



Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Farmacia- Programa de Magíster en Ciencias Farmacéuticas

**“Desarrollo de formulaciones cosméticas a base de extractos de  
hojas de *Ugni molinae* Turcz (Murtillo) enriquecidos con  
triterpenos de la especie, con efecto reductor del fibroedema geloides  
mucoso subcutáneo “Piel de naranja”**



Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Farmacéuticas

MAIRA CAROLINA CAMACHO BENALCÁZAR  
CONCEPCIÓN-CHILE  
2019

Profesor Guía: Marcia Andrea Avello Lorca  
Laboratorio de Farmacognosia  
Facultad de Farmacia  
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Laboratorio de Farmacognosia y de Tecnología Farmacéutica, del Departamento de Farmacia de la Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, con el apoyo de Nactive.

Profesor Guía

Dra. Marcia Avello Lorca  
Facultad de Farmacia  
Universidad de Concepción

Profesor Co-Guía



Dr. Marcos Fernández Escobar  
Facultad de Farmacia  
Universidad de Concepción

Evaluador externo

Dr. José Becerra Allende  
Facultad de Ciencias Naturales y  
Oceanográficas  
Universidad de Concepción

Director del programa

MSc. Sigrid Mennickent Cid  
Facultad de Farmacia  
Universidad de Concepción



### *Dedicatoria*

*A mis queridos sobrinos, que son el ejemplo más tangible del amor real, son mi empuje y sin lugar a dudas el regalo más preciado que me ha dado Dios.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Primero que todo al todopoderoso, que sin su ayuda nada habría podido ser posible. A mis padres Ítalo Camacho y Anatilde Benalcázar por su apoyo incondicional en cada una de mis metas planteadas.

Agradecer profundamente al Laboratorio de Productos Naturales y materias primas Nactive, especialmente al Sr. Jorge Sanhueza gerente del mismo; quien contribuyó financieramente para el desarrollo del proyecto.

A la profesora Marcia Avello por brindarme la oportunidad de trabajar junto a ella, darme herramientas y su apoyo incondicional, guiarme tanto en el ámbito docente como personal y sobre todo por confiar en mí y por alentarme a creer en mis capacidades.

A los profesores Marcos Fernández, Edgar Pastene y Carlos Escudero por ser una guía incondicional en el desarrollo de las diferentes metodologías empleadas para el desarrollo de este trabajo; sin lugar a dudas sin su aporte esto no sería lo mismo.

Al decano de la Facultad de Farmacia Ricardo Godoy, a la directora del programa de Magíster en Ciencias Farmacéuticas Sigríd Mennickent Cid y a todos los profesores del programa de Magíster en Ciencias Farmacéuticas de la Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, por los conocimientos compartidos durante mi formación, por la paciencia y confianza depositada en mí.

A la profesora Damaris Zapata y el profesor Daniel Gaete por la predisposición brindada y por su apoyo incondicional en el seguimiento de los avances de cada una de las voluntarias.

Al profesor Roberto Rodríguez del Departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción, por su colaboración en el aspecto taxonómico del material vegetal de la especie estudiada en este trabajo.

Al profesor Luis Bustamante del Departamento de Análisis Instrumental de la Facultad de Farmacia y al profesor Sergio Triviño del de departamento de Química de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas de la Universidad de Concepción, por la colaboración en el proceso de liofilización de los extractos.

A Lina Trujillo, Diana Correa, Jeniffer Torres, Kevin Ortiz, Vannesa Medina, Juan López, Daniel Sepúlveda, Paullete Bascuñan, Scarlett Concha y Paulina Contreras por la amistad y ayuda entregada durante todo el proceso.

Al Sr. Ivor Novoa laborante técnico del Laboratorio de Farmacognosia, por su apoyo incondicional en la realización de los diferentes ensayos.

A las secretarias Susana Alarcón y Fabiola Rioseco por la constante disponibilidad.

Finalmente a todas aquellas mujeres, que no dudaron en participar en este estudio. Definitivamente sin ustedes nada de esto habría sido posible.

## Contenido

LISTA DE TABLA.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xii
TABLA DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMEN.....	xix
Capítulo 1.....	1
Introducción y marco teórico.....	1
1.1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.2. FIBROEDEMA GELOIDE MUCOSO SUBCUTÁNEO (FGMS).....	5
1.2.1. Resumen.....	5
1.2.2. Generalidades.....	6
1.2.3. Etiología.....	7
- Factores tóxicos.....	10
- Factores mecánicos.....	13
- Factores vasculares.....	13
1.2.4. Fases de formación del fibroedema geloide mucoso subcutáneo.....	14
- Primera fase o grado 1.....	14
- Segunda fase o grado 2.....	14
- Tercera fase o grado 3.....	15
- Cuarta fase o grado 4.....	16
- Quinta fase o grado 5.....	16
1.2.5. Formas clínicas del fibroedema geloide mucoso subcutáneo.....	17
- Fibroedema geloide duro o limitado.....	17
- Fibroedema geloide blando o difuso.....	18
- Fibroedema geloide edematoso.....	18
1.2.6. Tratamientos.....	20
- Mesoterapia.....	21
- Carboxiterapia.....	22
- Presoterapia.....	22
- Cavitación.....	23
- Radiofrecuencia.....	23
- Ultrasonidos.....	24
- Electroestimulación.....	24
- Ozonoterapia.....	24

- Intralipoteraia .....	25
- Liposucción.....	25
- Lipoescultura.....	26
- Productos cosméticos .....	27
1.3. <i>Ugni molinae</i> Turcz (MURTILLA) .....	28
1.3.1. Clasificación taxonómica.....	29
1.3.2. Generalidades .....	29
1.3.3. Estudios previos .....	31
1.3.4. Productos con <i>Ugni molinae</i> .....	33
1.3.5. Fitoquímica y actividad biológica.....	34
1.3.6. Mecanismo de acción .....	38
Capítulo 2 .....	41
Hipótesis y objetivos .....	41
2.1. HIPÓTESIS.....	42
2.2. OBJETIVOS.....	43
2.2.1. General.....	43
2.2.2. Específicos.....	43
Capítulo 3 .....	45
Metodología.....	45
3.1. OBTENCIÓN MATERIAL VEGETAL.....	46
3.2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS.....	47
3.3. ANÁLISIS QUÍMICO.....	49
3.3.1. Identificación y cuantificación de Terpenos por HPLC.....	49
3.4. ENSAYOS <i>in vitro</i> .....	51
3.4.1. Evaluación de la actividad sobre membranas de glóbulos rojos de los extractos de <i>Ugni molinae</i> . .....	51
3.5. OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN TRITERPÉNICA DEL EXTRACTO SELECCIONADO POR TRUE MOVING BED (TMB) .....	53
3.6. OBTENCIÓN DE EXTRACTO ENRIQUECIDO CON LA FRACCIÓN TRITERPÉNICA.....	56
3.6.1. Estandarización de extractos enriquecidos .....	57
3.7. ELABORACIÓN DE FORMULACIONES .....	58
3.7.1. Materias primas para la elaboración de formulación tópica.....	58
3.8. ENSAYO <i>in vitro</i> DE LAS FORMULACIONES .....	61

3.8.1. Evaluación de la actividad sobre membranas de glóbulos rojos <i>in vitro</i> de las formulaciones .....	61
3.9. CONTROLES Y ESTUDIOS DE ESTABILIDAD .....	62
3.9.1. Características organolépticas .....	62
3.9.2. Control de pH .....	63
3.9.3. Control de viscosidad .....	63
3.9.4. Control de crecimiento microbiano .....	64
3.9.5. Recuento en placa .....	64
3.9.6. Marcadores químicos .....	66
3.9.7. Estudio de estabilidad acelerado .....	66
3.9.8. Estudio de estabilidad a tiempo real .....	67
3.10. ESTUDIO DE CESIÓN DE LA FORMULACIÓN .....	68
3.11. ESTUDIO PILOTO DE LA FORMULACIÓN .....	69
3.11.1. Reclutamiento de voluntarias y evaluación de los productos .....	69
3.11.2. Pruebas de reacciones alérgicas .....	71
3.11.3. Aplicación del gel con los extractos en voluntarias seleccionadas .....	71
3.11.4. Análisis de percepción de voluntarias .....	72
Capítulo 4 .....	73
Resultados .....	73
4.1. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS .....	74
4.2. ANÁLISIS POR TLC Y HPLC .....	75
4.3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD SOBRE MEMBRANAS DE GLÓBULOS ROJOS .....	81
4.4. OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN TERPÉNICA DEL EXTRACTO SELECCIONADO POR TRUE MOVING BED (TMB) .....	84
4.5. SELECCIÓN DE EXTRACTO ENRIQUECIDO CON LA FRACCIÓN TRITERPÉNICA, SEGÚN ACTIVIDAD EN ENSAYO <i>in vitro</i> .....	86
4.6. ESTANDARIZACIÓN DE EXTRACTOS .....	89
4.7. ELABORACIÓN DE FORMULACIONES .....	91
4.8. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD SOBRE MEMBRANAS DE GLÓBULOS ROJOS <i>in vitro</i> DE LAS FORMULACIONES .....	93
4.9. CONTROLES Y ESTUDIOS DE ESTABILIDAD .....	95
4.9.1. Características organolépticas .....	95
4.9.2. Control de pH .....	97
4.9.3. Control de viscosidad .....	99
4.9.4. Control de crecimiento microbiano .....	105

4.9.5. MARCADORES QUÍMICOS .....	107
4.10. ESTUDIO DE CESIÓN DE LA FORMULACIÓN .....	109
4.11. ESTUDIO PILOTO .....	110
4.11.1. Evaluación de la aplicación del gel por medio de sesión fotográfica .....	110
4.11.2. Análisis de encuestas .....	131
Capítulo 5 .....	149
Conclusiones .....	149
Capítulo 6 .....	153
Bibliografía .....	153
Capítulo 7 .....	157
Anexos.....	157



# LISTA DE TABLA

Tabla 1.1. Algunas formulaciones tópicas presentes en el mercado Chileno a base de <i>Ugni molinae</i> para tratamiento del Fibroedema Geloide Mucoso Subcutáneo.	33
Tabla 3.1 Sistemas de solventes utilizados para correr placa de TLC de extracto acuoso de <i>U. molinae</i> Fuente: Elaboración propia.	54
Tabla 4.1. Áreas bajo la curva de los distintos extractos de las tres regiones	76
Tabla 4.2. Porcentaje de hemólisis de los extractos de las distintas regiones	81
Tabla 4.3. Concentraciones de los triterpenos presentes en <i>U. molinae</i> de la región de la Araucanía, n=2	89
Tabla 4.4. Porcentaje de hemólisis de las diferentes formulaciones con extractos de <i>U. molinae</i> de la Araucanía. Los valores se expresan como media $\pm$ SEM. n = 3. Donde P= Placebo, EET= Extracto de <i>U. molinae</i> enriquecido con triterpenos, EETC= Extracto de <i>U. molinae</i> enriquecido con triterpenos y extracto de <i>Capsicum spp</i>	93
Tabla 4.5 Seguimientos de características organolépticas de las formulaciones en las diferentes condiciones, según el transcurso del tiempo. Donde P= Placebo, EET= Extracto de <i>U. molinae</i> enriquecido con triterpenos, EETC= Extracto de <i>U. molinae</i> enriquecido con triterpenos y extracto de <i>Capsicum spp</i> , EEN= Estudio de estabilidad en condiciones normales, EE1= Estudio de estabilidad acelerada en condiciones de T=30° HR=60% y EE2= Estudio de estabilidad acelerada en condiciones de T=40° HR=75%.	96
Tabla 4.6 Control microbiológico de formulaciones en condiciones normales ambientales. Donde EEN= Estudio de estabilidad en condiciones normales, P= Placebo, EET= Extracto de <i>U. molinae</i> enriquecido con triterpenos y EETC= Extracto de <i>U. molinae</i> enriquecido con triterpenos y <i>Capsicum spp</i> .	106
Tabla 4.7 Control microbiológico de formulaciones en condiciones aceleradas T=30° y HR=60%. Donde EE1= Estudio de estabilidad en condiciones de T=30° y HR= 60%, P= Placebo, EET= Extracto de <i>U. molinae</i> enriquecido con triterpenos y EETC= Extracto de <i>U. molinae</i> enriquecido con triterpenos y <i>Capsicum spp</i>	106
Tabla 4.8 Control microbiológico de formulaciones en condiciones aceleradas T=40° y HR=75%. Donde EE2= Estudio de estabilidad en condiciones de T=40° y HR= 75%, P= Placebo, EET= Extracto de <i>U. molinae</i> enriquecido con triterpenos y EETC= Extracto de <i>U. molinae</i> enriquecido con triterpenos y <i>Capsicum spp</i>	106
Tabla 4.9 Variación de la concentración de los triterpenos presentes en la formulaciones en condiciones de estabilidad aceleradas T=40° y HR= 75%. Donde P= Placebo, EET= Extracto de <i>U. molinae</i> enriquecido con triterpenos, EETC= Extracto de <i>U. molinae</i> enriquecido con triterpenos y extracto de <i>Capsicum spp</i>	107
Tabla 4.10 Resultado de 3 meses de tratamiento de voluntarias con la formulación placebo.	111
Tabla 4.11 Resultado de 3 meses de tratamiento de voluntarias con la formulación EET.	118
Tabla 4.12 Resultado de 3 meses de tratamiento de voluntarias con la formulación EETC. Donde EETC= Extracto de <i>U. molinae</i> enriquecido con triterpenos de la especie y <i>Capsicum spp</i> .	125
Tabla 7.1 Variación de pH en el transcurso del tiempo de las diferentes formulaciones en las diferentes condiciones de almacenamiento. Donde P= Placebo, EET= Extracto de <i>U. molinae</i>	

enriquecido con triterpenos, EETC= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos y extracto de *Capsicum spp*, EEN= Estudio de estabilidad en condiciones normales, EE1= Estudio de estabilidad acelerada en condiciones de T=30° HR=60% y EE2= Estudio de estabilidad acelerada en condiciones de T=45° HR=75%. 167

Tabla 7.2 Variación de viscosidad de la formulación P en el transcurso del estudio de estabilidad. Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM. n = 3. Unidades de Pa.s Donde P= Placebo, EE1= Estudio de estabilidad acelerada en condiciones de T=30° HR=60% y EE2= Estudio de estabilidad acelerada en condiciones de T=40° HR=75%. 168

