indica* permitirán la síntesis de hidrogel con propiedades en su matriz que los hará capaces de actuar como un sistema de liberación prolongada del extracto de un cultivo celular de *B. cordata*.

5. OBJETIVOS

5.1 General

- Evaluar la liberación prolongada de un extracto de un cultivo celular de *B. cordata* con diferentes hidrogeles sintetizados a partir de combinaciones de quitosano, hipromelosa y mucílago de *O. ficus indica*.

5.2 Particulares

- Establecer un método para la obtención del mucílago de *O. ficus-indica* y del extracto crudo del cultivo celular de *B. cordata*, y un método para la síntesis de hidrogel.
- Caracterizar fitoquímicamente el extracto a fin de corroborar la presencia de compuestos de tipo fenólico, grupo al que pertenece el verbascósido.
- Caracterizar fisicoquímicamente cada hidrogel sintetizado mediante técnicas termogravimétricas y espectroscópicas.
- A partir de la liberación del extracto del cultivo celular de *B. cordata*, determinar el modelo de difusión de cada hidrogel sintetizado, así como comparar estadísticamente la eficiencia de liberación.

6. METODOLOGÍA

6.1 Obtención del material vegetal

Se adquirieron cladodios comestibles de *O. ficus-indica* en el mercado Juárez de la ciudad de Toluca en el mes de abril de 2019, con medidas aproximadas de 20 cm de longitud y 1 cm de grosor. Las espinas fueron removidas previamente al proceso de obtención de mucílago. Los cultivos celulares de *B. cordata* fueron donados como biomasa seca por el Centro de Investigación de Recursos Bióticos (CIRB) de la facultad de ciencias, UAEMex.

6.1.1 Obtención del extracto de *B. cordata*

Se utilizó biomasa seca de cultivo celular para su extracción con metanol. A 500 mL de metanol grado HPLC se añadió 1 g de biomasa, la preparación fue agitada por 20 minutos con un ultrasonificador (SJIA-950W) a una temperatura de 60 °C. El solvente de la preparación fue filtrado con una membrana de tamaño de poro de 0.22 µm, después se procedió con centrifugado a 2600 RCF (fuerza centrífuga relativa) por 10 minutos, seguidamente se decantó el solvente. El extracto fue concentrado por evaporación con ayuda de un rotavapor (BUCHI R-3), a un volumen final de 25 mL, posteriormente fue nuevamente centrifugado para eliminar el resto de sólidos suspendidos. El extracto líquido fue repartido en tubos Eppendorf de 1.5 mL para eliminar el solvente en una mufla a 60 °C por 24 h, el extracto crudo obtenido se almacenó en oscuridad a temperatura ambiente.

6.1.2 Extracción de mucílago

Los cladodios fueron licuados, se agregó agua destilada a la masa resultante (proporción 1:6 v/v). Después de ser homogenizada, la mezcla se dejó reposar 24 h a una temperatura de 6 °C para lograr precipitar los residuos vegetales de mayor tamaño, se decantó el líquido cristalino para centrifugarse a 2000 RCF por un periodo de 5 minutos. Posteriormente, se añadió etanol (al 96 % de pureza) al líquido filtrado bajo la proporción 1:2.5 v/v para obtener una solución de nopal:etanol respectivamente

(ambas partes a 4 °C). Se continuo con agitación manual para insolubilizar el mucílago. Se procedió a realizar la decantación del medio acuoso para recuperar los precipitados de mucílago, los cuales se deshidrataron en mufla a 50 °C por 24 h. Una vez seco, se pulverizó y almacenó a temperatura ambiente. Se evaluó el rendimiento de la extracción de mucílago de cladodios de nopal comestibles de 2-4 meses de desarrollo, acorde al porcentaje en masa de mucílago correspondiente a la biomasa total procesada de nopales.

6.2 Caracterización fitoquímica cualitativa del extracto de *B. cordata*

6.2.1 Prueba de fenoles

A 500 µL de extracto resuspendido en agua destilada se adicionó 1-3 gotas de solución de cloruro férrico al 1 %. Una prueba positiva deberá dar una tonalidad oscura.

6.2.2 Prueba de diterpenos

A 500 µL de extracto resuspendido en agua destilada se adicionó 2-4 gotas de solución de acetato cúprico al 1%. Una prueba positiva deberá dar una coloración verde intensa.

6.2.3 Prueba de triterpenos-esteroles (prueba de Salkowski y Lieberman – Burchardt)

A 500 µL de extracto resuspendido en cloroformo se agregó 3-5 gotas de ácido sulfúrico concentrado y se agitó vigorosamente, una prueba positiva presenta una capa amarilla persistente. A 500 µL de extracto resuspendido en cloroformo se agregó 3-5 gotas de ácido acético y 250 µL de ácido sulfúrico concentrado, una prueba positiva presentará una capa roja en la interfase.

6.2.4 Prueba de saponinas (prueba de espuma)

Para esto 1 mL de extracto resuspendido en agua se agitó vigorosamente por 5 minutos, la formación de espuma persistente es indicativo de existencia de saponinas en la muestra.

6.2.6 Prueba de alcaloides (prueba de Dragendorff)

A 500 μ L de extracto resuspendido en agua destilada se adicionó 1-3 gotas de solución de Dragendorff. Una prueba positiva debe dar turbidez o precipitado marrón/rojizo.

*** Preparación solución stock Dragendorff: Solución con 1.7 g de oxinitrato de bismuto, 80 mL de agua destilada, 20 mL de ácido acético glacial; se agrega 100 mL de solución de yoduro de potasio 50 % p/v y se agita hasta homogenizar totalmente.

*** Preparación solución activa Dragendorff: 100 mL de solución stock se mezcló con 200 mL de ácido acético glacial y se aforó a un volumen de 1 L con agua destilada.

6.2.7 Prueba de péptidos (prueba de Biuret)

A 1 mL de extracto resuspendido en agua destilada se agregó 8 gotas de reactivo de Biuret. Una prueba positiva resulta en una coloración rosada.

*** Preparación de reactivo de Biuret: 1.5 g de sulfato cúprico pentahidratado, 6 g de tartrato de sodio-potasio tetrahidratado se diluyeron en 500 mL de agua destilada; se agregó 300 mL de solución de hidróxido de sodio al 10% y se aforó a 1 L.

6.2.8 Prueba de azúcares reductores (prueba de Fehling)

A 500 μ L de extracto resuspendido en agua destilada se adicionó 125 μ L de reactivo de Fehling A y 125 μ L de Fehling B, la mezcla fue homogenizada y llevada a baño maría por 5 minutos. Una prueba positiva presenta precipitado rojo.

*** Preparación Fehling A: Se diluyo 70 g de sulfato de cobre en 200 mL de agua destilada, se agregó 1 mL de ácido sulfúrico concentrado y se aforó a 1 L.

*** Preparación Fehling B: Se diluyo 352 g de tartrato de sodio-potasio y 154 g de hidróxido de sodio en 200 mL de agua destilada, se aforó a 1 L.

6.2.9 Espectrometría de absorción UV-Vis

Una muestra de extracto crudo seco fue resuspendida en agua para su análisis en espectrofotómetro (Shimadzu UV-2600) en el intervalo de longitud de onda de 200 nm a 600 nm. Se monitoreo la absorción del extracto a la longitud de onda comprendida entre los 260-340 nm, ya que se ha reportado que los compuestos de tipo fenólico, verbascósido y linarina, presentan máxima absorción a los 320 y 330 nm, esto como indicativo de la presencia probable de dichos compuestos.

6.3 Caracterización fitoquímica cuantitativa del extracto de *B. cordata*

6.3.1 Determinación del contenido de fenoles totales

Se empleo la técnica de Folin-Ciocalteu, para ello una muestra de extracto crudo seco de peso conocido fue diluida en 10 mL de agua destilada. A 500 μ L de la muestra diluida se agregaron a 3.75 mL de agua destilada y 250 μ L de reactivo Folin-Ciocalteu, posteriormente se agregó 500 μ L de solución de carbonato de sodio al 20% y se agitó vigorosamente. La mezcla fue mantenida a temperatura ambiente (18-22 °C) en oscuridad por 1 h, al finalizar, a la muestra se le midió la absorbancia en espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda de 725 nm. La solución blanco fue preparada de igual manera sustituyendo la muestra por agua destilada. Se creo una curva patrón de la prueba con ácido gálico a partir de diferentes concentraciones (100-1000 μ M), con la cual se obtuvo la ecuación ($y = 0.0015x - 0.0157$, $R^2=0.9993$) para expresar el contenido de fenoles totales en el extracto como mg equivalente de ácido gálico por gramo de extracto (mg GAE/g Ex).

6.3.2 Determinación del contenido de fenilpropanoides totales (orto-di y orto-tri fenoles)

El método utilizado fue el de Arnow para catecol; para ello una muestra de extracto crudo seco de peso conocido fue diluida en 2 mL de agua destilada. A 300 μ L de la dilución se adicionaron a 600 μ L de reactivo de Arnow, se mezcló y dejó reposar por 5 minutos, posteriormente se adicionó 600 μ L de solución de hidróxido de sodio 2 N y 1.5 mL de agua destilada. Esta mezcla se agitó y se dejó reposar por 30 minutos en oscuridad. Posteriormente, se midió su absorbancia en espectrofotómetro UV-Vis a 520 nm. La solución blanco se preparó de la misma forma sustituyendo la muestra por agua destilada, se creó una curva patrón de la prueba con verbascósido a diferentes concentraciones (250-4000 μ M), con la cual se obtuvo la ecuación ($y = 0.0005x + 0.0449$, $R^2 = 1$) para expresar el contenido de fenilpropanoides totales en el extracto como mg equivalentes de verbascósido por gramo de extracto (mg VE/g Ex).

6.3.3 Determinación del contenido de flavonoides totales

La metodología seguida fue del método de tricloruro de aluminio, para ello una muestra de extracto crudo seco de peso conocido fue diluida en 2 mL de agua destilada. 1.5 mL de extracto diluido fue mezclado con 1.5 mL de solución de tricloruro de aluminio al 2 % en metanol. La mezcla se agitó y se dejó reposar por 10 minutos en oscuridad, posteriormente se analizó su absorbancia en espectrofotómetro UV-Vis a 415 nm. La solución blanco fue preparada de igual forma sustituyendo la muestra por agua destilada, se creó una curva patrón de la prueba con quercetina a diferentes concentraciones (1-660 μ M), con la cual se obtuvo la ecuación ($y = 0.0032x - 0.0049$, $R^2 = 0.9981$) para expresar el contenido de flavonoides totales en el extracto como mg equivalente de quercetina por gramo de extracto (mg QE/g Ex).