Tabla 7.3 Variación de viscosidad de la formulación ET en el transcurso del estudio de estabilidad. Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM. n = 3. Unidades de Pa.s Donde EET= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos, EE1= Estudio de estabilidad acelerada en condiciones de T=30° HR=60% y EE2= Estudio de estabilidad acelerada en condiciones de T=40° HR=75%. 168

Tabla 7.4 Variación de viscosidad de la formulación ETC en el transcurso del estudio de estabilidad. Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM. n = 3. Unidades de Pa.s. Donde EETC= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos y extracto de *Capsicum spp*, EE1= Estudio de estabilidad acelerada en condiciones de T=30° HR=60% y EE2= Estudio de estabilidad acelerada en condiciones de T=40° HR=75%. 169



# LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Fibroedema geloide mucoso subcutáneo (“Equipo para clínicas y Spa,” 2017).	5
Figura 1.2 Disposición de adipocitos en hombres y mujeres (“Cuidarte BIO,” 2017)	7
Figura 1.3 <i>U. molinae</i> Turcz (INIA, 2016)	28
Figura 1.4. Triterpenos representativos de <i>Ugni molinae</i> . (Queupil Carrasco, 2011)	36
Figura 3.1 Sistema de cromatografía en contracorriente en lecho móvil verdadero (True Moving Bed, TMB) para la separación de dos componentes A y B. (“AlphaCrom,” n.d.)	55
Figura 3.2 Esquema de procedimiento empleado para la elaboración de las formulaciones Fuente: Elaboración propia	60
Figura 4.1. Proceso de obtención de extractos de <i>U. molinae</i> de las regiones Biobío, Araucanía y Los Lagos. n=2.	74
Figura 4.2. TLC de las fracciones obtenidas por TMB en 2 sistemas de solvente 1. Butanol, Acetato de Etilo, Amoniaco y agua (6:4:0,5:1), 2. Hexano, Acetato de etilo, Metanol y agua (5:2:5:2), revelador paranisaldehido sulfúrico.	75
Figura 4.3. Cromatograma de estándar de Ácido asiático	77
Figura 4.4. Cromatograma de extracto hidroalcohólico de la región del Biobío	78
Figura 4.5. Cromatograma de extracto hidroalcohólico de la región de la Araucanía	78
Figura 4.6. Cromatograma de extracto hidroalcohólico de la región de Los Lagos	78
Figura 4.7 Concentración de terpenos en extractos con diferente % de material vegetal equivalentes a mg/mL de Acido Asiático. Los valores se expresan como media $\pm$ SEM. n = 3.	79
Figura 4.8 Concentración de terpenos en extractos por regiones, con diferente % de material vegetal equivalentes a mg/mL de Acido Asiático. Los valores se expresan como media $\pm$ SEM. n = 3. Donde 8 <sup>va</sup> corresponde a la región del Biobío, 9 <sup>na</sup> a la región de la Araucanía y 10 <sup>ma</sup> a la región de los Lagos.	80
Figura 4.9 Porcentaje de hemólisis de los extractos de las distintas regiones. Los valores se expresan como media $\pm$ SEM. n = 3.	82
Figura 4.10. Placa de TLC con diferentes proporciones de solventes descritos en la tabla 3.1 de extracto de <i>U. molinae</i> , (revelado con paranisaldehido sulfúrico).	85
Figura 4.11 Porcentaje de hemólisis de los extractos de <i>U. molinae</i> con la adición de distintas especies vegetales. Los valores se expresan como media $\pm$ SEM. n = 3. Donde EM= Extracto de <i>U. molinae</i> , EET= Extracto de <i>U. molinae</i> enriquecido con triterpenos, EC=Extracto de <i>Capsicum spp</i> .	87
Figura 4.12. Formulaciones con extractos de <i>U. molinae</i> con la adición de distintas especies vegetales. Donde P corresponde a la Formulación Placebo, EET: Formulación de extracto de <i>U. molinae</i> enriquecida con triterpenos y EETC: Formulación de de extracto de <i>U. molinae</i> enriquecida con triterpenos y extracto de <i>Capsicum spp</i>	91
Figura 4.13 Variación de pH de las formulaciones en el transcurso del tiempo en condiciones normales. n=3. Donde P= Placebo, EET= Extracto de <i>U. molinae</i> enriquecido con triterpenos, EETC= Extracto de <i>U. molinae</i> enriquecido con triterpenos y extracto de <i>Capsicum spp</i> , EEN= Estudio de estabilidad en condiciones normales.	97
Figura 4.14 Variación de pH de las formulaciones en el transcurso del tiempo en condiciones aceleradas T= 30 <sup>o</sup> HR= 60%. n=3. Donde P= Placebo, EET= Extracto de <i>U. molinae</i> enriquecido	

con triterpenos, EETC= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos y extracto de *Capsicum spp* y EE1= Estudio de estabilidad acelerada en condiciones de T=30° HR=60% 98

Figura 4.15 Variación de pH de las formulaciones en el transcurso del tiempo en condiciones aceleradas T= 40° HR= 75%. n=3. Donde P= Placebo, EET= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos, EETC= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos y extracto de *Capsicum spp* y EE2= Estudio de estabilidad acelerada en condiciones de T=40° HR=75%. 98

Figura 4.16 Variación de viscosidad de las formulaciones en el transcurso del tiempo en condiciones aceleradas a 5rpm T= 30° HR= 60%. Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM. n = 3. Donde P= Placebo, EET= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos, EETC= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos y extracto de *Capsicum spp* y EE1= Estudio de estabilidad acelerada en condiciones de T=30° HR=60% 100

Figura 4.17 Variación de viscosidad de las formulaciones en el transcurso del tiempo en condiciones aceleradas a 10 rpm T= 30° HR= 60%. Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM. n = 3. Donde P= Placebo, EET= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos, EETC= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos y extracto de *Capsicum spp* y EE1= Estudio de estabilidad acelerada en condiciones de T=30° HR=60%. 101

Figura 4.18 Variación de viscosidad de las formulaciones en el transcurso del tiempo en condiciones aceleradas a 20 rpm T= 30° HR= 60%. Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM. n = 3. Donde P= Placebo, EET= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos, EETC= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos y extracto de *Capsicum spp* y EE1= Estudio de estabilidad acelerada en condiciones de T=30° HR=60%. 101

Figura 4.19 Variación de viscosidad de las formulaciones en el transcurso del tiempo en condiciones aceleradas a 50 rpm T= 30° HR= 60%. Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM. n = 3. Donde P= Placebo, EET= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos, EETC= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos y extracto de *Capsicum spp* y EE1= Estudio de estabilidad acelerada en condiciones de T=30° HR=60%. 102

Figura 4.20 Variación de viscosidad de las formulaciones en el transcurso del tiempo en condiciones aceleradas a 5 rpm T= 40° HR= 75%. Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM. n = 3. Donde P= Placebo, EET= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos, EETC= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos y extracto de *Capsicum spp* y EE2= Estudio de estabilidad acelerada en condiciones de T=40° HR=75%. 102

Figura 4.21 Variación de viscosidad de las formulaciones en el transcurso del tiempo en condiciones aceleradas a 10 rpm T= 40° HR= 75%. Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM. Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM. n = 3. Donde P= Placebo, EET= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos, EETC= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos y extracto de *Capsicum spp* y EE2= Estudio de estabilidad acelerada en condiciones de T=40° HR=75%. 103

Figura 4.22 Variación de viscosidad de las formulaciones en el transcurso del tiempo en condiciones aceleradas a 20 rpm T= 40° HR= 75%. Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM. n = 3. Donde P= Placebo, EET= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos, EETC= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos y extracto de *Capsicum spp* y EE2= Estudio de estabilidad acelerada en condiciones de T=40° HR=75%. 103

Figura 4.23 . Variación de viscosidad de las formulaciones en el transcurso del tiempo en condiciones aceleradas a 50 rpm T= 40° HR= 75%. Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM. n = 3. Donde P= Placebo, EET= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos,

EETC= Extracto de <i>U. molinae</i> enriquecido con triterpenos y extracto de <i>Capsicum spp</i> y EE2= Estudio de estabilidad acelerada en condiciones de T=40° HR=75%.	104
Figura 4.24. Recuento en placa de aerobios mesófilos de las diferentes formulaciones.	105
Figura 4.25. Evolución del tratamiento de la formulación P del mes 0 al 3 de la voluntaria 1.	112
Figura 4.26. Evolución del tratamiento de la formulación P del mes 0 al 3 de la voluntaria 2.	112
Figura 4.27. Evolución del tratamiento de la formulación P del mes 0 al 3 de la voluntaria 3.	113
Figura 4.28. Evolución del tratamiento de la formulación P del mes 0 al 3 de la voluntaria 4.	113
Figura 4.29. Evolución del tratamiento de la formulación P del mes 0 al 3 de la voluntaria 5.	114
Figura 4.30. Evolución del tratamiento de la formulación P del mes 0 al 3 de la voluntaria 6.	114
Figura 4.31. Evolución del tratamiento de la formulación P del mes 0 al 3 de la voluntaria 7.	115
Figura 4.32. Evolución del tratamiento de la formulación P del mes 0 al 3 de la voluntaria 8.	115
Figura 4.33. Evolución del tratamiento de la formulación P del mes 0 al 3 de la voluntaria 9.	116
Figura 4.34. Evolución del tratamiento de la formulación P del mes 0 al 3 de la voluntaria 10.	116
Figura 4.35. Evolución del tratamiento de la formulación EET del mes 0 al 3 de la voluntaria 1.	119
Figura 4.36. Evolución del tratamiento de la formulación EET del mes 0 al 3 de la voluntaria 2.	119
Figura 4.37. Evolución del tratamiento de la formulación EET del mes 0 al 3 de la voluntaria 3.	120
Figura 4.38. Evolución del tratamiento de la formulación EET del mes 0 al 3 de la voluntaria 4.	120
Figura 4.39. Evolución del tratamiento de la formulación EET del mes 0 al 3 de la voluntaria 5.	121
Figura 4.40. Evolución del tratamiento de la formulación EET del mes 0 al 3 de la voluntaria 6.	121
Figura 4.41. Evolución del tratamiento de la formulación EET del mes 0 al 3 de la voluntaria 7.	122
Figura 4.42. Evolución del tratamiento de la formulación EET del mes 0 al 3 de la voluntaria 8.	122
Figura 4.43. Evolución del tratamiento de la formulación EET del mes 0 al 3 de la voluntaria 9.	123
Figura 4.44. Evolución del tratamiento de la formulación EET del mes 0 al 3 de la voluntaria 10.	123
Figura 4.45. Evolución del tratamiento de la formulación EETC del mes 0 al 3 de la voluntaria 1.	126

Figura 4.46. Evolución del tratamiento de la formulación EETC del mes 0 al 3 de la voluntaria 2.	126
Figura 4.47. Evolución del tratamiento de la formulación EETC del mes 0 al 3 de la voluntaria 3.	127
Figura 4.48. Evolución del tratamiento de la formulación EETC del mes 0 al 3 de la voluntaria 4.	127
Figura 4.49. Evolución del tratamiento de la formulación EETC del mes 0 al 3 de la voluntaria 5.	128
Figura 4.50. Evolución del tratamiento de la formulación EETC del mes 0 al 3 de la voluntaria 6.	128
Figura 4.51. Evolución del tratamiento de la formulación EETC del mes 0 al 3 de la voluntaria 7.	129
Figura 4.52. Evolución del tratamiento de la formulación EETC del mes 0 al 3 de la voluntaria 8.	129
Figura 4.53. Evolución del tratamiento de la formulación EETC del mes 0 al 3 de la voluntaria 9.	130
Figura 4.54 Percepción de voluntarias de la Formulación P. Donde P=Placebo, MD= Muy de acuerdo, DA= De acuerdo, NA-ND= ni de acuerdo, ni en desacuerdo, ED= En desacuerdo y MDD= Muy en desacuerdo.	132
Figura 4.55 Percepción de voluntarias de la Formulación EET. Donde EET= Extracto de U. molinae enriquecido con triterpenos de la especie, MD= Muy de acuerdo, DA= De acuerdo, NA-ND= ni de acuerdo, ni en desacuerdo, ED= En desacuerdo y MDD= Muy en desacuerdo.	133
Figura 4.56 Percepción de voluntarias de la Formulación EETC. Donde EETC= Extracto de U. molinae enriquecido con triterpenos de la especie y Capsicum spp, MD= Muy de acuerdo, DA= De acuerdo, NA-ND= ni de acuerdo, ni en desacuerdo, ED= En desacuerdo y MD= Muy en desacuerdo.	133
Figura 4.57 Percepción de voluntarias sobre sensaciones de la Formulación P. Donde P= Placebo MD= Muy de acuerdo, DA= De acuerdo, NA-ND= ni de acuerdo, ni en desacuerdo, ED= En desacuerdo y MDD= Muy en desacuerdo.	134
Figura 4.58 Percepción de voluntarias sobre sensaciones de la Formulación EET. Donde EET= Extracto de U. molinae enriquecido con triterpenos de la especie, MD= Muy de acuerdo, DA= De acuerdo, NA-ND= ni de acuerdo, ni en desacuerdo, ED= En desacuerdo y MD= Muy en desacuerdo y MDD= Muy en desacuerdo.	135
Figura 4.59 Percepción de voluntarias sobre sensaciones de la Formulación EETC. Donde EETC= Extracto de U. molinae enriquecido con triterpenos de la especie y Capsicum spp, MD= Muy de acuerdo, DA= De acuerdo, NA-ND= ni de acuerdo, ni en desacuerdo, ED= En desacuerdo y MDD= Muy en desacuerdo.	135
Figura 4.60 Percepción de voluntarias sobre características del gel de la Formulación P. Donde P= Placebo, MD= Muy de acuerdo, DA= De acuerdo, NA-ND= ni de acuerdo, ni en desacuerdo, ED= En desacuerdo y MDD= Muy en desacuerdo.	136
Figura 4.61 Percepción de voluntarias sobre características del gel de la Formulación EET. Donde EET= Extracto de U. molinae enriquecido con triterpenos de la, MD= Muy de acuerdo, DA= De acuerdo, NA-ND= ni de acuerdo, ni en desacuerdo, ED= En desacuerdo y MDD= Muy en desacuerdo.	136