6.3.4 Determinación del potencial antioxidante

Una muestra de extracto crudo seco de peso conocido fue diluida en 10 mL de agua destilada, 500 μ L de la dilución se agregaron a 3 mL de solución 0.1 mM de DPPH en metanol, la mezcla se dejó reposar por 45 minutos a temperatura ambiente

en oscuridad. Se midió la absorbancia en espectrofotómetro UV-Vis a 515 nm y se crearon dos curvas patrón de la prueba con trolox y ácido gálico a diferentes concentraciones (25-200 μM y 30-80 μM , respectivamente), con la cual se obtuvieron las ecuaciones ($y = -0.0083x + 0.8711$, $R^2 = 0.9987$; $y = -0.0032x + 0.9837$, $R^2 = 0.999$) para expresar la capacidad antioxidante del extracto como mg equivalentes de trolox/ácido gálico por gramo de extracto (mg TE/g Ex / mg GAE/g Ex).

6.4 Caracterización fisicoquímica del mucílago y del extracto

6.4.1 Análisis elemental C-H-N-S

Se analizó una muestra (1-3 mg) del extracto crudo seco de *B. cordata* y del mucílago seco del nopal en un analizador elemental por combustión (Vario Micro Cube). La presencia de nitrógeno puede indicar la existencia de compuestos como alcaloides, proteínas, aminoácidos, o algún otro compuesto nitrogenado, mientras la presencia de azufre indica la posible existencia de compuestos tales como glucosinolatos o residuos de cisteína y metionina. Los valores obtenidos para cada elemento se expresan como un porcentaje de la masa total de la muestra analizada, esta prueba es cuantitativa.

6.4.2 Análisis termogravimétrico (TGA) y calorimetría de barrido diferencial (DSC)

Se analizó una muestra del extracto crudo y del mucílago en un analizador térmico (Netzsch STA 449 F3 Jupiter), con una rampa de temperatura de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ en el rango 30 $^{\circ}\text{C}$ a 400 $^{\circ}\text{C}$, esto con el fin de conocer su estabilidad, nivel de descomposición y posibles cambios físicos o químicos existentes acorde a un gradiente de temperatura de estos materiales previo a su inclusión en un hidrogel. Los valores obtenidos se expresaron como -1:1 mW/mg vs $^{\circ}\text{C}$ para el termograma DSC y cómo % de masa vs $^{\circ}\text{C}$ para TGA (estas pruebas son cualitativas).

6.4.3 Espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FTIR)

Una muestra del mucílago seco fue analizada en un espectrómetro de infrarrojo por transformada de Fourier (Bruker Tensor 27) en un rango de 4000–500 cm^{-1} , con lo que se conoció a grandes rasgos la abundancia de grupos funcionales y tipos de enlaces químicos, esto además sirvió como comparativo del cambio de estos materiales asociado a la formación de nuevos enlaces con los constituyentes de la película de hidrogel, esta prueba es cualitativa.

6.5 Preparación de hidrogel

Se prepararon 4 diferentes formulaciones del hidrogel (Tabla 2) a fin de comparar sus propiedades físicas y su potencial como sistema de liberación. La variable a evaluar fue el tipo de monómero utilizado en la síntesis de hidrogel, se mantuvo una concentración de monómeros totales del 2% para cada preparación acorde a la práctica común (Boateng *et al.*, 2007; Kamel *et al.*, 2008; Garazi *et al.*, 2015; Guohou *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2018; Medina-Torres *et al.*, 2003). Se realizaron hidrogeles de quitosano, HPMC, quitosano + HPMC y mucílago + HPMC. Todas las combinaciones anteriores fueron preparadas con y sin extracto; aquellas con extracto tuvieron una concentración final de éste correspondiente a 1 g/L y serán empleadas únicamente para la evaluación de liberación del extracto. Los enlazantes y plastificantes que se emplearon fueron ácido cítrico, fosfato monosódico y glicerina. Las mezclas fueron preparadas a 50 °C con agitación manual, agregando uno a uno los componentes en sus formas base hasta llegar a la homogeneidad. Posteriormente las mezclas de gel fueron vertidas en moldes de plástico (forma cuadrada de 5 mL y circular de 50 mL) para su gelificación, se procuró un volumen constante en cada contenedor (5 mL y 10 mL, respectivamente), finalmente se dejaron polimerizar y secar a temperatura ambiente.

Tabla 2. Componentes químicos para la formulación de hidrogel.

		1	2	3	4
		Q	HPMC	Q-HPMC	M-HPMC
Monómero					
	Quitosano	2 g	-	1 g	-
	Hidroxipropil metil celulosa	-	2 g	1 g	1 g
	Mucílago	-	-	-	1 g
Solvente					
	dH2O	98 mL	70 mL	98 mL	70 mL
Enlazante					
	Ácido cítrico	149.32 mg	-	149.32 mg	-
	Fosfato monosódico (NaH ₂ PO ₄)	85.2 mg	-	85.2 mg	-
Plastificante					
	Glicerina	-	30 mL	-	30 mL
Ajustador					
	Ácido acético	2 mL	-	2 mL	-
Dimensiones					
	Área final	11.9 cm ²	10.75 cm ²	11.9 cm ²	10.75 cm ²
	Espesor final	< 1 mm	5 mm	< 1 mm	5 mm

6.6 Caracterización del hidrogel

Para las pruebas referentes a este apartado, se evaluó a los hidrogeles Q y Q-HPMC estando deshidratados, mientras que a HPMC y M-HPMC se les evaluó estando hidratados, esto por cuestiones fisicoquímicas concernientes a su composición.

6.6.1 Absorción de agua

Muestras de cada hidrogel sin extracto se pesaron y colocaron en solución PBS (Phosphate Buffer Solution) a 24°C con pH=7.5 por 1 h. El porcentaje de hinchamiento del hidrogel fue determinado conforme al apartado 2.1.2.

6.6.2 Liberación de extracto

Muestras de cada hidrogel con extracto fueron colocadas en solución PBS a 24°C, pH=7.5. Según la evolución de la cinética, se tomó una muestra de la solución en las que se hallaron sumergidas en el tiempo t=0, t=1, t=2, t=4, t=23, t=46 h y se obtuvo

su espectro de absorción de 190-500 nm; el ritmo de liberación se determinó por el incremento en la absorbancia a 283 nm respecto al tiempo, ya que a esta longitud de onda por efectos prácticos se obtenía la mejor lectura. El incremento en la absorbancia estuvo dado por el intercambio de iones salinos con moléculas de extracto, la superficie en contacto con el medio salino y por la degradación de la propia matriz de hidrogel. Con lo anterior se tendrán datos suficientes para ajustar al modelo de difusión de Korsmeyer-Peppas, el cual se basa en la ley de Fick.

6.6.3 Espectroscopia Infrarroja de transformada de Fourier

Muestras de cada hidrogel sin extracto fueron analizadas por FTIR en un rango de 4000–500 cm^{-1} , con lo cual se determinaron los cambios en los enlaces químicos del material, esta prueba es cualitativa.

6.6.4 Análisis termogravimétrico y calorimetría de barrido diferencial

El análisis térmico del hidrogel fue mediante TGA y DSC, una muestra de cada hidrogel sin extracto fue analizada con una rampa de temperatura de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ en el rango 30 $^{\circ}\text{C}$ a 400 $^{\circ}\text{C}$ en un analizador térmico (Netzsch STA 449 F3 Jupiter). Se determinó su estabilidad térmica, así como sus puntos de transición vítrea o cristalina. Los valores obtenidos fueron expresados para DSC como -1:1 mW/mg vs $^{\circ}\text{C}$ y para TGA como % de masa vs $^{\circ}\text{C}$, esta prueba es cualitativa.

6.7 Análisis estadístico de los resultados

Cada experimento fue realizado por triplicado y el análisis estadístico de los resultados obtenidos sobre el porcentaje de hinchamiento y coeficiente de difusión se llevó a cabo en el software estadístico Statgraphics Centurion XVIII, empleando la prueba de rangos múltiples por el método de Fisher (LSD) con un nivel de confianza del 95% (0.05 de significancia), con lo que se observó si existe o no diferencia significativa entre las diferentes formulaciones de hidrogel.

7. RESULTADOS

7.1 Rendimiento y caracterización del material vegetal

7.1.1 Extracto de *B. cordata*

Se obtuvo 0.4493 g de extracto crudo por gramo de biomasa seca, representando un rendimiento promedio del 43.74 %. Este presentó una consistencia y coloración similar al caramelo con fuerte aroma dulce, posiblemente relacionado con la prueba positiva a azúcares reductores (Tabla 3). Además, otras pruebas colorimétricas confirmaron la presencia de compuestos fenólicos y diterpenos (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados de pruebas fitoquímicas cualitativas del extracto de *B. cordata*.

Metabolito	Prueba	Extracto
Fenoles	Cloruro férrico	+++
Diterpenos	Acetato cúprico	++
Triterpenos	Salkoswi	-
Triterpenos	Lieberman-Burchardt	-
Saponinas	Espuma	-
Alcaloides	Dragendorft	-
Péptidos	Biuret	-
Azúcares reductores	Fehling	+++

+++ Muy Evidente, ++ Evidente, + Ligeramente Evidente, - Ausencia

Durante el análisis cuantitativo del extracto se mostró un alto contenido de compuestos aromáticos, principalmente fenilpropanoides, mientras que el potencial antioxidante obtuvo 56-58% de inhibición de DPPH (Tabla 4). Además, el espectro de absorción obtenido del extracto crudo rehidratado muestra dos máximos de absorción entre 209 y 320 nm (Figura 12).

Tabla 4. Resultados del análisis cuantitativo del extracto de *B. cordata*.

Prueba	Contenido
Contenido de fenoles totales	44.8014 ± 1.688 mg GAE/g Ex
Contenido de fenilpropanoides totales	59.1165 ± 7.025 mg VE/g Ex
Contenido de flavonoides totales	4.1528 ± 0.268 mg QE/g Ex
Potencial antioxidante	9.7683 ± 0.699 mg GAE/g Ex
	46.307 ± 3.358 mg TE/g Ex

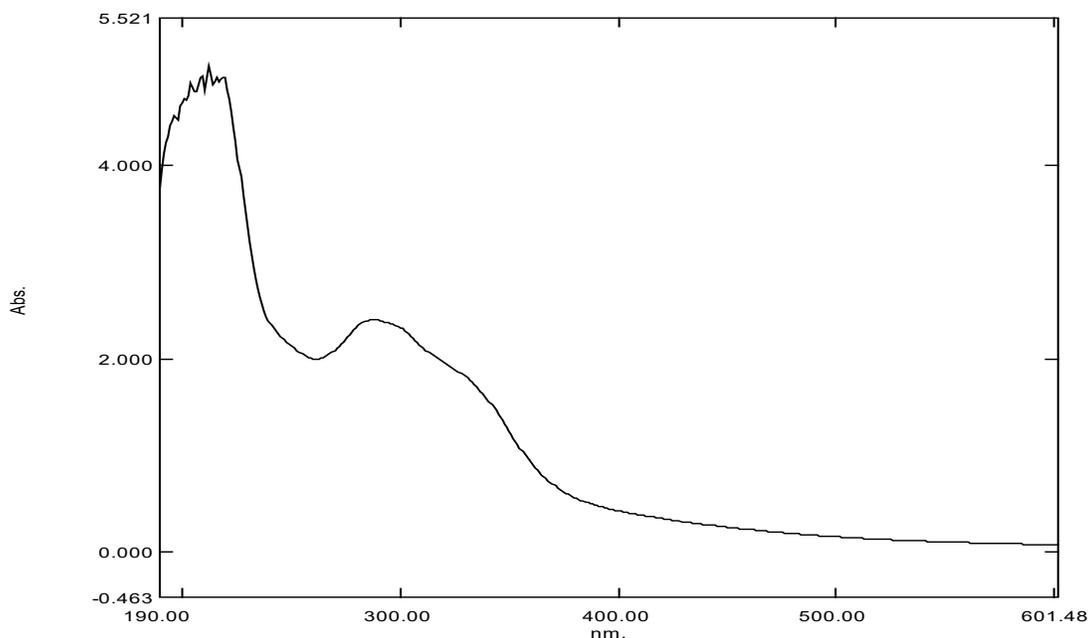


Figura 12 Espectro de absorción UV-Vis del extracto crudo rehidratado *B. cordata*. A una concentración de 1 mg/mL en agua destilada.