Figura 4.62 Percepción de voluntarias sobre características del gel de la Formulación EETC. Donde EETC= Extracto de U. molinae enriquecido con triterpenos de la especie y Capsicum spp, MD= Muy de acuerdo, DA= De acuerdo, NA-ND= ni de acuerdo, ni en desacuerdo, ED= En desacuerdo y MDD= Muy en desacuerdo	137
Figura 4.63 Percepción de voluntarias sobre posible adquisición de la Formulación P. Donde P= Placebo, SS=Seguro que sí, PS=Probablemente sí, PS-PN= Puede que sí, puede que no, PN= Probablemente no y SN= Seguro que no.	137
Figura 4.64 Percepción de voluntarias sobre posible adquisición de la Formulación EET. Donde EET= Extracto de U. molinae enriquecido con triterpenos de la especie, SS=Seguro que sí, PS=Probablemente sí, PS-PN= Puede que sí, puede que no, PN= Probablemente no y SN= Seguro que no	138
Figura 4.65 Percepción de voluntarias sobre posible adquisición de la Formulación EETC. Donde EETC= Extracto de U. molinae enriquecido con triterpenos de la especie y Capsicum spp, SS=Seguro que sí, PS=Probablemente sí, PS-PN= Puede que sí, puede que no, PN= Probablemente no y SN= seguro que no	138
Figura 4.66 Percepción de voluntarias sobre posible costo del gel de la Formulación P. Valores expresados en pesos chilenos. Donde P= Placebo	139
Figura 4.67 Percepción de voluntarias sobre posible costo del gel de la Formulación EET. Valores expresados en pesos chilenos. Donde EET= Extracto de U. molinae enriquecido con triterpenos de la especie.	139
Figura 4.68 Percepción de voluntarias sobre posible costo del gel de la Formulación EETC. Valores expresados en pesos chilenos. Donde EETC= Extracto de U. molinae enriquecido con triterpenos de la especie y Capsicum spp.	140
Figura 4.69 Percepción de voluntarias sobre protocolo de uso del gel de la Formulación P. Donde P= Placebo	140
Figura 4.70 Percepción de voluntarias sobre protocolo de uso del gel de la Formulación EET. Donde EET= Extracto de U. molinae enriquecido con triterpenos de la especie.	141
Figura 4.71 Percepción de voluntarias sobre protocolo de uso del gel de la Formulación EETC. Donde EETC= Extracto de U. molinae enriquecido con triterpenos de la especie y Capsicum spp.	141
Figura 4.72 Percepción de tiempo de efecto del producto por parte de las voluntarias de la formulación P. Donde P= Placebo	143
Figura 4.73 Percepción de tiempo de efecto del producto por parte de las voluntarias de la formulación EET. Donde EET= Extracto de U. molinae enriquecido con triterpenos.	144
Figura 4.74 Percepción de tiempo de efecto del producto por parte de las voluntarias de la formulación EET. Donde EET= Extracto de U. molinae enriquecido con triterpenos y Capsicum spp.	145

# TABLA DE ABREVIATURAS

AA	Acido Asiático
CsP	Agua
DA	De acuerdo
EC	Extracto de <i>Capsicum sp</i>
ED	En desacuerdo
EE	Estudio de estabilidad
EE1	Estudio de estabilidad acelerado T: 30° HR: 60%
EE2	Estudio de estabilidad acelerado T: 40° HR: 75%
EEN	Estudio de estabilidad en condiciones normales
EET	Extracto de <i>Ugni molinae</i> (1%) enriquecido con triterpenos (0,25%)
EETC	Extracto de <i>Ugni molinae</i> enriquecido con triterpenos + extracto de <i>Capsicum</i>
Eqq AA	Equivalente a ácido asiático
FG	Fibroedema geloide
FGMS	Fibroedema geloide mucoso subcutáneo
FT	Fracción triterpénica
GR	Glóbulos rojos
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-piperacín-1-il-etanosulfónico
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
MD	Muy de acuerdo
MDD	Muy en desacuerdo
NA-ND	Ni de acuerdo, ni en desacuerdo
P	Placebo
PAS	p-anisaldehído-sulfúrico
PBS	Solución buffer fosfato
PN	Probablemente no
PS	Probablemente sí
PS-PN	Puede que sí, puede que no

SMAD	Proteína que actúa como factor de transcripción
SN	Seguro que no.
SS	Seguro que sí
TEA	Trietanolamina
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante- $\beta$
TLC	Cromatografía en capa fina
TMB	True Moving Bed



# RESUMEN

La presente investigación tiene como objetivo desarrollar formulaciones cosméticas a base de extractos hidrofílicos de hojas de *Ugni molinae* Turcz(Murtilla) enriquecidos con triterpenos de la especie, con efecto reductor del fibroedema geloide mucoso subcutáneo (piel de naranja) grado 3.

Se realizó un análisis taxonómico a la planta, en la droga cruda se identificaron cuantitativamente los compuestos químicos de la especie botánica ejecutando un tamizaje fitoquímico a los extractos obtenidos por maceración. El presente proyecto es innovador e interesante puesto que los extractos se fraccionaron por cromatografía en contracorriente verdadera (True Moving Bed, TMB), para extraer los compuestos triterpénicos presuntos responsables del efecto dermocosmético, lo que sin lugar a dudas crea un valor agregado en el producto. Los extractos originales fueron enriquecidos con diferentes porcentajes de la fracción triterpénica obtenida por TMB con el fin de potenciar su efecto, además dichos extractos también fueron enriquecidos con extractos de otra fuente vegetal que ya ha demostrado su efecto para disminuir el FGMS. Estos extractos fueron incluidos en bases cosméticas las que fueron caracterizadas fisicoquímicamente y sometidas a estudios biológicos *in vitro* y en humanos para evaluar su efectividad y seguridad. Finalmente, fueron seleccionados los extractos y formulaciones más activas y seguras.

# **Capítulo 1 .**

## **Introducción y marco teórico**



## 1.1. INTRODUCCIÓN

El término "celulitis" fue utilizado por primera vez en la década de 1920, para describir un cambio estético de la superficie cutánea. Desde entonces algunos términos se utilizan para designarla, en el intento de adecuar el nombre a las características histomorfológicas encontradas: lipodistrofia localizada, fibroedema geloide, hidrolipodistrofia gingival, paniculopatía edemato-fibroesclerótica y paniculosa, lipoesclerosis nodular, lipodistrofia gynoide entre otras. Sin embargo, la denominación fibroedema geloide (FG) se ha demostrado como el concepto más adecuado para describirla. (Pires, Arrieiro, & Xavier, 2004) (Rosales Ricardo, 2014)

En la actualidad existe una gran variedad de tratamientos del FGMS entre ellos formulaciones tópicas. Muchos de los compuestos activos utilizados en estas formulaciones son de origen vegetal, teniendo acción sobre inflamación, edema y/o acumulación de grasas. (Josefina de Peña, 2005)

Entre los activos utilizados se encuentran también extractos de hojas de *Ugni molinae* Turcz (Murtilla o Murta), que pertenece a la familia *Myrtaceae*. Es un arbusto siempre verde nativo de Chile que se distribuye desde el sur de Talca (VII Región) a Río Palena (XI Región). La medicina popular le atribuye diversas propiedades tales como aromática, astringente, estimulante, alivia dolencias de la vía urinaria, entre otras. Los usos tradicionales de esta especie se basan en la utilización de infusiones de hojas para el tratamiento de infecciones urinarias y enfermedades de la garganta y los frutos, por su poder astringente. (Fredes, 2009) (Peredo Sandoval, 2008)



Las hojas de *Ugni molinae* son utilizadas por la industria dermocosmética como regeneradora de la piel y neutralizadora del estrés oxidativo. Estudios previos realizados en los laboratorios de la Universidad de Chile han demostraron que las hojas de esta especie son una rica fuente de triterpenoides pentacíclicos derivados de los núcleos ursano, oleanano y lupano, a los cuales tanto en la literatura como estudios realizados en el laboratorio han establecido que poseen propiedades analgésicas, antiinflamatorias, antioxidantes, antimicrobianas, cicatrizantes e hipoglicemiantes. Se demostró que estas propiedades farmacológicas se

deben a la presencia de triterpenos (saponinas) y de flavonoides. Entre los triterpenos figura el ácido asiático, el ácido corosólico, y el ácido alfitólico. (Goity, 2012) (Peredo Sandoval, 2008) (Ahumada, Ortega, Chito, & Benítez, 2016) (López Luengo, 2001).

Nuestro interés se centra en incorporar extractos de *U. molinae* enriquecidos con triterpenos y otros activos lipolíticos en formulaciones cosméticas, estandarizarlos y evaluar la capacidad de los mismos para disminuir el FGMS por medio de estudios *in vitro* y en humanos, para garantizar su seguridad y eficacia.



## 1.2. FIBROEDEMA GELOIDE MUCOSO SUBCUTÁNEO (FGMS)

### 1.2.1. Resumen

En este capítulo, con respecto al fibroedema geloide mucoso subcutáneo, se muestra la conceptualización, etiología y clasificación desde varios puntos de vista del fibroedema mucoso geloide subcutáneo comúnmente conocido como FGMS. Además, se incluyen posibles tratamientos que se utilizan hoy en el mercado para controlar y mitigar esta problemática. En la figura 1.1 se evidencia como se presenta a nivel cutáneo el FGMS.

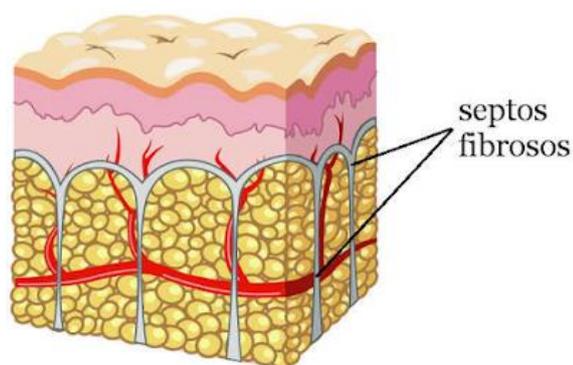


Figura 1.1 Fibroedema geloide mucoso subcutáneo ("Equipo para clínicas y Spa," 2017).

### 1.2.2. Generalidades

El FGMS es un problema estético principalmente femenino: 85-98 % de las mujeres tiene algún grado de FGMS después de la pubertad, sin embargo son más evidentes en mujeres mayores de 30 años; independientemente de su peso, pues la producción de estrógenos y un tejido conjuntivo más blando y flexible que en el hombre, facilita una predisposición a acumular tejido adiposo y líquidos en los muslos y caderas que dan el aspecto de «Piel de naranja». También ocurre en otros dos momentos importantes de cambios hormonales: la menopausia y el embarazo. (Pires, Arrieiro, & Xavier, 2004) (Rosales Ricardo, 2014) (Sandoval, 2003)

Los hombres rara vez presentan FGMS debido a que sus depósitos adiposos se estructuran diferente como se aprecia en la figura 1.2, en las mujeres los depósitos de grasa están localizados por debajo de la piel en compartimentos separados por tejido conjuntivo, cuando las células grasas crecen debido al incremento en los depósitos de lípidos, los compartimentos crecen mientras que los tabiques de tejido conectivo

permanecen igual, causando la apariencia característica del fibroedema geloide mucoso subcutáneo. (Josefina de Peña, 2005).

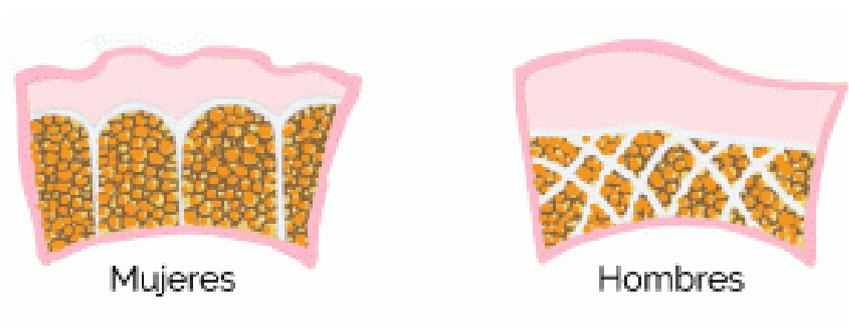


Figura 1.2 Disposición de adipocitos en hombres y mujeres ("Cuidarte BIO," 2017)



### 1.2.3. Etiología

En la etiología del fibroedema geloide mucoso subcutáneo intervienen varios factores tales como:

- **Factores genéticos**

Existe una predisposición a la obesidad y al FGMS en personas con antecedentes familiares de trastornos de ese tipo. Sin embargo, no se puede echar la culpa únicamente a los genes. La forma de vida y los

hábitos alimenticios tienen mucho más que ver con el desarrollo del problema.

- **Factores endocrinos**

En la formación de la FGMS influyen las hormonas sexuales, que son las que determinan el reparto diferente de células grasas entre hombres y mujeres; a ellos les aportan más cantidad de músculo, y a las mujeres, lamentablemente, de grasa.

También es significativo el hecho de que la frecuencia de la aparición del problema está ligado a “cambios hormonales”: pubertad, embarazo, menopausia, ingestión de anticonceptivos.

Por otra parte, es conocida la intervención de las hormonas sexuales en la distribución de la grasa corporal: los andrógenos son responsables de la disminución del número y volumen de los adipocitos en el hombre y los estrógenos tienen una acción favorecedora del aumento del número y volumen de los adipocitos en la mujer.

Todos estos hechos constituyen indicios claros de la participación hormonal en la FGMS. Sin embargo, cuando se explora el equilibrio hormonal de las mujeres que la poseen, raramente se encuentran anomalías significativas.

Esto hace pensar que, probablemente, la causa no radica en una producción alterada de hormonas sexuales, sino que se trata de una alteración periférica a consecuencia de la cual se produce una desviación de las hormonas sexuales femeninas respecto a sus receptores habituales (ovarios, útero, vagina, entre otros.), lo que originaría una respuesta anormal a nivel del tejido conjuntivo y de los adipocitos.

- **Factores neurodegenerativos**

El cuerpo humano responde al estrés liberando determinados productos químicos (hormonales del estrés o catecolaminas) en la corriente sanguínea. Es frecuente la asociación de FGMS con la existencia de un trasfondo de ansiedad, estrés y depresión. Además, las catecolaminas intervienen en el metabolismo lipídico, en la distribución del tejido adiposo y, lo que es más importante, en la regulación del equilibrio del

agua en el cuerpo. Por eso, en situaciones de estrés se retienen líquidos, y la retención de líquidos conduce a la primera fase de la FGMS, que es el edema.

#### - **Factores tóxicos**

Existe una relación entre la existencia de hábitos tóxicos (alcohol, café, tabaco, entre otros.) y el FGMS. Porque el alcohol tiene una acción muy directa sobre los vasos al ser un agente dilatador por excelencia. Y algo que se quiere evitar es, justamente, la salida de líquidos, que provocaría vasodilatación, agravando la formación del edema.

Fumar, consumir alcohol en exceso, la cafeína, el estrés y el estreñimiento aumentan la carga corporal de sustancias oxidantes.

Las dietas ricas en grasa contribuyen a la acumulación de radicales libres en el cuerpo. Estos se forman constantemente como un coproducto natural de nuestra actividad química.

Los radicales libres atacan generalmente al colágeno, componente principal del tejido conectivo y estructura del apoyo básico de la piel, provocando la degeneración y, por tanto, el envejecimiento prematuro. Pero algo tan aparentemente simple como tomar el sol también provoca un aumento de los radicales libres.

- **Factores de alimentación y modo de vida**

Los hábitos desordenados de alimentación y otros abusos en la dieta crean, con el paso del tiempo, desequilibrios a nivel celular y se establece una cadena de reacciones que contribuyen a la aparición del FGMS. El exceso de sal, por ejemplo, contribuye al aumento del edema.

Por otro lado, la falta de ejercicio físico favorece, sin duda, la aparición de la FGMS, pues, cuando los músculos no se ejercitan con regularidad, se vuelven flácidos. Generalmente, el FGMS se desarrolla en las áreas en que los músculos están infrautilizados, como es el caso de las caderas y los glúteos.

Las proteínas proporcionan los materiales que sirven para la formación y reparación de los tejidos del organismo. Constituyen la base de todos nuestros tejidos, órganos y músculos. Una dieta pobre en proteínas provoca una retención de líquidos y favorece la formación de edemas. Las proteínas, en cantidad suficiente, impiden la acumulación de agua en los tejidos. Además, el aporte de frutas y vegetales es inestimable, pues ayudan a limpiar, desintoxicar y revitalizar el organismo.

Está demostrado que la sal contribuye a la retención de líquidos, por ende el exceso de la misma favorece la formación de FGMS. La cantidad de sal necesaria para el buen funcionamiento del organismo está contenida en proporción suficiente en los alimentos que ingerimos habitualmente. Además, una alimentación rica en potasio ayuda a que las células capten oxígeno y nutrientes, eliminen los desechos y hasta se reparen. La calidad de la linfa depende en gran medida del potasio. Los vegetales ricos en potasio aumentan su concentración cociéndolos al vapor.

- **Factores mecánicos**

Hay asociación de FGMS con determinadas alteraciones del esqueleto como, por ejemplo, pies planos, hiperlordosis lumbar (que es una alteración de la dinámica de la columna vertebral) y genu valgus o piernas en equis, debido a que las rodillas se juntan y los pies se separan.

- **Factores vasculares**



El empleo de ropa muy ceñida puede ser otra causa de problemas circulatorios que favorezcan la aparición del FGMS. La ropa ceñida comprime la parte superior del muslo, frenando la circulación venosa pelviana. (Sanchez, 2011) (Madrigal, 1995)

#### **1.2.4. Fases de formación del fibroedema geloide mucoso subcutáneo**

Hay cinco fases en la formación del FGMS, o más bien en las etapas en que se produce la desestructuración del tejido subcutáneo que da lugar a la formación de la FGMS.

##### **- Primera fase o grado 1**



No tiene una manifestación clínica, por lo que es prácticamente imposible diagnosticarla. Se caracteriza por una desaceleración de la microcirculación venosa y linfática. Los vasos se dilatan y la sangre permanece en ellos más tiempo de lo habitual. Prácticamente no es visible, se debe apretar mucho la zona para que se vean los hoyuelos.

##### **- Segunda fase o grado 2**

Debido a la persistencia de la estasis sanguínea y de la vasodilatación, la pared de los pequeños vasos venosos y linfáticos se hace más permeable, y deja salir líquido al exterior. Es lo que se denomina edematización del

tejido conjuntivo. Este líquido es muy rico en electrolitos (fundamentalmente sodio) y en mucopolisacáridos. El fibroedema geloide mucoso subcutáneo es visible a simple vista si aprietas la zona afectada.

- **Tercera fase o grado 3**

Esta inundación conlleva una serie de reacciones químicas, ya que estas sustancias extrañas crean un compromiso de presiones al ocupar un espacio que no es el apropiado, y dificultan todavía más la nutrición correcta de las células grasas que hay a su alrededor. Es lo que se denomina fenómeno de hiperpolimerización de los mucopolisacáridos, en el que se da una transformación del líquido seroso en una sustancia geloide, más densa, que entorpece más los intercambios de nutrientes entre los vasos y las células adipocitarias. Estas células, al no poder verter sus metabolitos al torrente microcirculatorio, se hipertrofian y aumentan considerablemente de tamaño. Pueden llegar, incluso, a romperse y verter al exterior su contenido graso y tóxico. Para verla no es necesario apretar la zona, se percibe estando parada frente a un espejo. Sin embargo si estás acostada sin apretar no se percibe.

- **Cuarta fase o grado 4**

Después de algunos meses se produce un fenómeno de proliferación fibrosa en el que la sustancia fibrosa de la dermis y la hipodermis se organiza en fibrillas translúcidas, hinchadas y turgentes. Forman auténticas redes que engloban a todos los elementos: células grasas, vasos venosos, linfáticos y nervios, y dificultan todavía más los intercambios nutricionales entre los vasos y las células. La compresión de las terminaciones nerviosas se manifestará en forma de dolor, mientras que la compresión de los adipocitos da lugar a la apariencia de acolchado típica. En algunos casos doloroso y siempre está acompañada de excesiva retención de líquidos y edemas. El fibroedema geloide mucoso subcutáneo se percibe incluso estando acostada sin contraer la musculatura ni apretar la zona.

- **Quinta fase o grado 5**

La evolución de la fase anterior se traduce en una auténtica fibrosis o esclerosis cicatricial que comprime las células, los vasos venosos, los

linfáticos y los nervios, y se organiza en forma de micronódulos que, al unirse entre sí, da lugar a los macronódulos que a veces podemos palpar en las zonas afectadas. Parte de estas mallas forman las ondulaciones características que denominamos “FGMS”.

Está totalmente demostrado que el principal problema de la génesis del fibroedema geloide mucoso subcutáneo es la alteración microcirculatoria, por lo que el tratamiento no se tendrá que dirigir solamente a actuar sobre el componente graso. (Sandoval, 2003)



### **1.2.5. Formas clínicas del fibroedema geloide mucoso subcutáneo**

#### **- Fibroedema geloide duro o limitado**

La piel presenta un engrosamiento muy acentuado y un aumento de los tejidos superficiales. Por ser dura, está limitada, ocupa menos espacio y la mayoría de las veces no lleva consigo grandes transformaciones de la región afectada, de modo que en general esta forma es bien tolerada estéticamente.

- **Fibroedema geloide blando o difuso**

Es la forma de fibroedema geloide más frecuente, lleva consigo problemas psicológicos más acentuados por razones estéticas debido a la forma de presentación. Este tipo afecta al cuerpo en general. El diagnóstico generalmente se hace por inspección visual. Modifica la anatomía normal provocando una gran deformación de la región pélvica, la piel llega a tener un espesor de 5 a 8 centímetros. En posición erecta se observan las clásicas «almohadillas», aunque a la palpación además de confirmarse la blandura del tejido, se nota también bajo los dedos la presencia de pequeños nódulos duros.

- **Fibroedema geloide edematoso**

Esta forma es más grave pero menos frecuente. Generalmente este tipo es acompañado de obesidad. Se observa piel lustrosa y fenómenos atróficos que muestran sufrimiento de las capas dermoepidérmicas, el infiltrado es más duro; esta característica se debe a la composición de líquido intersticial que es viscoso y con proteínas de alto peso molecular, lo que determina la aparición de linfedema, astenia, fatiga, disnea de medianos

esfuerzos e hipotonía muscular son los síntomas referidos. Las perturbaciones de carácter psíquico no son por la estética tanto como por los problemas de orden somático que acarrea.

El hecho de clasificar el fibroedema geloide en 3 tipos no significa que estas se presenten de forma única en los pacientes y separadamente, por el contrario, es muy frecuente encontrar asociaciones de fibroedema geloide blando y duro. Es posible encontrar un fibroedema geloide duro en las piernas asociada a uno blando en la cintura pélvica, así como también a nivel de un solo miembro (fibroedema geloide duro sobre la parte externa de muslos y blando sobre la parte interna de los mismos).

Clínicamente no es difícil reconocer una zona afectada, ya que concurren una serie de signos que son perfectamente identificables y característicos: incremento de su espesor, aumento de su consistencia, mayor sensibilidad, disminución de su movilidad y menor capacidad de desplazamiento de los distintos planos de la piel por la adherencia a planos cutáneos profundos, y palpación de los gránulos subcutáneos que corresponden a los micronódulos y macronódulos característicos del fibroedema geloide mucoso subcutáneo. Todas estas anomalías constituyen el fenómeno bien

conocido de la “FGMS”, que define estéticamente la apariencia de esta enfermedad en la zona afectada. (Josefina de Peña, 2005)

### **1.2.6. Tratamientos**

Al ser la FGMS una alteración multifactorial, su tratamiento debe contemplar diferentes aspectos y cumplir con los siguientes principios

**Acción lipolítica:** Reductora de las grasas. Las sales minerales y oligoelementos ayudan al drenaje del tejido adiposo.

**Alisamiento:** Bloquear los azúcares e inhibir su fijación en las proteínas del colágeno, esto disminuye la rigidez del colágeno responsable de la aparición de la FGMS. Estimular también la síntesis del colágeno, de esta manera se combate el envejecimiento y se mejora la elasticidad de la piel.

**Drenaje:** Al aumentar la resistencia capilar, disminuir su permeabilidad y activar la circulación, se favorece el drenaje de las sustancias tóxicas y del agua.

**Acción reafirmante sobre el tejido conjuntivo:** Estimular la biosíntesis del colágeno para conseguir la acción reafirmante, empleando preparados y técnicas diversas.

Por lo tanto, el tratamiento debe comprender medidas generales y medidas específicas.(Sandoval, 2003)

No se puede acabar con ella por completo, solo reducirla empleando tratamientos estéticos tales como los que se describen a continuación y al final de cada uno de ellos se especifica el efecto sobre el FGMS:

- **Mesoterapia**

La mesoterapia es un tratamiento para eliminar el fibroedema geloide mucoso subcutáneo que consiste en inyectar pequeñas dosis de sustancias homeopáticas en la primera capa de la dermis. Estos componentes, personalizados para cada paciente, ayudan a disolver el exceso de grasa y toxinas en la zona tratada, activando la circulación sanguínea y linfática para expulsar estas grasas y toxinas de nuestro cuerpo. (Drenante)

### - **Carboxiterapia**

Los tratamientos de carboxiterapia consisten en realizar microinyecciones de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) en la zona a tratar. Este gas consigue reducir las células adiposas, y de este modo eliminar el fibroedema geloide mucoso subcutáneo. Es fundamental que estas microinyecciones de CO<sub>2</sub>, sean administradas y controladas por especialista en carboxiterapia.

(Lipolítica)



### - **Presoterapia**

La presoterapia es un tratamiento que utiliza la presión del aire para realizar un drenaje linfático. La paciente se introduce en una funda que cubre las zonas a tratar, y mediante un equipo compresor se llena de aire. La presión del aire, a modo de masaje, activa la circulación linfática, para expulsar toxinas y grasas acumuladas y eliminar el fibroedema geloide mucoso subcutáneo. (Drenante)

## - **Cavitación**

Los aparatos de cavitación logran eliminar el fibroedema geloide mucoso subcutáneo mediante la generación controlada y repetida de microburbujas de aire en el interior del tejido graso con la ayuda de un rodillo específico. Estas microburbujas rompen las células de grasas para su posterior eliminación mediante el sistema linfático. Además, los aparatos de cavitación tienen un efecto reafirmante y moldeador.

(Lipolítica)



## - **Radiofrecuencia**

La radiofrecuencia es una técnica que consigue regenerar el colágeno y mejorar la elasticidad de la piel, estimulando el sistema linfático mediante calor intradérmico provocado por vibraciones. Esta activación del sistema linfático consigue reducir los líquidos y toxinas que se encuentran en el tejido adiposo, reduciendo así el fibroedema geloide mucoso subcutáneo.

(Alisante y reafirmante)

- **Ultrasonidos**

Los tratamientos con ultrasonidos consisten en emitir un haz de ultrasonidos de baja frecuencia que rompe las células de grasa del tejido adiposo. De este modo son eliminadas por el sistema linfático, la orina y el sudor. (Lipolítica)

- **Electroestimulación**



La electroestimulación es una técnica que aplica corrientes eléctricas mediante electrodos, de forma que se contraen los músculos de manera controlada. El músculo trabaja de forma inducida, consiguiendo eliminar grasa localizada. (Drenante)

- **Ozonoterapia**

La ozonoterapia consiste en oxigenar los tejidos afectados por el fibroedema geloide mucoso subcutáneo mediante ozono inyectado. De

este modo, se activa la circulación y se elimina la grasa depositada.