Por otra parte, el análisis elemental indicó un contenido de 1.73 % de nitrógeno, 35.15% de carbono y 6.49% de hidrógeno, estando ausente el azufre en la muestra analizada. A partir del termograma DSC/TGA (Figura 13) se observa que esta muestra perdió agua residual (alrededor del 40% del peso total) a partir de los 134.7 °C; en el intervalo de 200-230 °C presentó múltiples transiciones consecuentes de fase, cristalizando a los 211 °C (T_c), al mismo tiempo que se continúa con pérdida de masa; presentó resistencia y estabilidad al cambio gradual de temperatura hasta los 223 °C (T_m), a partir de la cual inició su degradación térmica y transformación en CO_2 con una liberación de calor máxima a 358.8 °C (T_d).

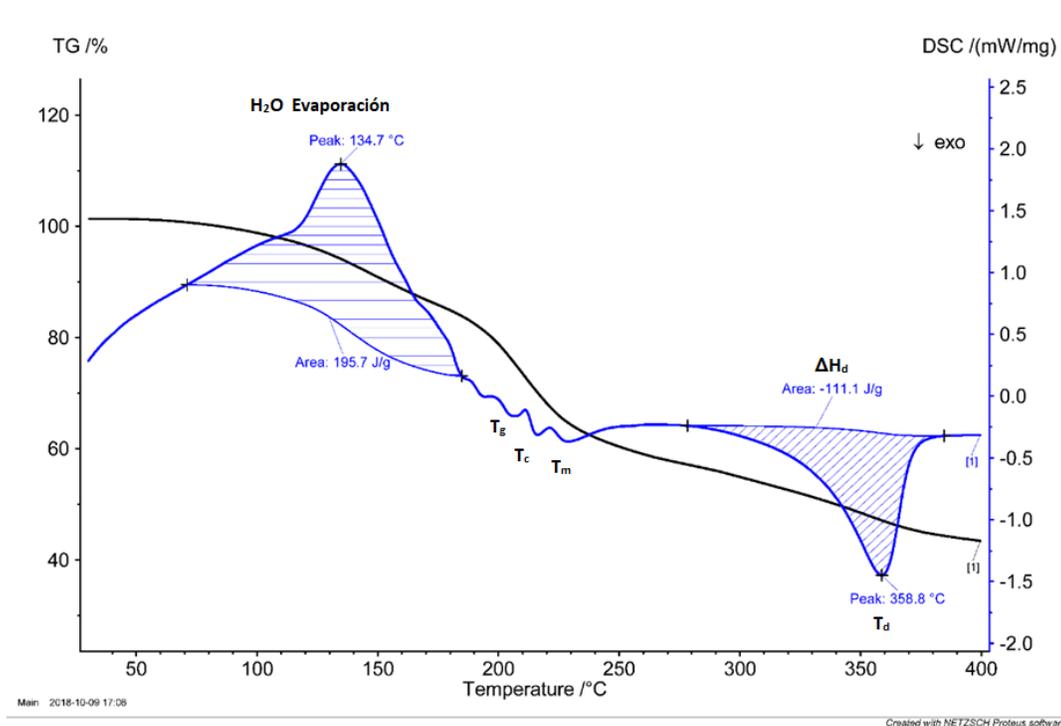


Figura 13 Termograma TGA/DSC del extracto crudo de *B. cordata*

7.1.2 Mucílago

Se logró aislar 3.0 g en peso seco de mucílago por kilogramo fresco de cladodio de nopal, representando un rendimiento del 0.3 %. Este presentó una textura granular fina con una coloración blanco-gris insoluble en etanol (Figura 14).

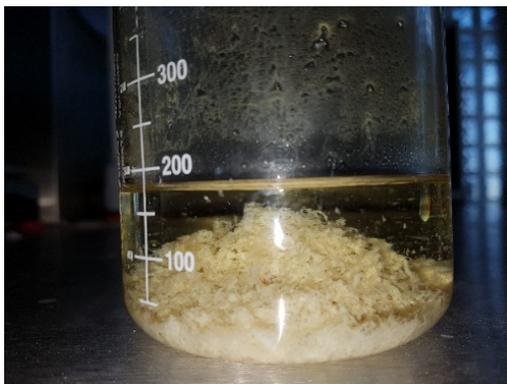


Figura 14 Mucílago fresco suspendido en etanol 96%

El análisis elemental confirmó la presencia de nitrógeno (2.77%) y la ausencia de azufre, con un contenido de carbono del 39.37 % e hidrógeno correspondiente a 6.21%. En cuanto al análisis térmico DSC/TGA (Figura 15), éste presentó resistencia y estabilidad al cambio gradual de temperatura hasta los 253 °C (T_m), temperatura a partir de la cual inició su degradación térmica (pirólisis) y transformación en CO_2 con una liberación de calor máxima a 294.4 °C (T_d); esta muestra perdió agua residual a partir de los 123.5 °C (T_g) y cristalizó a los 170 °C (T_c).

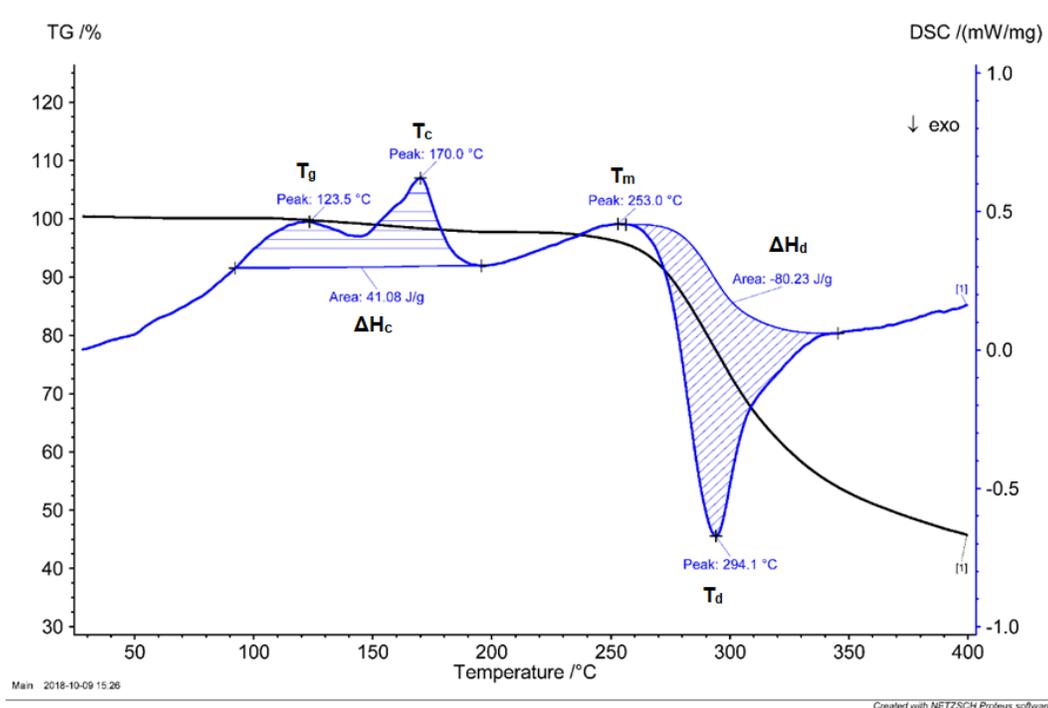


Figura 15 Termograma TGA/DSC del mucílago deshidratado

El espectro IR para quitosano, HPMC y mucílago (Figura 16) mostró bandas características de carbohidratos y polisacáridos, siendo estas relacionadas con el enlace éter presente en el anillo de glucosa (1053 y 945 cm^{-1}). En la Tabla 5 se enlistan las bandas asociadas a grupos funcionales presentes en quitosano, mucílago e hipromelosa.

Tabla 5. Asignación de bandas acorde a frecuencias observadas en el espectro IR de quitosano, mucílago e hipromelosa.

Frecuencia cm^{-1}	Asignación
3359, 3292	N-H stretching O-H stretching
2919	C-H sym stretching
2873	C-H asym stretching
1649	C=O stretching
1559	N-H bending
1420	CH ₂ - bending
1374	CH ₃ - sym deformation
1316	C-N stretching
1150	C-O-C asym stretching
1063, 1027	C-O stretching
895	CH- bending