(Drenante y reafirmante)

#### - **Intralipoterapia**

La intralipoterapia, también conocida como la lipoescultura sin cirugía, consiste en aplicar inyecciones de ácido desoxicólico Aqualix, un componente presente en el organismo que elimina para siempre los pequeños cúmulos de grasa localizada. (Drenante)



#### - **Liposucción**

En los casos más graves puede ser necesario recurrir a tratamientos quirúrgicos como la liposucción para eliminar el fibroedema geloide mucoso subcutáneo mediante una pequeña cánula que se introduce, por pequeñas incisiones se succiona la grasa acumulada de la zona tratada, reduciendo también los depósitos de grasa que se encuentran en el tejido adiposo. (Drenante)

## - **Lipoescultura**

La lipoescultura es un tratamiento quirúrgico que consiste en introducir mediante pequeñas incisiones una sonda de radiofrecuencia. El calor generado favorece que la grasa acumulada se licúe, para que pueda ser eliminada y extraída más fácilmente. (Alisante y drenante)

Los tratamientos con láser, radiofrecuencia y masajes se usan hace años para mejorar la apariencia de la piel. Los resultados son efectivos pero no permanentes, y requieren tiempo y dinero ya que se necesitan entre 10 y 15 sesiones para ver los primeros resultados. En los casos más graves puede ser necesario emplear métodos quirúrgicos. Sin embargo, la mayoría de tratamientos sólo consiguen un resultado temporal siendo la mejor medida adoptarlos en forma preventiva o en etapas iniciales, cabe resaltar que los métodos que logran aplacarla e incluso eliminarla como los quirúrgicos, anteriormente mencionados, son demasiado invasivos, requieren cuidados especiales y resultan muy costosos por lo que no están al alcance de toda la población. (Col, 2005) (Carvalho & Mejia, 2014) (Pires et al., 2004)

- **Productos cosméticos**

En la actualidad existe una gran variedad de literatura médica enfocada en el tratamiento del fibroedema geloide mucoso subcutáneo, desgraciadamente al mismo tiempo en muchas revistas cosméticas comerciales se pretende promover una serie de productos que en la mayoría de los casos no cuentan con validación científica y son de costos elevados.



En la industria cosmética se considera como un desafío desarrollar productos efectivos, seguros, de bajo costo y no invasivos. (Alisante, lipolítico, reafirmante)

### 1.3. *Ugni molinae* Turcz (MURTILLA)

#### Resumen

Este capítulo, con respecto a la especie vegetal, muestra las generalidades, taxonomía, estructuras de los compuestos y propiedades estudiadas de *Ugni molinae* Turcz. Así como también las formulaciones desarrolladas a base de este vegetal para tratar afecciones cutáneas. En la figura 1.3 se aprecia la especie vegetal.



Figura 1.3 *U. molinae* Turcz (INIA, 2016)

### 1.3.1. Clasificación taxonómica(Peredo Sandoval, 2008)

Nombre científico: *Ugni molinae* Turcz.

Sinonimias: *Myrtus ugni* Mol., *Eugenia ugni* Hook.et Arn.

Nombres vulgares: murta, murtilla, uñi o ñi (voz mapuche), chilean guava (inglés), chilean cranberry (inglés).

Familia: *Myrtaceae*.

Orden: Myrtales.

Clase: Magnoliopsida.

División: Magnoliophyta.



### 1.3.2. Generalidades

*Ugni molinae* Turcz, es un arbusto que crece de manera silvestre en las regiones australes de Chile (35° a 42° LS) y que puede alcanzar hasta 2 m de altura. Sus hojas son ovaladas, lanceoladas o elípticas de 1,4 – 3,6 x 0,8 – 2 cm de tamaño, glabras o con algunos pocos pelos dispersos, de agudas a acuminadas con vena media prominente sobre el envés de lámina; sus

pecíolos son superficialmente canalizados de 2–4 mm; pétalos suborbiculares, carnosos de 5 – 8 mm, rosados; 40 a 60 estambres de 2–4 mm. Frutos subglobosos de alrededor de 1 cm de diámetro, rojo oscuros. (Goity, 2012)

*U. molinae*, es conocida principalmente por sus frutos comestibles. La medicina popular le atribuye diversas propiedades tales como aromática, astringente, estimulante, alivia dolencias de la vía urinaria, entre otras. Sus hojas son utilizadas por la industria dermocosmética como regeneradoras de la piel y neutralizadoras del estrés oxidativo. Estudios previos realizados en los laboratorios de la Universidad de Chile han demostrado que las hojas de esta especie son una rica fuente de triterpenoides pentacíclicos derivados de los núcleos ursano, oleanano y lupano, a los cuales tanto en la literatura como estudios realizados en el laboratorio han establecido que poseen propiedades analgésicas, antiinflamatorias, antioxidantes e hipoglicemiantes. (Queupil Carrasco, 2011)

### 1.3.3. Estudios previos

En los últimos cinco años los estudios previos con más relevancia, realizados a las hojas de *U. molinae*, son los descritos a continuación:

- Propiedades químicas y valoración de la capacidad antioxidante de los extractos de hojas de *Ugni molinae* de poblaciones que crecen en Chile continental y en Juan archipiélago de Fernández. (Avello et al., 2014)

- Compuestos fenólicos y actividad antioxidante de extractos hidroalcohólicos de *Ugni molinae* silvestre y cultivada. (Augusto et al., 2014)

-Composición fenólica y capacidad antioxidante de hojas de *Ugni molinae* de diferentes genotipos (Peña-Cerda et al., 2017)

- Desarrollo de una película de envasado activo basada en un revestimiento de metilcelulosa que contiene extracto de hoja de *Ugni molinae*. (Hauser et al., 2016)

- Estudio comparativo de la actividad antiinflamatoria y composición cualitativa-cuantitativa de los triterpenoides a partir de diez genotipos de *Ugni molinae*. (Arancibia-Radich et al., 2016)
- Composición fenólica y capacidad antioxidante de hojas de *Ugni molinae* de diferentes genotipos (Peña-Cerda et al., 2017)

Las actividades biológicas que presenta este arbusto están relacionados directamente a su composición rica en saponinas triterpénicas pentacíclicas, responsables de gran parte de las actividades biológicas, estos compuestos también se encuentran presentes en especies altamente reconocidas en la industria cosmética para el tratamiento de FGMS tal como la centella asiática.

La actividad antioxidante atribuida a los compuestos fenólicos sería un coadyuvante al tratamiento de esta condición dérmica.

En el presente proyecto se pretende evaluar el efecto reductor del FGMS mediante varias formulaciones a base de extractos obtenidos de las hojas de *U. molinae* y de otros activos lipolíticos.

### 1.3.4. Productos con *Ugni molinae*

En el mercado actualmente se ofertan productos que contienen *U. molinae* en sus formulaciones, para el tratamiento del fibroedema geloide mucoso subcutáneo mismos que son descritos en la Tabla 1.1

El presente proyecto pretende obtener productos que difieren de los mismos al tener un factor adicional, que es el enriquecimiento del extracto con la fracción triterpénica de la misma especie; principal responsable del efecto reductor del FGMS.

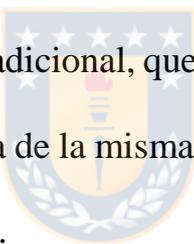


Tabla 1.1. Algunas formulaciones tópicas presentes en el mercado Chileno a base de *Ugni molinae* para tratamiento del Fibroedema Geloide Mucoso Subcutáneo.

<b>Nombre producto</b>	<b>Tipo de formulación</b>	<b>Principio(s) activo(s)</b>
<b>Murt-Actic®</b>	Crema	<i>Ugni molinae</i> (Triterpenos equivalentes a ácido asiático)
<b>Pack anticelulitis®</b>	Cápsulas	Alga Fucus Te blanco <i>Ugni molinae</i> (Triterpenos equivalentes a ácido asiático)

<b>Yeso Terapia Criogeno De Murta. ®</b>	Yeso 1 Kilo más Gasa	<i>Ugni molinae</i> (Triterpenos equivalentes a ácido asiático)
<b>Redumodel®</b>	Ampolla	<i>Ugni molinae</i> (Triterpenos equivalentes a ácido asiático) Yodo Silanoles Cafeina
<b>Celumodel®</b>	Crema	<i>Ugni molinae</i> (Triterpenos equivalentes a ácido asiático) Elastina hidrolizada Tocoferol Silanoles
<b>Crema reductora reafirmante®</b>	Crema	<i>Ugni molinae</i> (Triterpenos equivalentes a ácido asiático) Centella asiática Yodo Cafeína

### 1.3.5. Fitoquímica y actividad biológica

En últimos estudios se descubrió, en las hojas de *Ugni molinae*, una inusual presencia de triterpenos, especialmente, de ácido asiático. Esto llamó mucho la atención de los investigadores, ya que el ácido asiático no se encuentra en plantas del continente americano. Este ácido es excelente para los tratamientos de fibroedema geloide mucoso subcutáneo en

cosmética y cicatrización en dermatología. Su nombre proviene de una planta asiática, muy apreciada por la dermocosmética y que se conoce comúnmente como centella asiática.

Los estudios indican que *Ugni molinae* tendría en sus hojas más del doble de ácido asiático que la centella asiática (2,33% frente a 1%), convirtiéndola en un preciado recurso farmacológico. De esta forma se transforma en un excelente aliado a la hora de combatir el fibroedema geloide mucoso subcutáneo y favorecer la cicatrización.

Los triterpenos de esta especie tienen estructura pentacíclica, es decir, tienen actividad analgésica y antiinflamatoria. Los triterpenos y los compuestos fenólicos tienen propiedades reguladoras de la microcirculación, y son cicatrizantes y astringentes.

El contenido de ácido asiático le da propiedades reguladoras de la síntesis de colágeno involucrado en la cicatrización de heridas y de inhibidor de la fase inflamatoria de cicatrices y queloides hipertróficas, ayuda a combatir la flacidez, tonifica, energiza y favorece la hidratación cutánea,

o sea, es antiarrugas. En la figura 1.4 se encuentran las estructuras de dos triterpenos presentes en las hojas de *U. molinae*

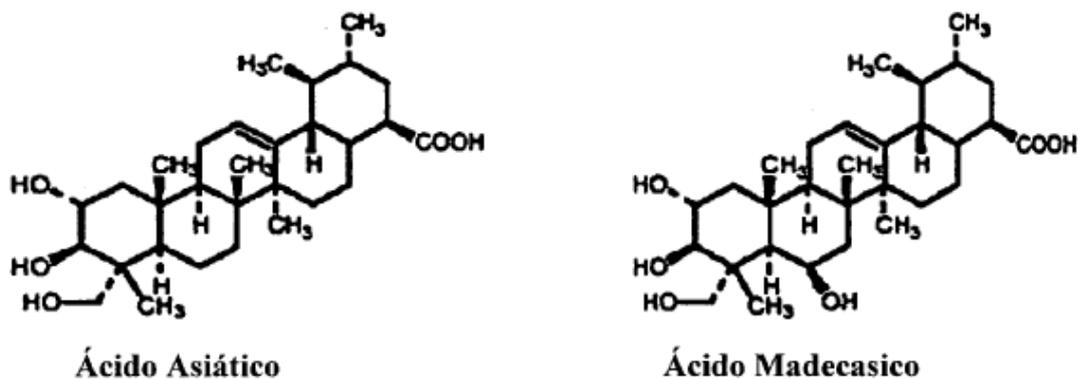


Figura 1.4. Triterpenos representativos de *Ugni molinae*. (Queupil Carrasco, 2011)

Los triterpenos presentes en *U. molinae*, pueden encontrarse en el vegetal a manera de geninas, bidesmósidos y monodesmósidos, estos últimos presentan una mayor capacidad lipolítica al desestabilizar mayormente la membrana celular.

Aplicados intradermicamente los constituyentes de la fracción triterpénica de la centella asiática que posee compuestos similares a *U. molinae*, actúan normalizando la producción de colágeno al nivel de los fibroblastos, promoviendo el restablecimiento de una trama colágena normal y flexible y como consecuencia la liberación de las células

adiposas, permitiendo la liberación de la grasa localizada gracias a la posibilidad de penetración de las enzimas lipolíticas. Proporciona por lo tanto, la normalización de los cambios metabólicos. Esta función es aun auxiliada por la mejora de la circulación venosa de retorno (acción venotrófica), que combate los procesos degenerativos del tejido venoso. También controla la fijación de la prolina y lisina, elementos fundamentales en la formación de colágeno mejorando la estructura de esa proteína. Su acción sobre los edemas de origen venoso orienta el tratamiento del fibroedema geloide mucoso subcutáneo localizado. Favorece el proceso de cicatrización y actúa sobre fibrosis de varios orígenes. El asiaticosído tiene acción antibiótica y actúa como cicatrizante de heridas en la piel. (Biodet y Contorno estetico, s.f.)

Esta planta contiene también una gran cantidad de compuestos polifenólicos como taninos y flavonoides. Tienen una gran importancia en dermocosmética por sus efectos correctivos y neutralizantes del estrés oxidativo y la fatiga hormonal, lo cual disminuye el estrés cutáneo.

### 1.3.6. Mecanismo de acción

Se ha comprobado que el asiaticósido incrementa la fosforilación de las proteínas SMAD-2 y SMAD-3, y se fija a las proteínas SMAD-3 y SMAD-4, encargadas de la regulación de la síntesis de colágeno I por un mecanismo en el que no parece intervenir la activación del receptor del factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Sin embargo también se ha comprobado que este compuesto es capaz de limitar la formación de queloides que se originan por hiperproliferación de fibroblastos y sobreproducción de la matriz extracelular, citocinas y factores de crecimiento, mediante un mecanismo en el que también participan estas proteínas SMAD (SMAD-7 inhibidora de la proliferación). Por ello se considera que este compuesto podría tener una actividad normalizadora de la cicatrización, promoviendo la proliferación en el caso de la cicatrización de heridas e inhibiendo la hiperproliferación en el caso de cicatrices queloides. Los ensayos realizados con animales *in vivo* también han confirmado los efectos cicatrizantes (Alonso, 2009)

Por otro lado las saponinas presentes en el vegetal son heterósidos de esteroides (saponósidos esteroídicos) o de triterpenos (saponósidos triterpénicos). Tienen acción hemolítica, al interactuar con el colesterol de la membrana de los eritrocitos, sobre todo las saponinas con núcleo esterooidal (vía oral esta incidencia es mínima debido a su pequeña absorción por el tubo digestivo, al contrario de lo que ocurre vía endovenosa). Son irritantes celulares, aprovechándose en dosis medicinales como expectorantes y diuréticos pero, por vía oral, en dosis altas irritan la mucosa bucofaríngea y digestiva, causando dolor abdominal, vómitos y diarrea. Son amargas y forman espuma, incluso a concentraciones bajas, estando ampliamente distribuidas en el reino vegetal. (othopux, 2007)

Los adipocitos y glóbulos rojos son modelos biológicos parecidos, ambos poseen una membrana celular que por acción de los triterpenos es desestabilizada. Por lo tanto, el resultado de la acción hemolítica de estos compuestos es un modelo predictor de la lipólisis. En la presente tesis se realizó el ensayo de interacción con membranas de glóbulos rojos; ya que estos poseen una membrana que ha sido ampliamente estudiada, misma que no tiene orgánulos internos, lo que los convierte en un sistema celular

ideal para estudiar las interacciones básicas entre medicamentos y membranas. Por otro lado aunque menos especializados que muchas otras membranas celulares, tienen suficientes funciones en común con ellas, como el transporte activo y pasivo, y la producción de gradientes iónicos y eléctricos, para ser considerados representativos de la membrana plasmática en general. Finalmente es un modelo económico, de fácil obtención y manipulación convirtiéndose en un modelo idóneo para su estudio.(Manrique-Moreno et al., 2014)



## **Capítulo 2**

### **Hipótesis y objetivos**



## 2.1. HIPÓTESIS

Las hojas de *Ugni molinae* Turcz (Murtilla) contienen compuestos triterpénicos hidrofílicos que favorecen la circulación sanguínea, con efecto lipolítico y ayudan a drenar depósitos de grasa desde la hipodermis. Por lo tanto, extractos hidrofílicos de hojas de *Ugni molinae* enriquecidos con triterpenos de la especie y productos cosméticos que los contengan podrían mitigar el desarrollo y apariencia del fibroedema geloide mucoso subcutáneo grado 3.



## 2.2. OBJETIVOS

### 2.2.1. General

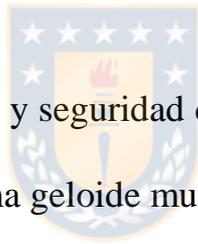
Desarrollar formulaciones cosméticas a base de extractos hidrofílicos de hojas de *Ugni molinae* Turcz (Murtilla) enriquecidos con triterpenos de la especie, con efecto reductor del fibroedema geloide mucoso subcutáneo grado 3



### 2.2.2. Específicos

- Desarrollar métodos de extracción de hojas de *Ugni molinae* para obtener extractos hidrofílicos enriquecidos con fracciones triterpénicas de la especie.
- Seleccionar los mejores extractos según criterios químicos y biológicos.

- Formular y estandarizar formulaciones cosméticas en base a extractos hidrofílicos de hojas de *Ugni molinae* enriquecidos con triterpenos de la especie y con activos lipolíticos de otras especies vegetales.
- Seleccionar las mejores formulaciones según efectividad *in vitro*
- Caracterizar las formulaciones seleccionadas a través de controles tecnológicos.
- Evaluar la efectividad y seguridad de las formulaciones en grupos de mujeres con fibroedema geloide mucoso subcutáneo grado 3.



## Capítulo 3

### Metodología



### 3.1. OBTENCIÓN MATERIAL VEGETAL

Se recolectó material vegetal de *Ugni molinae*, de 3 regiones de Chile: Biobío, Araucanía y los Lagos. Un ejemplar de especímenes fue depositado en el herbario de la Escuela de Botánica de la Universidad de Concepción, colectado en Cantun, Fundo Santa Rosa, XIX.2017 por Jorge Sanhueza SN y con número de registro CONC 187547.

Las hojas se someten a un estudio organoléptico antes y después de obtener el material vegetal seco.



### 3.2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS

Las hojas de *U. molinae* son extendidas en un mesón para su secado a temperatura ambiente y a la sombra. Posteriormente, se muele el material vegetal seco en molino de cuchillas, se almacena en recipientes plásticos rotulados y sellados, resguardados de la luz, mediante el uso de cajas de cartón forrado.



Los extractos se obtienen por maceración, utilizando los siguientes solventes en las proporciones especificadas (Estudio preliminar con un volumen de 30mL por muestra):

Etanol, agua (50:50)

Propanodiol, agua (50:50)

Etanol, propanodiol, agua (15:35:50)

Se utilizan 3 proporciones de relación biomasa: solvente al 1%, 5% y 10% de polvo seco. La maceración es realizada durante 2 semanas a

temperatura ambiente y con agitación constante. (Cada una de las muestras tiene un duplicado, teniendo un total de 54 muestras)

Los extractos se filtran por algodón y los solventes se retiran por diferentes métodos de secado, según corresponda (rota vaporación y liofilización).

Las condiciones que proporcionen mejores rendimientos de triterpenos son seleccionadas para la elaboración de extractos polares.



Los extractos son almacenados en un lugar seco y protegido de la luz.

### 3.3. ANÁLISIS QUÍMICO

#### 3.3.1. Identificación y cuantificación de Terpenos por HPLC

Los extractos obtenidos con las condiciones antes mencionadas se someten a la cuantificación de triterpenos por medio de HPLC con detección UV a 201nm, usando como estándar el ácido asiático; la ecuación obtenida fue  $y = 30442x + 1269,2$  con un  $r^2 = 0,9933$ . Se seleccionan los extractos con mayor rendimiento y concentración de triterpenos.

Las muestras se filtran utilizando un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  antes del análisis. Para la separación por HPLC se utilizaron 0,5 mg /ml de extracto en MeOH, una columna Kromasil 100-5-C-18 (4,6  $\times$  250 mm) Part/Serial (M05CLA25/E130704) AksoNobel a 25°C de temperatura; con solución acuosa con ácido fórmico al 0,1% (A) y acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1% (B) como fases móviles con el siguiente programa: 0-40 min 60% B, 40-41 min 60-97% B y 41- 60 min 97% B a una velocidad de flujo de 0,6 ml / min y detección UV a 201nm.

Según bibliografía los picos de los triterpenoides se observan con mejor definición al usar acetonitrilo-agua (60:40) durante los primeros 40 minutos de funcionamiento antes de cambiar inmediatamente a acetonitrilo-agua (90:10) para observar la presencia de compuestos menos polares. Usando ácido fórmico al 0,1% en el agua como promotor de ionización. (Goity et al., 2013)



### 3.4. ENSAYOS *in vitro*

#### 3.4.1. Evaluación de la actividad sobre membranas de glóbulos rojos de los extractos de *Ugni molinae*.

Para evaluar la interacción de los extractos sobre membranas de glóbulos rojos se procederá como sigue:

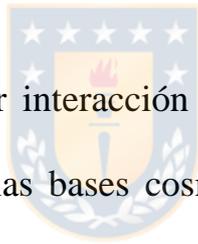


Se lee la absorbancia a 540 nm del sobrenadante que resulta de la incubación de eritrocitos humanos con concentraciones crecientes de los extractos de modo que se evalúa indirectamente la hemoglobina libre producida en los eritrocitos humanos.

Se obtiene 10 mL de sangre de un dador sano sin tratamiento medicamentoso recolectado en tubos heparinizados de 4 mL (Vacuette®).

Se centrifuga y se elimina el sobrenadante. Posteriormente, se lava tres veces con PBS pH 7,4 mediante centrifugación a 2.500 rpm (Arquimed®) por 10 minutos. Luego se resuspende cuatro veces su volumen en PBS pH 7,4. De esta suspensión base de glóbulos rojos humanos al 10% v/v se

distribuyen 140  $\mu$ L en tubos eppendorf. Se prepara un blanco con 100% de actividad sobre las membranas de los glóbulos rojos con agua destilada y un blanco para leer las muestras con PBS 1x pH 7,4. Se incuban en agitador rotatorio durante 30 minutos a 37°C y luego se agregan alícuotas del(os) extracto(s). Se incuban durante 15 minutos a temperatura ambiente en el agitador rotatorio. Luego se procede a centrifugar a 3.500 rpm por 5 minutos y se lee el sobrenadante a 540 nm (Bausch&Lomb SP2000UV, USA). (Germán Téllez, Lily Johanna, Diana Henao, Juan Rivera, 2017)



Los extractos con mayor interacción sobre membranas se seleccionan para ser incorporados a las bases cosméticas. Además, se les adiciona extracto de *Capsicum spp* al que se le realizan pruebas de interacción con los glóbulos rojos por si solo y en conjunto con el extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos, usando la metodología ya descrita.

### **3.5. OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN TRITERPÉNICA DEL EXTRACTO SELECCIONADO POR TRUE MOVING BED (TMB)**

Para obtener la fracción triterpénica de hojas de *U. molinae* se usa el equipo TMB-500 (Armen, Francia). Una serie de mezclas de solventes inmiscibles se ensayan previamente usando TLC y HPLC con el objeto de estimar los coeficientes de partición (KDs) de cada terpeno, como se observa en la tabla 3.1. Como criterio de selección se usa aquella mezcla que permita obtener KDs entre 0,5-1,5. Los parámetros a estudiar en el TMB son el flujo de elución fase ascendente, flujo de elución fase descendente, flujo de inyección ascendente, flujo de inyección descendente, rotación de las columnas y concentración de la muestra que se inyectará. Las fracciones obtenidas se analizan por HPLC para cuantificar los triterpenos presentes.

Tabla 3.1 Sistemas de solventes utilizados para correr placa de TLC de extracto acuoso de *U. molinae* Fuente:

Elaboración propia.

<i>SOLVENTES</i>	HEXANO	ACETATO DE ETILO	METANOL	AGUA
N	1	1	1	1
P	6	5	6	5
S	5	2	5	2

La TMB es una versión más avanzada de la cromatografía de partición centrífuga (CPC) y que básicamente utiliza dos columnas de CPC interconectadas y rotando en forma simultánea. Una de ellas se usa en modo ascendente y la otra en modo descendente, por lo que ambas fases a diferencia de la CPC convencional- se están moviendo en forma continua, pero opuesta, constituyendo un lecho móvil verdadero (TMB), el cual al ser líquido no daña o desgasta los componentes de las bombas. La muestra se inyecta "entre" las dos columnas de CPC, lo que permite que en una dirección se separen los productos polares y en la otra los apolares. La técnica es útil en mezclas complejas y separación de enantiómeros y en operación continua puede producir varios gramos de bio-activos al día.

En la figura 3.1 se muestra un sistema TMB. Según se puede observar, el lecho está dividido en dos zonas, cada una de las cuales desempeña un papel específico en la separación de la mezcla de los componentes. El

compuesto más retenido (A) se denomina extracto, y el compuesto menos retenido (B), refinado. Si se realiza una inyección, por la parte central del sistema, de una mezcla (A+B), la separación se llevará a cabo en las zonas centrales. El componente A, al ser más retenido, seguirá el sentido del desplazamiento de la fase estacionaria, mientras que el componente B, al estar menos retenido, seguirá el sentido de la fase móvil.

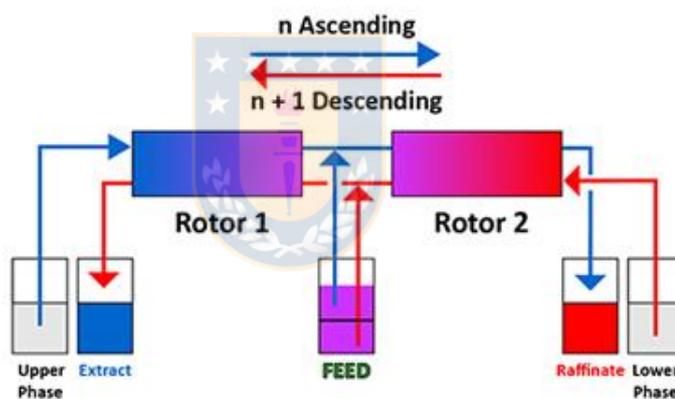


Figura 3.1 Sistema de cromatografía en contracorriente en lecho móvil verdadero (True Moving Bed, TMB) para la separación de dos componentes A y B. ("AlphaCrom," n.d.)

Por tanto, respecto a las técnicas cromatográficas preparativas clásicas, la configuración TMB tiene la ventaja de posibilitar la continuidad del proceso y de aumentar el rendimiento de la separación, debido al movimiento a contracorriente de los flujos de fase móvil y fase estacionaria.

### **3.6. OBTENCIÓN DE EXTRACTO ENRIQUECIDO CON LA FRACCIÓN TRITERPÉNICA**

Al extracto con mayor rendimiento y concentración de triterpenos se le adiciona diferentes porcentajes de la fracción triterpénica, se evalúa su actividad hemolítica y se determina la concentración más activa.

Además, al extracto enriquecido con la fracción triterpénica con mayor rendimiento y concentración de triterpenos, se le adiciona otro activo que ha demostrado efectividad en el tratamiento para disminuir el fibroedema geloide mucoso subcutáneo en estudios anteriores en la Universidad de Concepción Chile, como es el extractos de *Capsicum spp.*

La cantidad de *Capsicum spp* añadida fue de 2,8% (eqq a 0,15% capsáicina) de extracto y para determinar la concentración de este, se realizó un análisis por espectrofotometría UV a 280nm, utilizando como estándar la capsáicina, cuya curva de calibración se realizó con un intervalo de concentración de 100ppm - 600ppm, obteniendo un  $r^2$  de 0,9942 y una concentración de 57,02mg/mL de capsáicina, en la muestra del extracto del material vegetal.

### **3.6.1. Estandarización de extractos enriquecidos**

Los extractos seleccionados según rendimiento, concentración de triterpenos y capacidad hemolítica, se estandarizan en base a triterpenos totales según la metodología ya descrita en el punto 3.3.1.



### 3.7. ELABORACIÓN DE FORMULACIONES

#### 3.7.1. Materias primas para la elaboración de formulación tópica

Los extractos seleccionados se incorporan en formulaciones tipo gel, que son proporcionados por la empresa N-Active.

La composición de Formula Base del gel (CsP % 100) es:



Glicerina	3,00%
Carbomer ® 980	0,50%
Propanodiol	1,50%
TEA	0,40%
Benzoato de sodio	0,20%
Sorbato de potasio	0,20%

La composición de las formulaciones realizadas se expone a continuación

### Formulación 1

Formula base de gel en cantidades suficientes con 10% de incorporación de solventes (Etanol/Agua).

### Formulación 2

\* Extracto de *Ugni molinae* 1 %, enriquecido con triterpenos 0,25%

Formula base de gel en cantidades suficientes

### Formulación 3

\* Extracto *Ugni molinae* 1% enriquecido con triterpenos 0,25% y *Capsicum spp* 2,8% (Eqq 0,15% de *capsaicina*)

Formula base de gel en cantidades suficientes

\*Concentración definida posterior a la prueba *in vitro* sobre membranas en glóbulos rojos.