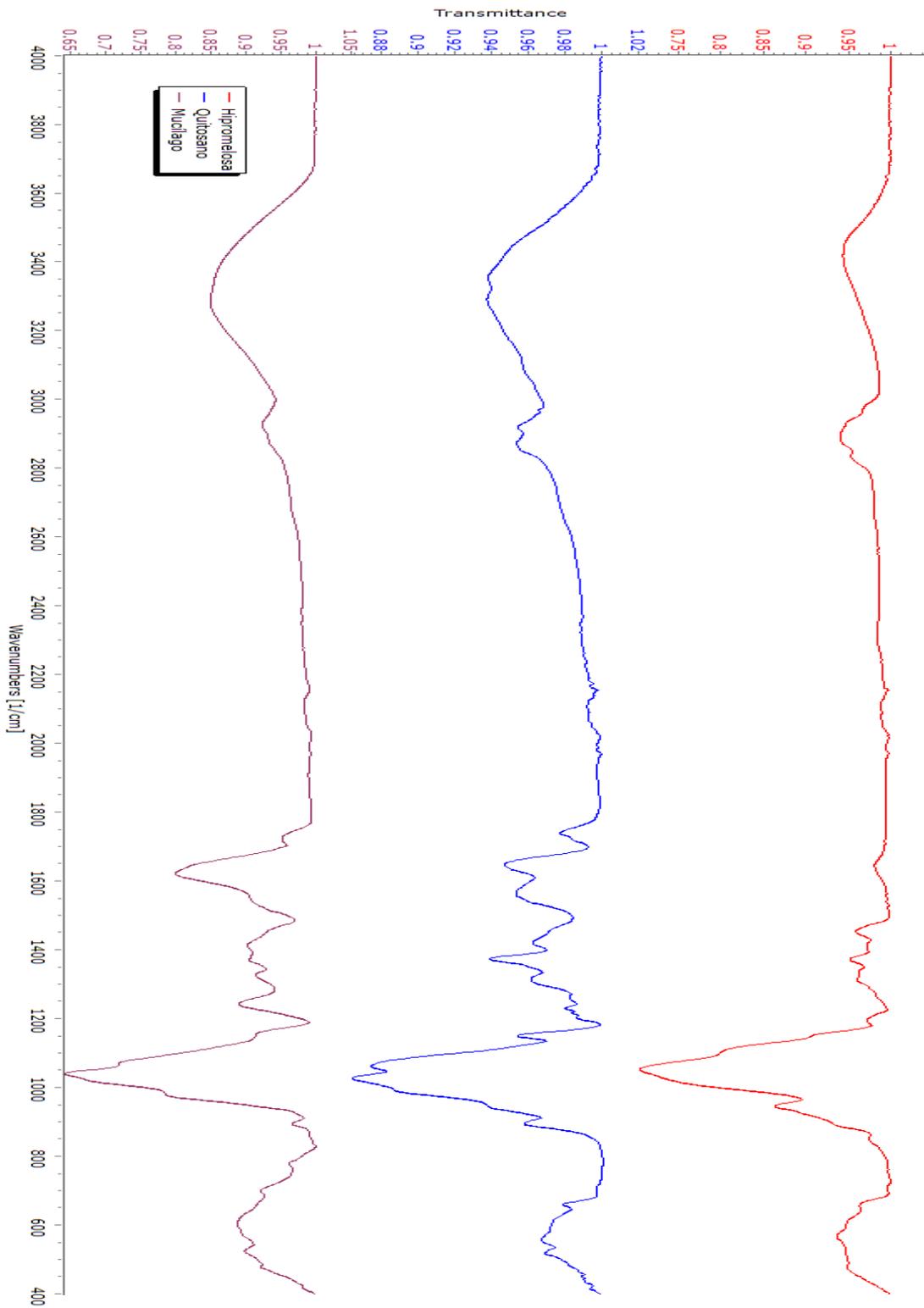


Figura 16 Espectros IR de quitosano, hipromelosa y mucílago, polisacáridos empleados para la síntesis de hidrogel

7.2 Caracterización de hidrogel

Se logró la formación de hidrogel con las formulaciones propuestas (Figura 17). Existieron diferencias cualitativas marcadas entre las formulaciones de hidrogel convenidas, dividiéndose en dos grupos; el primero se presentó en forma de película deshidratada y semi rígida con cierto grado de resistencia a la deformación, a este pertenecen el hidrogel Q y Q-HPMC; el hidrogel Q presentó una coloración ámbar y deformación física al estar deshidratada, el hidrogel Q-HPMC presentó una coloración blanquecina y conservó en su totalidad la forma del contenedor en la que fue almacenada durante el proceso de deshidratación. El segundo grupo fue en forma de un hidrogel hidratado de gran volumen; en este grupo se encuentran el hidrogel HPMC y el hidrogel M-HPMC, ambos conservaron la forma del recipiente en el que se vertieron. HPMC mostró mayor resistencia mecánica que M-HPMC a pesar de presentar compartimentalización interna de aire (burbujas) y una coloración blanquecina, en cambio M-HPMC presentó mayor densidad, coloración ámbar y una excelente adherencia a superficies, dicha capacidad de adherencia no estuvo presente en ninguna otra preparación, por lo que se le atribuye esa característica únicamente al mucílago.

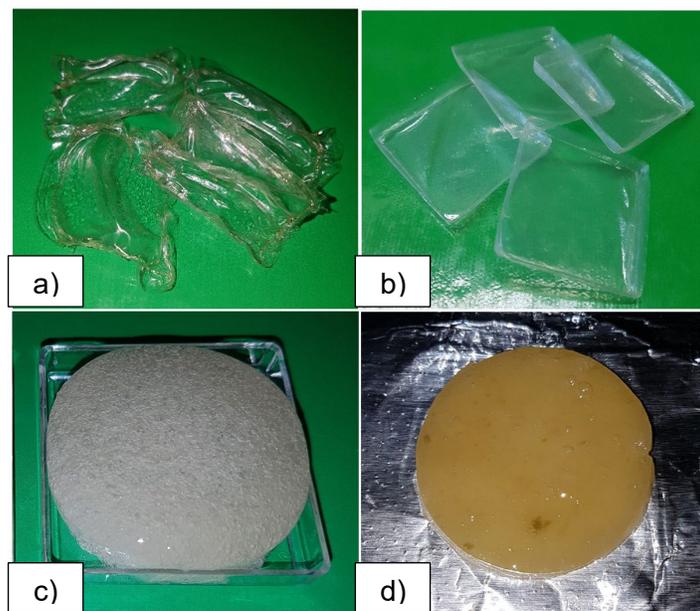


Figura 17 Hidrogel obtenido. a) Q, b) Q-HPMC, c) HPMC, d) M-HPMC

El porcentaje de hinchamiento logrado (determinado como %S, Tabla 6) resultó ser estadísticamente diferente entre las cuatro formulaciones de hidrogel, con un 95% de confiabilidad, la diferencia más evidente se observó respecto a los grupos HPMC y M-HPMC vs Q y Q-HPMC (Tabla 7), siendo Q-HPMC quien mayor absorción de agua presenta y M-HPMC el de menor absorción de agua acorde a su porcentaje de hinchamiento (Figura 18).

Tabla 6. Porcentaje de hinchamiento de las cuatro formulaciones de hidrogel.

Preparación	Porcentaje de hinchamiento (%S)
Q	260.514 ± 10.9844
Q-HPMC	341.246 ± 4.82536
HPMC	78.6738 ± 6.10253
M-HPMC	40.4999 ± 9.18546

Tabla 7. Prueba de rangos múltiples: evaluando el porcentaje de hinchamiento (%S) entre cada hidrogel. Método: 95.0 % LSD

GEL	Casos	Media	Grupos homogéneos
M-HPMC	4	40.4999	X
HPMC	4	78.6738	X
Q	4	260.514	X
Q-HPMC	4	341.246	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Limites
HPMC - M-HPMC	*	38.1739	13.9676
HPMC - Q	*	-181.841	13.9676
HPMC - Q-HPMC	*	-262.572	13.9676
M-HPMC - Q	*	-220.014	12.9315
M-HPMC - Q-HPMC	*	-300.746	12.9315
Q - Q-HPMC	*	-80.7313	12.9315

* indica diferencia estadísticamente significativa.

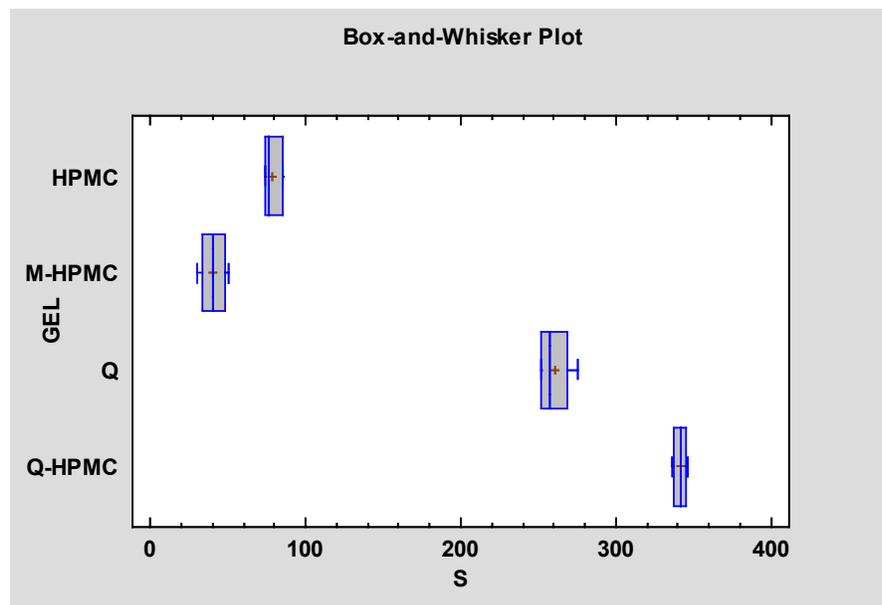


Figura 18 Prueba de cajas y bigotes: evaluando %S (S) entre cada tipo de hidrogel (GEL).

Los datos recabados mediante absorbancia UV-vis para la liberación del extracto se ajustaron satisfactoriamente al modelo de Korsmeyer-Peppas acorde el valor R^2 (Tabla 8), lográndose identificar el tipo de difusión, mediante el exponente de liberación (n) correspondiente a cada hidrogel en solución PBS.

Tabla 8. Constante de velocidad de liberación (k) y exponente de liberación (n) obtenidas con el modelo Korsmeyer-Peppas con su nivel de ajuste al modelo (R^2).

Preparación	k	n	R^2
Q	0.8518 ± 0.0055	0.1411 ± 0.00145	0.9246
Q-HPMC	0.8497 ± 0.0328	0.1362 ± 0.0357	0.9411
HPMC	0.537214 ± 0.0202	1.1146 ± 0.0835	0.991
M-HPMC	0.67451 ± 0.0221	0.6804 ± 0.0576	0.992

Estadísticamente, acorde al valor del exponente de liberación, no existió diferencia significativa entre Q y Q-HPMC (Figura 19), mientras entre el resto de formulaciones de hidrogel existieron diferencias significativas (Tabla 9). En un tiempo

dado t, principalmente acorde al valor del exponente de liberación (n), la cantidad de extracto liberado por cada hidrogel corresponde a $HPMC > M-HPMC > Q-HPMC \geq Q$.

Tabla 9. Prueba de rangos múltiples: evaluando el exponente de liberación (n) entre cada hidrogel. Método: 95.0% LSD

GEL	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Q-HPMC	3	0.136267	X
Q	3	0.141133	X
M-HPMC	3	0.6804	X
HPMC	3	1.11467	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
HPMC - M-HPMC	*	0.434267	0.101339
HPMC - Q	*	0.973533	0.101339
HPMC - Q-HPMC	*	0.9784	0.101339
M-HPMC - Q	*	0.539267	0.101339
M-HPMC - Q-HPMC	*	0.544133	0.101339
Q - Q-HPMC		0.00486667	0.101339

* indica una diferencia significativa.