A continuación en la figura 3.2 se presenta un esquema del procedimiento empleado para la elaboración de las formulaciones:

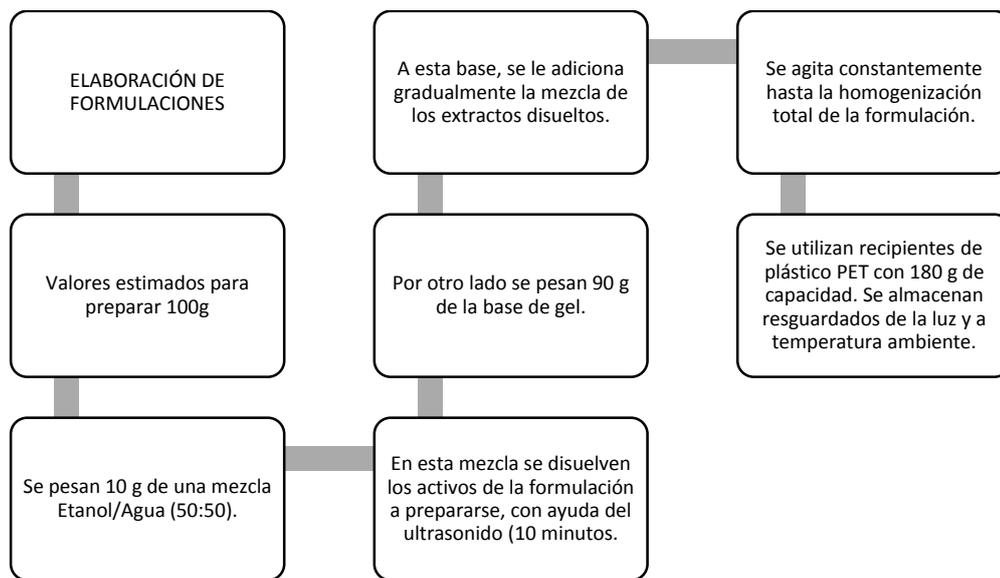


Figura 3.2 Esquema de procedimiento empleado para la elaboración de las formulaciones Fuente: Elaboración propia



### **3.8. ENSAYO *in vitro* DE LAS FORMULACIONES**

#### **3.8.1. Evaluación de la actividad sobre membranas de glóbulos rojos *in vitro* de las formulaciones**

Se evalúa la actividad sobre membranas de glóbulos rojos de las formulaciones desarrolladas según lo antes descrito en el punto 3.4.1.



### **3.9. CONTROLES Y ESTUDIOS DE ESTABILIDAD**

Con el fin de determinar el tiempo durante el cual las formulaciones mantienen sus especificaciones de calidad, se realizan los siguientes controles tecnológicos en diferentes condiciones de almacenamiento, variando la temperatura, humedad y los periodos de tiempo en que se analizan las muestras:

#### **3.9.1. Características organolépticas**



Se realiza una inspección visual y sensorial de las siguientes características: color, olor y aspecto. Para facilitar la comparación de la evolución de las características organolépticas en el tiempo, se toman fotografías de los diferentes preparados y se establece una escala arbitraria para indicar la magnitud del cambio en una determinada característica, por ejemplo: NH: no hay cambios, + cambios leves, ++ cambios apreciables, +++ cambios significativos.

### **3.9.2. Control de pH**

El pH se determina con un peachímetro. Para la medida, se preparará una dispersión de la formulación al 10% en agua destilada. Se considera como rango óptimo de pH entre 4,5 hasta 6,5.

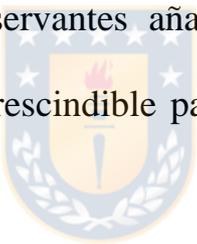
### **3.9.3. Control de viscosidad**



Para medir la viscosidad aparente se utilizará un viscosímetro digital Brookfield, modelo DV-E, con el set de spindles RV (se trabaja con el spindle 6). Se toman muestras de producto y se adicionan a un vaso especialmente acondicionado para este uso, se mide la viscosidad sometiendo a las formulaciones a diferentes revoluciones por minuto: 5, 10, 20 y 50 rpm, las mediciones se realizan por triplicado.

#### **3.9.4. Control de crecimiento microbiano**

Con el propósito de garantizar la seguridad del producto se realizan los análisis de control microbiológico previos a la salida del producto al mercado. Cuando se lanza un nuevo producto cosmético al mercado hay que ser muy meticuloso en cuanto a los factores de riesgo. Para corregirlos es imprescindible la inclusión en las formulaciones de conservantes. Comprobar que los conservantes añadidos en las formulaciones son efectivos es un paso imprescindible para garantizar la seguridad en los cosméticos.



#### **3.9.5. Recuento en placa**

Esta metodología se lleva a cabo para cuantificar el número de bacterias mesófilas y hongos filamentosos que se pueden desarrollar en condiciones aeróbicas. Las pruebas diseñadas en la farmacopea americana (USP), sirven para determinar si un compuesto o producto terminado cumple con las especificaciones de calidad microbiológica establecidas

(USP38/NF33, <61> Examen microbiológico de productos no estériles, 2015).

El método utilizado es una siembra normal en placas de agar para recuento total. Los tiempos considerados son tiempo 0, 15, 30, 90 y 120 días de preparada la formulación. El tratamiento de la muestra es el siguiente: se toma un gramo del gel y se lleva a un volumen de 10mL con suero fisiológico, se mezcla hasta la total homogeneidad y 100uL de esta solución se depositan en una placa petri con agar y se realiza una siembra estriada para aislamiento de colonias, en este recuento no se realiza ninguna dilución y se hace con todas las formulaciones. Todos los recuentos se realizarán 2 días después de la incubación a  $35,0 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ .

Durante el procedimiento se lleva a cabo un control negativo de cada medio y del suero fisiológico. En este medio se esperaba que no hubiera ningún tipo de proliferación microbiana, si esto sucede la prueba queda anulada. Se espera que ningún control negativo presente proliferación.

Los estudios se realizaron en el Departamento de Farmacia de la Universidad de Concepción

### **3.9.6. Marcadores químicos**

Los marcadores químicos son esenciales para estandarizar las formulaciones cosméticas que contienen los extractos en base a los compuestos representativos del vegetal a quienes se les aduce en mayor medida el efecto terapéutico, en este caso son los triterpenos. Las especificaciones de la cuantificación de los mismos se detallan en el presente documento en el punto 3.3.1.



### **3.9.7. Estudio de estabilidad acelerado**

Una vez que el gel está envasado en su recipiente final se procede a realizar estudios de estabilidad acelerado dentro de estufa en 2 condiciones a  $40 \pm 2^\circ\text{C}$  a 75% HR y a  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  a 60% HR. Este proceso se lleva a cabo para obtener resultados aplicables a 6 meses (Alfonso R., 2003).

Se colocan por duplicado muestras para evaluar estabilidad a tiempo cero, 30 días, 60 y 90 días correspondientes a 6 meses. Cumplido el plazo, se

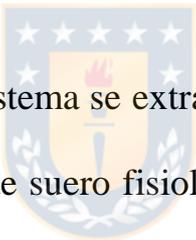
procede a cuantificar la concentración de triterpenos como marcadores químicos, se realizan controles tecnológicos y se evalúa el crecimiento microbiano.

### **3.9.8. Estudio de estabilidad a tiempo real**

Se procede a almacenar los frascos con el gel a temperatura ambiente y protegidos de la luz. Se realizan mediciones mensuales agrupándose en una tabla los datos obtenidos para medir los parámetros ya descritos (Alfonso R., 2003). De igual manera cumplido el plazo, se procede a cuantificar la concentración de triterpenos presentes y se evalúa el crecimiento microbiano.

### 3.10. ESTUDIO DE CESIÓN DE LA FORMULACIÓN

El estudio *in vitro* se realiza utilizando celdas de Franz, usando membrana de diálisis de 12000-14000 Dalton. El medio receptor es suero fisiológico (NaCl 0,9%), y el medio donador correspondiente al gel (0,5mL). El estudio se realiza por duplicado, acondicionando el sistema a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , para simular las condiciones fisiológicas (Kenneth A., 2002).



Una vez estabilizado el sistema se extrae de cada medio receptor 1,0 mL y se repone con 1,0 mL de suero fisiológico. Cada muestra se recibe en tubos Eppendorf previamente rotulados. Se toman muestras en 8 oportunidades, cada hora, completando de esta forma el estudio por 8 horas.

Para cuantificar la cesión de triterpenos del medio receptor, se confecciona una nueva curva de calibración por el rango de concentraciones obtenidas.

### **3.11. ESTUDIO PILOTO DE LA FORMULACIÓN**

#### **3.11.1. Reclutamiento de voluntarias y evaluación de los productos**

Se realiza un estudio piloto en voluntarias para poder recabar información sobre efectividad y seguridad del producto. Para ello se reclutan voluntarias de edades entre los 20 y 50 años, sin régimen dietético, sin restricción de peso, no embarazadas y con fibroedema geloide mucoso subcutáneo grado 3.



Para reclutar voluntarias se les invitó a una charla informativa donde se dio a conocer los objetivos del estudio; características de la formulación, sus propiedades y la posibilidad de ser seleccionadas para su aplicación.

Las voluntarias recibieron el consentimiento informado y el protocolo del estudio (anexo N°1), donde se les explica detalladamente el procedimiento. Además, se fijó una reunión individual para poder fotografiar la zona afectada por el FGMS y, a través de la participación de

un especialista (cosmetóloga), evaluar el grado de la alteración y descartar a las personas que eventualmente hayan confundido su condición dérmica.

Luego de la evaluación fotográfica, se seleccionó voluntarias según criterios de inclusión mencionados inicialmente.

La zona escogida es la parte de los muslos. Considerándose 13 personas por formulación, siendo en total 3 formulaciones por ende 39 voluntarias.

El tratamiento consistió en una medición inicial de sus parámetros antropométricos (talla y peso) y una sesión fotográfica. Las voluntarias utilizaron por 28 días el tratamiento correspondiente, aplicándolo 2 veces al día y realizando los masajes necesarios para una buena absorción, luego de este periodo se realizó nuevamente el registro fotográfico. A los tres meses del tratamiento se realizó el último registro fotográfico.

Se les proporcionó calzones de microfibra para las fotografías y mediciones durante el estudio, además se le realizaron encuestas sobre el grado de aceptación y percepción del producto al mes del tratamiento.

### **3.11.2. Pruebas de reacciones alérgicas**

En las voluntarias seleccionadas se procede a realizar la prueba de reacción retardada para evaluar la aparición de algún tipo de dermatitis de contacto (alérgica, irritativa). La determinación de la naturaleza y de su intensidad puede ser utilizada como un parámetro de toxicidad que presenta el producto. Para ello, se utiliza el test de la alergia, en el cual cada voluntaria, se coloca antes de dormir aproximadamente 0,25mL del producto en el muslo y para evitar que se pierda se cubre la zona expuesta con un parche, al día siguiente se retira el parche y se procede a observar si ocurre alguna reacción desfavorable. Así se pueden seleccionar las voluntarias que no presenten sensibilidad a las formulaciones.

### **3.11.3. Aplicación del gel con los extractos en voluntarias seleccionadas**

Realizado el estudio de sensibilidad, se comienza con la aplicación diaria del gel, en la zona de los muslos. La aplicación del gel se realiza dos veces

al día por 3 meses consecutivos. Se obtiene un registro fotográfico a tiempo 0, a los 28 días y a los 3 meses del estudio, de cada voluntaria; a fin de poder evaluar de forma visual la disminución de la apariencia de la FGMS en las zonas donde se aplica el producto. Se determina el(os) producto(s) más efectivos, mediante la comparación del grado de vascularización de las pacientes previo y posterior al tratamiento. Los valores se evalúan estadísticamente mediante una prueba t-student de datos pareados.



#### **3.11.4. Análisis de percepción de voluntarias**

Para evaluar la efectividad del gel y su aceptabilidad en las voluntarias, paralelo al tratamiento se le entrega a cada voluntaria una encuesta (Anexo N°2) para dejar registro de su percepción tanto de la formulación como de la aceptabilidad del producto.

## Capítulo 4

### Resultados



## 4.1. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS

Se trabajó con hojas de *U. molinae* de las regiones del Biobío, Araucanía y Los lagos, todas estas fueron secadas y pulverizadas como se describe en la metodología. En la figura N° 4.1 se aprecia el procedimiento realizado para la obtención de los extractos.



Figura 4.1. Proceso de obtención de extractos de *U. molinae* de las regiones Biobío, Araucanía y Los Lagos. n=2.

Los extractos se obtuvieron con diferentes proporciones de solventes que se describen más adelante, y el rendimiento global obtenido fue de 18,20  $\pm$  1,03 % de extracto.

## 4.2. ANÁLISIS POR TLC Y HPLC

Los extractos obtenidos por maceración en diferentes proporciones de polvo vegetal y mezclas de solventes, se sometieron a un análisis por HPLC para cuantificar la concentración de triterpenos que poseían, pero antes de esto se realizó una corrida en TLC para corroborar la presencia de triterpenos, dichos resultados se evidencian en la Figura N° 4.2.



Figura 4.2. TLC de las fracciones obtenidas por TMB en 2 sistemas de solvente 1. Butanol, Acetato de Etilo, Amoniaco y agua (6:4:0,5:1), 2. Hexano, Acetato de etilo, Metanol y agua (5:2:5:2), revelador paranisaldehido sulfúrico.

Para el análisis HPLC con detección UV a 201nm se utilizó como estándar el ácido asiático, cuya curva de calibración se realizó con un intervalo de concentración entre 50ppm - 1000ppm, obteniendo un  $r^2$  de 0,9933. En la tabla 4.1. y en las figuras N° 4.3, 4.4, 4.5 y 4.6 se evidencian los resultados obtenidos.