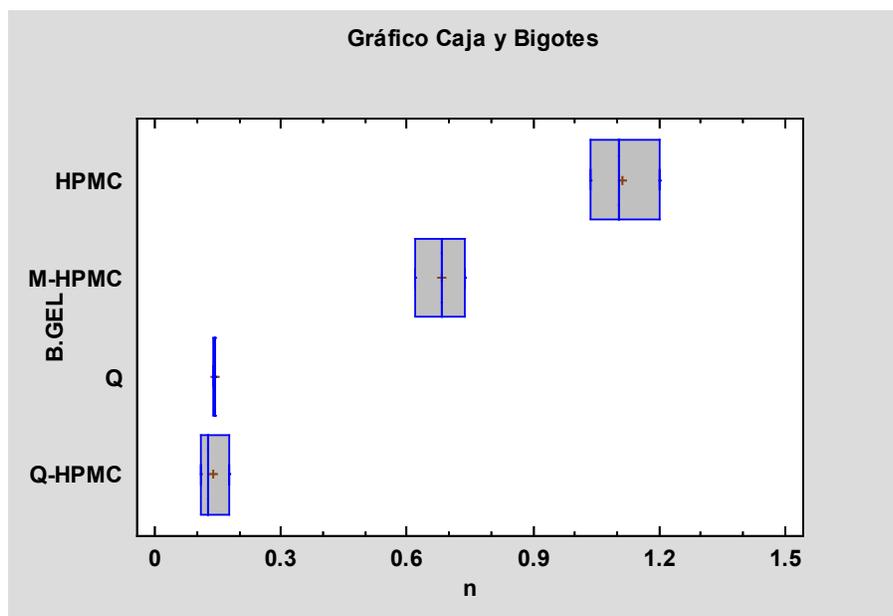
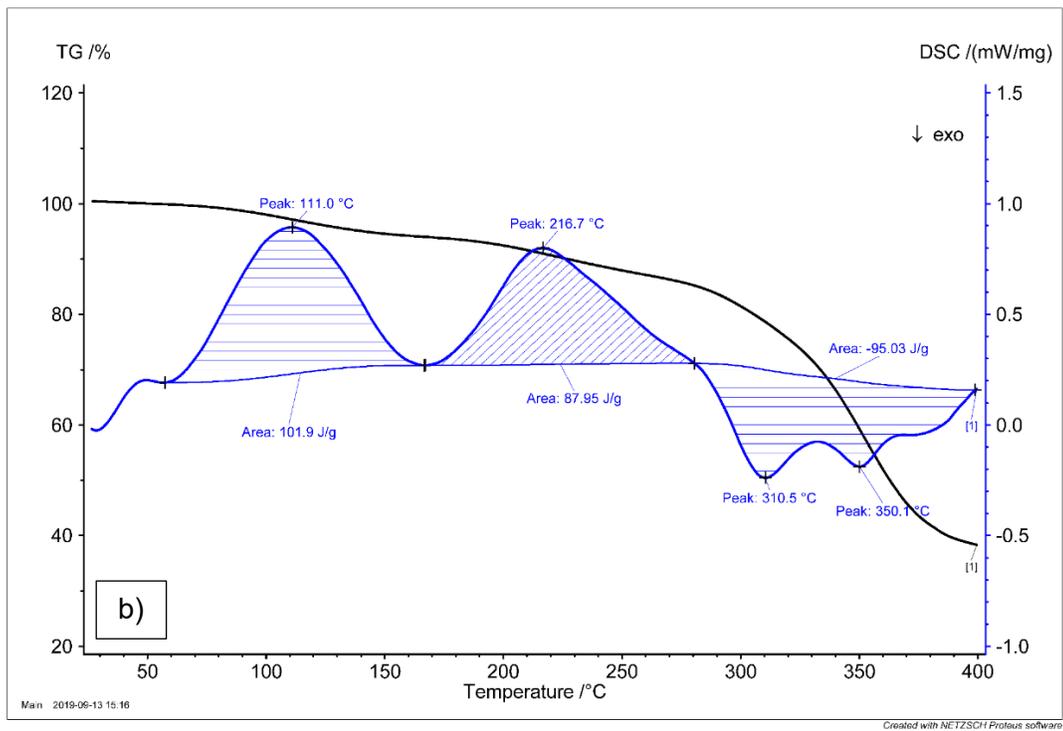
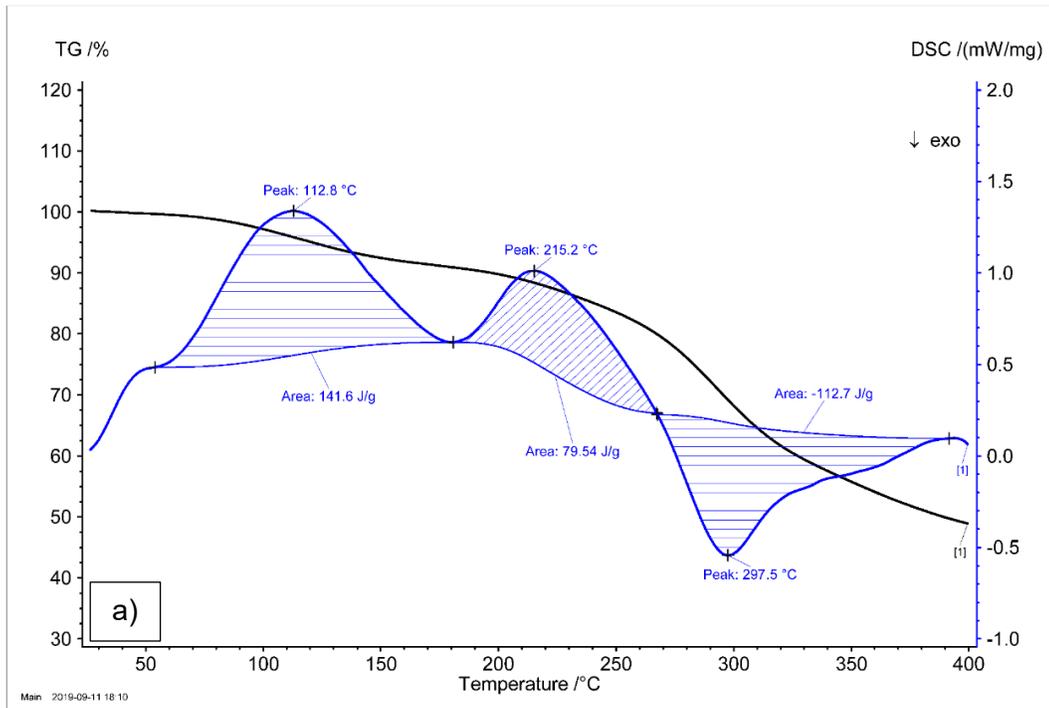


Figura 19 Prueba de cajas y bigotes: evaluando el exponente de liberación (n) entre cada tipo de hidrogel (B.GEL)

El análisis por DSC/TGA para el hidrogel de quitosano (Figura 20a) mostró tres transiciones de primer orden, la primera se presentó absorción de calor con un máximo de 112.8 °C, atribuido al proceso de evaporación del contenido de agua residual, a este le siguió una segunda absorción de calor con un máximo en 215.2 °C al que se le atribuye un proceso de cristalización (T_c), finalmente se dio la liberación de calor a 297.5 °C junto a la disminución del 50% del peso de la muestra, indicativo de la degradación de la muestra (T_d). Con marcadas similitudes, el DSC/TGA del hidrogel de Q-HPMC (Figura 20b), tuvo un pico de absorción de calor en 111 °C para la evaporación del contenido de agua residual, seguido de una segunda absorción de calor con máximo en 216.7 °C atribuido al proceso de cristalización y liberación de calor con dos mínimos en 310.5 °C y 350.1 °C, mostrando dos fases de degradación, uno correspondiente a la fracción de quitosano y otra a la fracción de HPMC, resultando en una pérdida de 60% del peso de la muestra. Muy diferentes a lo anterior, el DSC/TGA del hidrogel de HPMC (Figura 20c) presentó el máximo de temperatura en 104.1 °C para la evaporación de la fracción de agua, seguido de otro máximo de absorción de calor en 276.7 °C y la pérdida inmediata del 80% de su peso, lo anterior se le atribuye a la evaporación del glicerol contenido y a la degradación del monómero de HPMC; igualmente para el DSC/TGA del hidrogel M-HPMC (Figura 20d), existió un máximo de absorción de calor a 107.2 °C para la pérdida de agua y un máximo para la degradación y pérdida de glicerol a 278 °C. En ambos sistemas, el alto contenido de glicerol impide identificar las temperaturas de transición de fase T_c y T_m , a su vez, el punto de evaporación del glicerol coincide con las temperaturas de degradación de diversos polisacáridos.



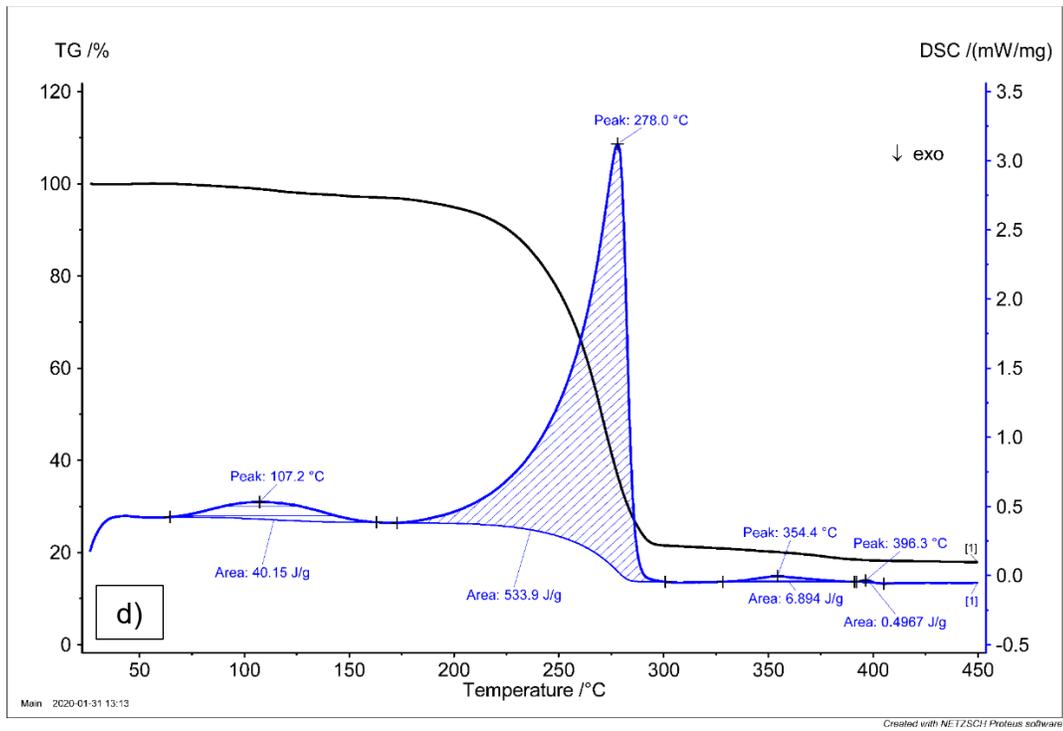
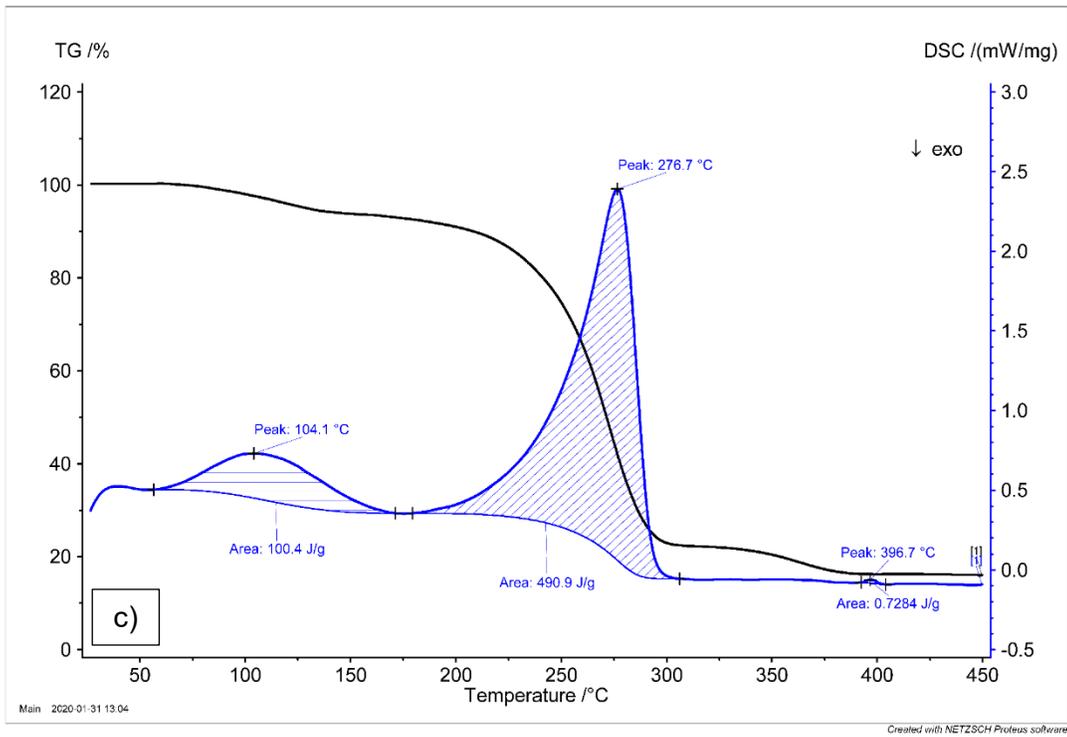


Figura 20 Termogramas DSC/TGA de hidrogeles obtenidos. a) hidrogel Q, b) hidrogel Q-HPMC, c) hidrogel HPMC, d) hidrogel M-HPMC

La Figura 21 muestra el espectro IR de los hidrogeles obtenidos, siendo la Tabla 10 la que enlista las bandas características para los hidrogeles HPMC y M-HMPC, mientras la Tabla 5 aplica para los hidrogeles Q y Q-HPMC.

Tabla 10. Asignación de bandas IR para glicerol e hidrogel M-HPMC.

Frecuencia cm^{-1}	Asignación
3282	O-H stretching
2940	C-H sym stretching
2884	C-H asym stretching
1457	C-O-H bending
1417	C-O-H bending
1326	C-H deformation
1215	CH ₂ twisting
1110	C-O-C asym stretching
1036	C-O stretching
993	C-O stretching
923	O-H- bending

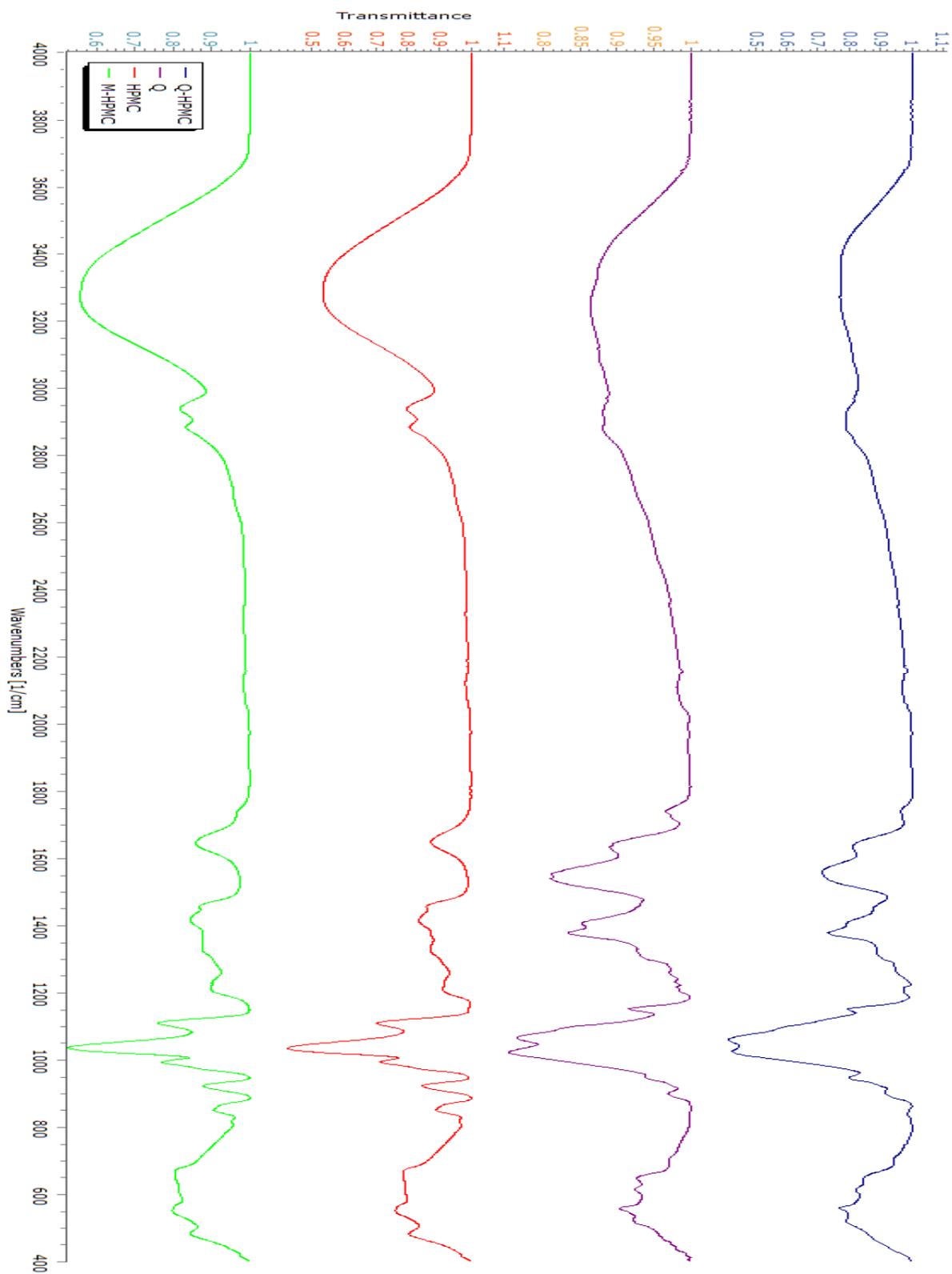


Figura 21 Espectros IR de los hidrogeles obtenidos

8. DISCUSIÓN

La evaluación fitoquímica del extracto de cultivo celular de *B. cordata* mostró un alto contenido de compuestos aromáticos, principalmente fenilpropanoides y acorde al espectro de absorción obtenido del extracto, con picos máximos de absorción entre 290 y 320 nm, se corrobora la presencia de compuestos fenólicos descritos previamente y la posible presencia de verbascósido acorde a lo reportado por Estrada-Zuñiga (2009); aunque es posible que existan otras familias de metabolitos, las pruebas fitoquímicas no fueron suficientemente sensibles para mostrar la presencia de estos (Ávila *et al.*, 2014; Deneb *et al.*, 2009; Romero *et al.*, 2003), por lo que se sugiere evaluar el extracto con técnicas más sensibles, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a un espectrómetro de masas y evaluación mediante resonancia magnética nuclear de cada una de las fracciones obtenidas (Cseke *et al.*, 2006; Harbone, 1973; Skoog *et al.*, 2018). Pese a lo anterior, el análisis elemental si posee la sensibilidad suficiente para descartar la presencia de compuestos azufrados, tales como glucosinolatos (Crozier *et al.*, 2006; Cseke *et al.*, 2006; Harbone, 1973), por otra parte, la presencia de nitrógeno confirma existencia de compuestos nitrogenados, pudiendo posiblemente ser cualesquiera aminoácidos residuales libres de azufre (Nelson *et al.*, 2013; Taiz *et al.*, 2002) que no pudieron ser eliminados durante el proceso de obtención del extracto.

Respecto a la extracción de mucílago, este proceso puede ser factible a partir de cladodios destinados al consumo humano pues los gastos en materia prima son muy bajos y la técnica requerida es bastante sencilla (información personal del autor). No obstante, queda la interrogante acerca de la diferencia en contenido de mucílago por gramo de biomasa respecto al nivel de desarrollo de los cladodios del nopal (ej. 3 años de crecimiento), pudiendo ser este evaluado en un próximo estudio (Medina *et al.*, 2003; Taiz *et al.* 2002), pues la información actual solo permite establecer que el rendimiento en porcentaje de mucílago obtenido dependerá del método de extracción (solventes utilizados, temperatura, grado de pureza del mucílago) y la materia vegetal utilizada (etapa de desarrollo del cladodio, procedencia geográfica), en tal caso se ha

reportado un máximo del 1.2% en el estudio realizado por Sepulveda en 2007 para la extracción a partir del parénquima de *Opuntia spp.* y 0.56 % en el estudio de López-García en 2017 a partir de cladodios “maduros” de *O. joconostle*.

Los datos recabados mediante el análisis térmico nos pueden sugerir el rango de temperatura con el cual podría ser posible utilizar el mucílago y el extracto, con un máximo de temperatura que no deberá sobrepasar los 211 °C en el caso del extracto y los 253 °C para el mucílago, estas temperaturas correspondientes a T_m , anteceden a la pirolisis completa de estos compuestos. Probablemente, la diferencia de T_m y el comportamiento térmico presentados son debido a la composición química y ordenamiento molecular del mucílago respecto al extracto; para indagar más sobre las causas se recomienda realizar un estudio de cristalografía de rayos X (Skoog *et al.*, 2018) o XPS (X-ray photoelectron spectroscopy). Cabe mencionar que los datos para la descomposición del mucílago correspondieron a lo reportado por López-García en 2017 y por Gheribi en 2018.

Se visualizaron las bandas características en IR para el quitosano y análogamente para mucílago, ambos espectros de IR coinciden totalmente en sus bandas (Figura 16), difiriendo únicamente en la intensidad de estas (%T). La diferencia en %T está dada por la concentración de la muestra analizada y por la abundancia del grupo funcional a la frecuencia correspondiente (Divya *et al.*, 2018; Skoog *et al.*, 2018), de igual manera se enfatiza la diferencia y abundancia de grupos funcionales entre quitosano y la hipromelosa, se destacan las bandas 1739 cm^{-1} y 1559 cm^{-1} correspondientes al grupo amino, el cual solo está presente en quitosano. Existió coincidencia de bandas en el espectro IR de hipromelosa con lo reportado por Akinosho en 2013 y para quitosano con lo reportado por Divya en 2018.

En cuanto al hidrogel obtenido, acorde a observación visual, la mayor resistencia se presentó en las preparaciones Q y Q-HPMC, manteniendo su estructura alrededor de 2 semanas en medio acuoso a agitación constante de 3 revoluciones por segundo, las preparaciones M-HPMC y HPMC presentaron solubilidad completa en menos de 6 horas bajo las mismas condiciones (información personal del autor). Al ser rehidratados, Q y Q-HPMC aumentaron significativamente sus dimensiones, el resto a

pesar de reabsorber una proporción de su contenido inicial en agua, no incrementaron notoriamente sus dimensiones, pero si alteraron su resistencia mecánica al verse esta disminuida. A finales de 2018 Gheribi reportó valores de $TS=1.1 \text{ N/mm}^2$ y porcentaje de elasticidad máxima (EB)=68% para un hidrogel de mucílago de *O. ficus-indica* (4%) – glicerol (40%), y de $TS=2.6 \text{ N/mm}^2$ y EB=60% para un hidrogel de mucílago (4%) – sorbitol (40%); previamente Sarkar en 2014 reportó valores TS de 3.62-7.89 N/mm^2 y EB de 22-28.12% en hidrogel de mucílago (0.5-2%) obtenido de cormos de taro (*Colocasia esculenta*) y una mezcla de HPMC-glicerol-PEG-parabeno; datos que servirán de referencia para próximas caracterizaciones relacionadas al presente trabajo.

Acorde a observación visual, las preparaciones Q y Q-HPMC mostraron estabilidad estructural durante las 46 horas de mediciones para la liberación del extracto, por el contrario, las preparaciones HPMC y M-HPMC solo pudieron ofrecer datos durante las primeras 4 horas utilizando la metodología descrita con anterioridad (información personal del autor). A pesar de lo último se logró obtener valores R^2 superiores a 0.96 a partir de los datos obtenidos y evaluados en la ecuación de Korsmeyer-Peppas; para las preparaciones Q y Q-HPMC, los valores del exponente de liberación corresponden a una difusión Fickeana ($n < 0.5$), donde la difusión está totalmente dominada por la acción del solvente, en este caso agua, lo anterior concuerda con la alta resistencia a la solubilidad de este grupo de hidrogel, por el contrario, la preparación M-HPMC mostró valores de exponente de liberación $0.5 < n < 1$, correspondiente a una difusión no Fickeana o transporte anómalo, acorde a lo propuesto por Korsmeyer-Peppas, la difusión está gobernada por el cambio estructural del hidrogel y difusión por igual, lo cual nuevamente concuerda con la buena solubilidad de este hidrogel en agua. La formulación HPMC presentó $n > 1$, lo cual corresponde al super transporte de tipo 2, lo que se interpreta como una liberación debida a la ruptura de la matriz debido a la tensión ejercida por el solvente, esto dado a que el núcleo del gel presenta un arreglo vítreo donde se concentran las fuerzas de tensión y desencadenan la ruptura de la matriz (Hillery *et al.* 2017; Luciano, 2015).

La diferencia en solubilidad y, por ende, el modo de difusión, está dada por la forma en la que están constituidas, los componentes individuales del grupo Q y Q-HPMC se encuentran enlazados por fuerzas covalentes (formados por el ácido cítrico y fosfato monosódico), mientras que los componentes del grupo M-HPMC y HPMC solo se encuentran enlazados por fuerzas débiles, es decir, puentes de hidrógeno (interfase agua-glicerol). Tales diferencias marcadas en el mecanismo de difusión, indican que cada hidrogel podría tener aplicaciones diferentes, las cuales que deberán ser investigadas y evaluadas a futuro, para establecer puntualmente alguna aplicación, es necesario obtener información sobre las propiedades mecánicas de cada hidrogel en diferentes medios, así como evaluaciones en sistemas biológicos en búsqueda de posibles efectos inflamatorios y citotóxicos (Akinosho *et al.*, 2013; Bhingé *et al.*, 2016; Guohou *et al.*, 2018; Henderson *et al.*, 2016).

Comparativamente Marani en 2015, obtuvo para un hidrogel de HPMC (1%) y ácido cítrico, un valor de $n=0.3$ al evaluar la liberación de nicotina, correspondiente a un ritmo de liberación de $45 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ a pH 5.5 (pH promedio de la piel humana); por otra parte en el mismo año, Momoh obtuvo valores de $n=0.057$ al evaluar la liberación de la proteína GST (glutathione-s-transferase) mediante un gel de alginato (1%) – glicerol; tal gel liberó el 90% de la proteína en las primeras 2 horas; posteriormente Morgado en 2017, obtuvo valores de $n=0.3$ y 0.7 en hidrogeles de quitosano – PVA – al evaluar la liberación de ibuprofeno mediada por inclusiones de β -ciclodextrina, logrando la liberación del 80% del fármaco en 12 horas y la totalidad de este a las 72 horas, incluso mostrando el 78% de viabilidad celular *in vitro* tras el séptimo día crecimiento celular. En este estudio se logró la liberación del 60% del extracto utilizado en 8 horas para los hidrogeles Q y Q-HPMC, y del 90% en 2 horas para los hidrogeles HPMC y M-HPMC, situando tentativamente al primer grupo para dosificaciones prolongadas menores a 24 horas y al segundo para dosificaciones retardadas de 1-2 horas en ambientes de alta humedad (ej. cavidad bucal, aplicación vaginal o ingesta), siendo posible la utilización de fármacos polares o medianamente polares, propuesta que deberá ser estudiada.

Los espectros de IR obtenidos para las preparaciones de hidrogel Q y Q-HPMC no difirieron en las bandas obtenidas (Figura 21), estas son equivalentes al espectro obtenido del quitosano (Figura 16) utilizado como materia prima, con la única diferencia en la intensidad de las bandas obtenidas. El espectro de IR obtenido para el hidrogel HPMC y M-HPMC muestra ocultación de bandas de ambos hidrogeles por el propio espectro del glicerol contenido en ambas muestras, esto a causa de la marcada diferencia en la proporción en masa monómero:solvente (Skoog *et al.*, 2018), es posible inferir que dada la similitud del espectro de mucílago con el de quitosano (Figura 16; Prajapati *et al.*, 2013; Saenz *et al.*, 2004), el espectro real de la preparación M-HPMC sería equivalente al de Q-HPMC, salvo la ausencia de las bandas correspondientes al grupo amino; sería conveniente evaluar la efectividad de la aplicación de liofilización para la eliminación del glicerol (Hillery *et al.*, 2017) o el uso de otro plastificante no tóxico para la síntesis de hidrogel de mucílago, ya que por sí sola el agua no contribuye a la formación de la matriz.

9. CONCLUSIÓN

La capacidad de diferentes hidrogeles de liberar tanto retardadamente como de forma prolongada el contenido de un extracto de cultivo celular de *B. cordata* dependió de los polisacáridos empleados para su formulación. Se identificaron dos grupos de hidrogel de acuerdo a sus características: en el primer grupo los hidrogeles M-HPMC y HPMC presentaron alto contenido de agua y una desintegración de corto plazo que dio lugar a una liberación retardada del extracto; en el segundo grupo los hidrogeles Q y Q-HPMC presentaron mayor resistencia mecánica y una desintegración de largo plazo que dio como resultado la liberación prolongada del extracto. La información recabada sugiere que el hidrogel M-HPMC podría ser utilizado en situaciones donde se requiera una liberación retardada en ambientes higroscópicos (ej. cavidad bucal, tracto digestivo, cavidad vaginal), pero aún se carece de ciertos datos que podrían dar margen de mejora en la síntesis del hidrogel previo a dar paso para su evaluación *in vivo*.

Con relación a lo anterior, el método propuesto para la obtención de un extracto rico en compuestos fenólicos, dio como resultado un activo rico en compuestos de clase fenilpropanoide, en el que se encuentra el verbascósido, siendo este el primer paso para la obtención del compuesto con alta pureza; de igual forma la metodología propuesta para la extracción de mucílago apunta a ser la más indicada en cuanto a costo – beneficio comparado con metodologías establecidas por algunos autores previamente citados.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed E. M. (2015). Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. **Journal of Advanced Research**, 6(2), 105–121.
- Akinosho H., Hawkins S., Wicker L. (2013). Hydroxypropyl methylcellulose substituent analysis and rheological properties. **Carbohydrate Polymers**, 98(1), 276–281.
- Ávila Acevedo José Guillermo, Espinosa González Adriana Montserrat, De María y Campos Diana Matamoros (2014). Photoprotection of *Buddleja cordata* extract against UVB-induced skin damage in SKH-1 hairless mice. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 14:281.
- Avila A. Guillermo, G. de Liverant Juliana, Martinez Andres (1999). Mode of action of *Buddleja cordata* verbascoside against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Ethnopharmacology** 66:75–78.
- Binghe Wang, Longqin Hu, Teruna J. Siahaan (2016). **Drug delivery: principles and applications**. Second Edition, John Wiley & Sons, Inc.
- Crozier Alan, Clifford Michael N., Ashihara Hiroshi (2006). **Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet**. Blackwell Publishing Ltd.
- Cseke Leland J., Kirakosyan Ara, Kaufman Peter B., Warber Sara L., Duke James A., Briemann Harry L. (2006). **Natural Products from Plants**. Second edition, Taylor & Francis Group, LLC.
- Deneb Camacho Morfin, Hernández Peruaquí Selene Itzel, Lilián Morfín Loyden (2009). Tepozán (*Buddleia cordata*). **FESC, UNAM**.
- Divya Nataraj, Seema Sakkara, Murlidhar Meghwal, Narendra Reddy (2018). Crosslinked chitosan films with controllable properties for commercial applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, 120:1256-1264.
- De Leo M., Bruzual De Abreu M., Pawlowska A. M., Cioni P. L., Braca A. (2010). Profiling the chemical content of *Opuntia ficus-indica* flowers by HPLC–PDA-ESI-MS and GC/EIMS analyses. **Phytochemistry Letters**, 3:48–52.

- Estrada-Zúñiga M. E., Cruz-Sosa F., Rodríguez-Monroy M., (2009). Phenylpropanoid production in callus and cell suspension cultures of *Buddleja cordata* Kunth. ***Plant Cell, Tissue and Organ Culture***, 97: 39-47.
- Espinosa-González Adriana Montserrat, Ana María García-Bores, José del Carmen Benítez-Flores (2016). Photoprotective effect of verbascoside from *Buddleja cordata* in SKH-1 mice exposed to acute and chronic UV-B radiation. ***Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas***, 15 (5): 288 – 300.
- Garazi Gainza, Silvia Villullas, José Luis Pedraz, Rosa Maria Hernandez, Manoli Igartua (2015). Advances in drug delivery systems (DDSs) to release growth factors for wound healing and skin regeneration. ***Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine***, 11:1551–1573.
- Gheribi R., Puchot L., Verge P., Jaoued-Grayaa N., Mezni M., Habibi Y., Khwaldia K. (2018). Development of plasticized edible films from *Opuntia ficus-indica* mucilage: A comparative study of various polyol plasticizers. ***Carbohydrate Polymers***, 190(December 2017), 204–211.
- Gómez-Hernández Milton Abraham (2018). ***Evaluación in vitro del efecto fotoprotector de un extracto obtenido del cultivo celular de Buddleja cordata*** (Tesis). Universidad Autónoma del Estado de México.
- Guohou Suna, Tieqiang Lianga, Wenying Tana, Lijuan Wanga (2018). Rheological behaviors and physical properties of plasticized hydrogel films developed from κ-carrageenan incorporating hydroxypropyl methylcellulose. ***Food Hydrocolloids*** 85 (2018) 61–68.
- Gutierrez-Rebolledo, G. A, Estrada-Zuñiga M. E., Nieto-Trujillo A. (2018). *in vivo* anti-inflammatory activity and acute toxicity of methanolic extracts from wild plant leaves and cell suspension cultures of *buddleja cordata kunth* (buddlejaceae). ***Revista Mexicana de Ingeniería Química***. 17(1):317-330.
- Gutiérrez-Rebolledo G. A., Estrada-Zúñiga María Elena, Garduño-Siciliano L., García-Gutiérrez G. E., Reséndiz Mora C. A., Calderón-Amador J., Cruz-Sosa, F. (2019). *In vivo* antiarthritic effect and repeated dose toxicity of standardized

- methanolic extracts of *Buddleja cordata Kunth* (Buddlejaceae) wild plant leaves and cell culture, **Journal of Ethnopharmacology**.
- Harborne J. B. (1973). **Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis**. Chapman and Hall Ltd.
- Harsha Kharkwal, Srinivas Janaswamy (2017). **Natural Polymers for Drug Delivery**, CAB International.
- Henderson G., Rang H. P., Ritter J. M., Flower R. J. (2016). **RANG AND DALE'S Pharmacology**. Eighth edition, Elsevier Ltd.
- Hillery Anya M., Park Kinam (2017). **Drug delivery: fundamentals and applications**. Second Edition, Taylor & Francis Group, LLC.
- Höhne G. W. H., Hemminger W. F., Flammersheim H. J. (2003). **Differential Scanning Calorimetry: an introduction for practitioners**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Imene Ammar, Monia Ennouri, Hamadi Attia (2015). Phenolic content and antioxidant activity of cactus (*Opuntia ficus-indica L.*) flowers are modified according to the extraction method. **Industrial Crops and Products**, 64:97–104.
- Imene Ammar, Monia Ennouri, Mohamed Bouaziz, Amal Ben Amira, Hamadi Attia (2015). Phenolic Profiles, Phytochemicals and Mineral Content of Decoction and Infusion of *Opuntia ficus-indica* Flowers. **Plant Foods Hum Nutr**, 70:388-394.
- Imene Ammar, Sana Bardaab, Massara Mzidc, Zouheir Sahnounb, Tarak Rebaïic, Hamadi Attiaa, Monia Ennouria (2015). Antioxidant, antibacterial and in vivo dermal wound healing effects of *Opuntia* flower extracts. **International Journal of Biological Macromolecules**, 81:483–490.
- Imène Ammar, Monia Ennouri, Bassem Khemakhem, Thabèt Yangui, Hamadi Attia (2012). Variation in chemical composition and biological activities of two species of *Opuntia* flowers at four stages of flowering. **Industrial Crops and Products**, 37:34-40.
- Joshua S. Boateng, Kerr H. Matthews, Howard N. E. Stevens, Gillian M. Eccleston (2008). Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems: A Review. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 97:2892–2923.

- Kalina Alipieva, Liudmila Korkina, Ilkay Erdogan Orhan, Milen I. Georgiev (2014). Verbascoside — A review of its occurrence, (bio)synthesis and pharmacological significance. **Biotechnology Advances**, 32:1065–1076.
- Kamel S., Ali N., Jahangir K., Shah S. M., El-Gendy A. A. (2008). Pharmaceutical significance of cellulose: A review. **eXPRESS Polymer Letters** Vol.2, 11:758-778.
- Leyva-Porras C., Cruz-Alcantar P., Espinosa-Sol V., Saavedra-Leos M. Z. (2019). Application of Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Modulated Differential Scanning. **Polymers**, 12(5), 1–21.
- Liu H., Wang C., Li C., Qin Y., Wang Z., Yang F., Li Z., Wang J. (2018). A functional chitosan-based hydrogel as a wound dressing and drug delivery system in the treatment of wound healing. **RSC Advances**, 8(14), 7533–7549.
- López-García F., Jiménez-Martínez C., Guzmán-Lucero D., Maciel-Cerda A., Delgado-Macuil R., Cabrero-Palomino D., Terrés-Rojas E., Arzate-Vázquez I. (2017). Physical and chemical characterization of a biopolymer film made with corn starch and nopal xocónstle (*Opuntia joconostle*) mucilage. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, 16(1), 147–158.
- Luciano Bruschi Marcos (2015). **Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems**. Woodhead Publishing Series in Biomedicine: Number 85, Elsevier Ltd.
- Marani P. L., Bloisi G. D., Petri D. F. S. (2015). Hydroxypropylmethyl cellulose films crosslinked with citric acid for control release of nicotine. **Cellulose**, 22(6), 3907–3918.
- Matricardi Pietro, Alhaique Franco, Coviello Tommasina (2016). **Polysaccharide Hydrogels Characterization and Biomedical Applications**. Taylor & Francis Group, LLC.
- Medina-Torres L., Brito-De La Fuente E., Torrestiana-Sanchez B., S. Alonso (2003). Mechanical properties of gels formed by mixtures of mucilage gum (*Opuntia ficus indica*) and carrageenans. **Carbohydrate Polymers**, 52:143–150.

- Medina-Torres L., Brito-De La Fuente E., Gómez-Aldapa C. A., Aragon-Piña A., Toro-Vazquez J. F. (2006). Structural characteristics of gels formed by mixtures of carrageenan and mucilage gum from *Opuntia ficus indica*. **Carbohydrate Polymers**, 63:299–309.
- Medina-Torres L., García-Cruz E. E., Calderas F. (2013). Microencapsulation by spray drying of gallic acid with nopal mucilage (*Opuntia ficus indica*). **LWT - Food Science and Technology** 50:642-650.
- Mishra B., Upadhyay M., Reddy Adena S. K., Vasant B. G., Muthu M. S. (2017). Hydrogels: An Introduction to a Controlled Drug Delivery Device, Synthesis and Application in Drug Delivery and Tissue Engineering. **Austin J Biomed Eng**, 4(4), 1037–1.
- Momoh F. U., Boateng J. S., Richardson S. C. W., Chowdhry, B. Z., Mitchell, J. C. (2015). Development and functional characterization of alginate dressing as potential protein delivery system for wound healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, 81, 137–150.
- Morgado P. I., Miguel S. P., Correia I. J., Aguiar-Ricardo A. (2017). Ibuprofen loaded PVA/chitosan membranes: A highly efficient strategy towards an improved skin wound healing. **Carbohydrate Polymers**, 159, 136–145.
- Mukherjee D., Azamthulla M., Santhosh S., Dath G., Ghosh A., Natholia R., Anbu J., Teja B. V., Muzammil K. M. (2018). Development and characterization of chitosan-based hydrogels as wound dressing materials. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, 46(February), 498–510.
- Narayan Bhattarai, Jonathan Gunn, Miqin Zhang (2010). Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews** 62:83–99.
- Nelson David L., Cox Michael M. (2013). **Lehninger Principles of Biochemistry**. W. H. Freeman and Company.
- Neufeld L., Bianco-Peled H. (2017). Pectin–chitosan physical hydrogels as potential drug delivery vehicles. **International Journal of Biological Macromolecules**, 101, 852–861.

- Ololade Olatunji (2016). **Natural Polymers: Industry Techniques and Applications**, Springer International Publishing.
- Pal K., Banthia A. K., Majumdar D. K. (2009). Polymeric hydrogels: Characterization and biomedical applications. **Designed Monomers and Polymers**, 12(3), 197–220.
- Pawar H. V., Tetteh J., Boateng J. S. (2013). Preparation, optimisation and characterisation of novel wound healing film dressings loaded with streptomycin and diclofenac. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** 102:102–110.
- Pichardo Peralta Dalia (2018). **Evaluación del efecto hipoglucemiante y nefroprotector de un extracto de cultivos celulares de *Buddleja cordata* en modelo murino de diabetes inducida** (Tesis). Universidad Autónoma del Estado de México.
- Rim Gheribi, Puchot Laura, Verge Pierre (2018). Development of plasticized edible films from *Opuntia ficus-indica* mucilage: A comparative study of various polyol plasticizers. **Carbohydrate Polymers** 190:204–211.
- Romero Rangel S., Aguilar Rodríguez S., Rojas Zenteno E. C. (2003). *Buddleja Cordata* H.B.K. Ssp. *Cordata* (*Buddlejaceae*): Propagación y anatomía de la madera. **Poli botánica**, 16:63-78.
- Saenz Carmen, Sepulveda Elena, Matsuhira Betty (2004). *Opuntia* spp mucilage's: a functional component with industrial perspectives. **Journal of Arid Environments** 57:275–290.
- Sarkar G., Saha N. R., Roy I., Bhattacharyya A., Bose M., Mishra R., Rana D., Bhattacharjee D., Chattopadhyay D. (2014). Taro corms mucilage/HPMC based transdermal patch: An efficient device for delivery of diltiazem hydrochloride. **International Journal of Biological Macromolecules**, 66, 158–165.
- Sepúlveda E., Sáenz C., Aliaga E., & Aceituno C. (2007). Extraction and characterization of mucilage in *Opuntia* spp. **Journal of Arid Environments**, 68(4), 534–545.

- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2021). **Estadística de Producción Agrícola** [Internet]. Disponible desde: <
<http://infosiap.siap.gob.mx/gobmx/datosAbiertos.php>> [Acceso 01 de febrero 2021].
- Skoog Douglas A., Holler F. James, Crouch Stanley R. (2018). **Principles of Instrumental Analysis**. Cengage Learning.
- Sougata Jana, Sabyasachi Maiti, Subrata Jana (2017). Biopolymer-Based Composites: Drug Delivery and Biomedical Applications. **Woodhead Publishing Series in Biomaterials**.
- Taiz Lincoln, Zeiger Eduardo (2002). **Plant Physiology**. Sinauer Associates.
- Vashist A., Ahmad H. (2013). Hydrogels: Smart materials for drug delivery. **Oriental Journal of Chemistry**, 29(3), 861–870.
- Vipul D. Prajapati, Girish K. Jani, Naresh G. Moradiya, Narayan P. Randeria (2013). Pharmaceutical applications of various natural gums, mucilages and their modified forms. **Carbohydrate Polymers**, 92:1685-1699.
- Wang Binghe, Hu Longqin, Siahaan Teruna (2016). **Drug delivery: principles and applications**. John Wiley & Sons, Inc.