Tabla 4.1. Áreas bajo la curva de los distintos extractos de las tres regiones

REGION	PROPORCIÓN SOLVENTES	% DE VEGETAL	AREA BAJO LA CURVA	CÁLCULO DE CONCENTRACIÓN TERPENOS Eqq AA (mg/mL) $y = 30442x + 1269.2$ $x = (y - 1269.2) / 30442$
Biobío	ETANOL:H <sub>2</sub> O	1%	17185,76	0,52
		5%	29325,24	0,92
		10%	30420,71	0,96
	PROPANODIOL: H <sub>2</sub> O	1%	1735,96	0,02
		5%	3272,90	0,07
		10%	4453,50	0,10
	ETANOL:PROPANO DIOL:H <sub>2</sub> O	1%	4858,66	0,12
		5%	5338,90	0,13
		10%	5634,48	0,14
Araucanía	ETANOL:H <sub>2</sub> O	1%	19267,20	0,59
		5%	21182,67	0,65
		10%	24411,73	0,76
	PROPANODIOL: H <sub>2</sub> O	1%	2667,52	0,05
		5%	3624,70	0,08
		10%	3856,36	0,09
	ETANOL:PROPANO DIOL:H <sub>2</sub> O	1%	3019,28	0,06
		5%	3447,71	0,07
		10%	3329,03	0,07
Los Lagos	ETANOL:H <sub>2</sub> O	1%	12472,69	0,37
		5%	20014,90	0,62
		10%	22959,84	0,71
	PROPANODIOL: H <sub>2</sub> O	1%	1736,06	0,02
		5%	1652,68	0,01
		10%	2074,25	0,03
	ETANOL:PROPANO DIOL:H <sub>2</sub> O	1%	2004,70	0,02
		5%	1984,69	0,02
		10%	3411,00	0,07

En la tabla 4.1 se evidencia que los extractos de las tres regiones macerados en etanol: agua 50:50 tienen una mayor capacidad de extracción de terpenos con respecto a los macerados con Propanodiol: Agua 50:50 y Etanol: Propanodiol: Agua 15:35:50, por lo que este fue el solvente de elección. Además, las concentraciones obtenidas de triterpenos son mayores en la región del Biobío. Con respecto a la cantidad de material vegetal adicionado; el 5% fue el seleccionado, puesto que la concentración de triterpenos obtenida no presenta diferencia significativa entre este porcentaje y el 10% con un  $p < 0,05$ , como se observa en la figura 4.7.

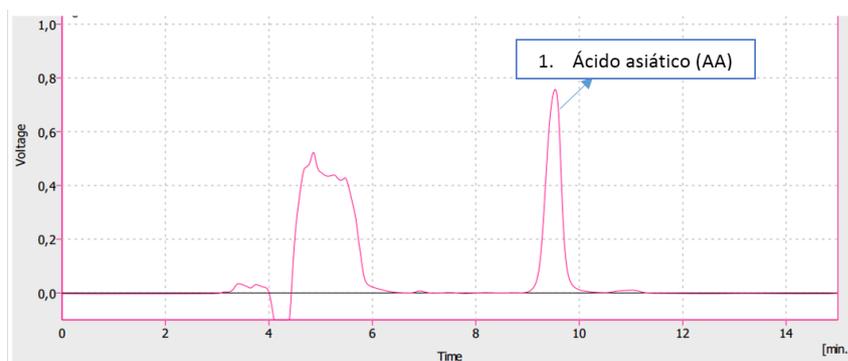


Figura 4.3. Cromatograma de estándar de Ácido asiático

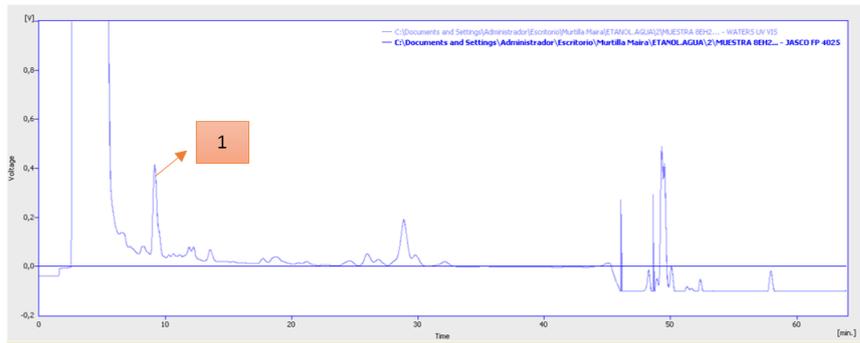


Figura 4.4. Cromatograma de extracto hidroalcohólico de la región del Biobío

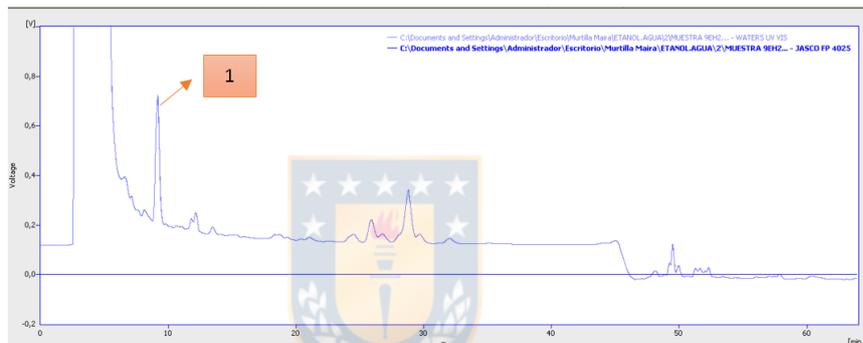


Figura 4.5. Cromatograma de extracto hidroalcohólico de la región de la Araucanía

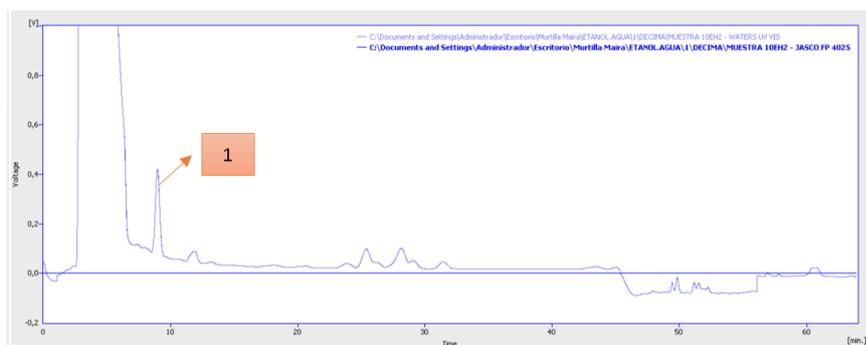


Figura 4.6. Cromatograma de extracto hidroalcohólico de la región de Los Lagos

En las figuras N° 4.4, 4.5 y 4.6 se evidencian los cromatogramas de los extractos hidroalcohólicos del Biobío, Araucanía y los Lagos respectivamente, aquí se puede evidenciar que los extractos obtenidos del Biobío poseen una mayor concentración de triterpenos en relación a los extractos de las otras dos regiones, situación que se denota claramente en la figura 4.8 .

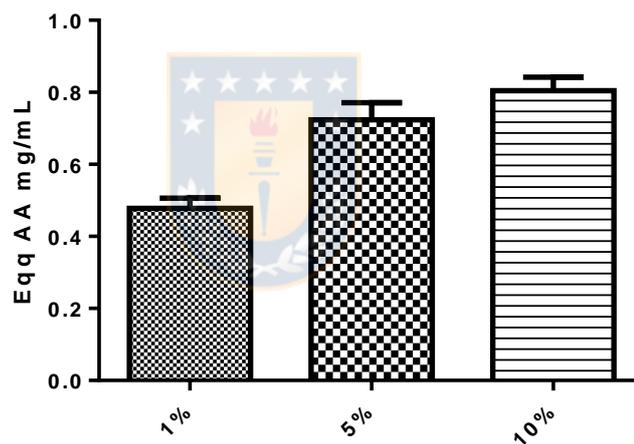


Figura 4.7 Concentración de terpenos en extractos con diferente % de material vegetal equivalentes a mg/mL de Acido Asiático. Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM. n = 3.

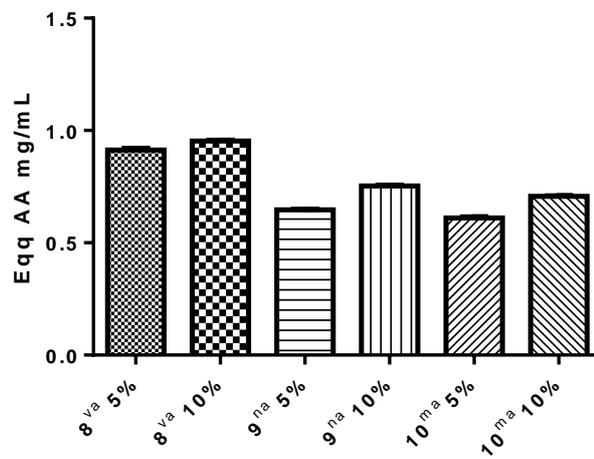


Figura 4.8 Concentración de terpenos en extractos por regiones, con diferente % de material vegetal equivalentes a mg/mL de Acido Asiático. Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM. n = 3. Donde 8<sup>va</sup> corresponde a la región del Biobío, 9<sup>na</sup> a la región de la Araucanía y 10<sup>ma</sup> a la región de los Lagos.



### 4.3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD SOBRE MEMBRANAS DE GLÓBULOS ROJOS

Para evaluar la actividad biológica de los extractos hidroalcohólicos 50:50 de las tres regiones, se mide por espectrofotometría UV a 540nm la interacción con las membranas de glóbulos rojos, dichos resultados se exponen en la tabla 4.2 y en la figura 4.9, donde se evidencia la capacidad hemolítica de estos, presentando una mayor hemólisis los extractos de la región de la Araucanía en relación a los extractos obtenidos del Biobío y Los Lagos, por lo que se decide trabajar con material vegetal de la Araucanía.

Tabla 4.2. Porcentaje de hemólisis de los extractos de las distintas regiones

Muestra	Concentración Extracto	A 1	A 2	A 3	% A1	% A2	A3%	% Hemolisis
Blanco PBS	-	0,092	0,092	0,092	4,61	4,62	4,60	4,61
Blanco H2O	-	2	2	2	100,00	100,00	100,00	100,00
Biobío	3%	0,832	0,844	0,884	41,68	42,20	44,18	42,69
Araucanía	3%	1,072	1,068	1,088	53,50	53,36	54,34	53,73
Los Lagos	3%	0,956	0,972	0,972	47,70	48,64	48,64	48,33

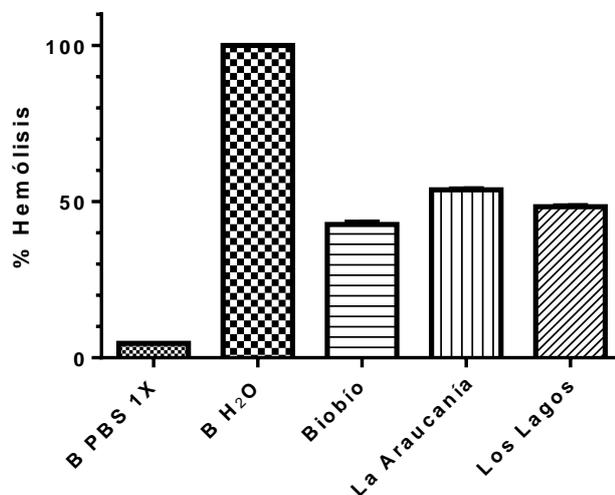


Figura 4.9 Porcentaje de hemólisis de los extractos de las distintas regiones. Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM. n = 3.



Si bien la mayor concentración de saponinas triterpénicas la posee la región del Biobío como se aprecia en la figura 4.8, los extractos de la Araucanía demostraron tener una mayor capacidad hemolítica, evidenciada en la figura N° 4.9, esto podría deberse a que las saponinas de la región del Biobío se encuentran en forma de geninas o de bidesmósidos mientras que las saponinas de la Araucanía podrían estar como monodesmósidos que son las más activas. La característica diferenciadora radica en la facilidad que tienen las saponinas monoglicosiladas para formar micelas y producir la lisis celular, mientras que las saponinas di y triglicosiladas pueden provocar un menor impacto, debido principalmente a un impedimento estérico. Siendo la presencia de terpenos activos

directamente proporcional al porcentaje de interacción con membranas biológicas. (Ahumada, Ortega, Chito, & Benítez, 2016)(Lopez Luengo, 2001)



#### **4.4. OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN TERPÉNICA DEL EXTRACTO SELECCIONADO POR TRUE MOVING BED (TMB)**

Al ser el extracto de la Araucanía, el que presenta mayor interacción con los glóbulos rojos, el aislamiento de la fracción triterpénica se realiza a partir de este; para el mismo se utilizó una serie de mezclas de solventes inmiscibles por TLC como se aprecia en la tabla 3.1 en la sección de metodología. Se observó que el vegetal poseía una mejor distribución de sus KDs en la fase S, apreciándose una distribución uniforme de los terpenos tanto en la fase superior como en la inferior como se demuestra en la figura 4.10; por lo que fue elegida para realizar la separación por TMB. El sistema de solvente elegido fue entonces: Hexano, acetato de etilo, metanol y agua (5:2:5:2) respectivamente. El rendimiento de fracción triterpénica en relación al extracto empleado es de un 5,21% (0,92 ± 0,04% respecto al extracto total).



Figura 4.10. Placa de TLC con diferentes proporciones de solventes descritos en la tabla 3.1 de extracto de U. molinae, (revelado con paranisaldehido sulfúrico).



#### **4.5. SELECCIÓN DE EXTRACTO ENRIQUECIDO CON LA FRACCIÓN TRITERPÉNICA, SEGÚN ACTIVIDAD EN ENSAYO**

##### *in vitro*

Teniendo la fracción triterpénica aislada y ya con una base de extracto. Se procedió adicionar diferentes porcentajes de esta, para evaluar su actividad hemolítica. Los porcentajes de adición: 0,25 – 0,5 - 0,75 % de fracción triterpénica. Teniendo como base un 1% de extracto.



En todos los casos se obtuvo un aumento de la capacidad hemolítica en relación al extracto solo. Pero en virtud de la cantidad de triterpenos obtenida y en base a que todos presentaron mejoría, se determinó trabajar con la concentración mínima de 0,25% de adición.

Teniendo establecida la base de extracto con la respectiva fracción triterpénica, se procedió además a enriquecer a los mismos, con especie vegetal *Capsicum spp* (2,8%, Eqq 0,15 de capsaïcina), que debería disminuir el fibroedema geloide mucoso subcutáneo.

Por otro lado se realizó el ensayo de hemólisis a cada una de los extractos de las especies vegetales individualmente y en mezclas con el extracto enriquecido con triterpenos obteniendo un porcentaje hemolítico superior en este último caso; como se observa en la figura 4.11. La comparación realizada por ANOVA evidencia cambios significativos en todos los casos con un  $p < 0,0001$ .

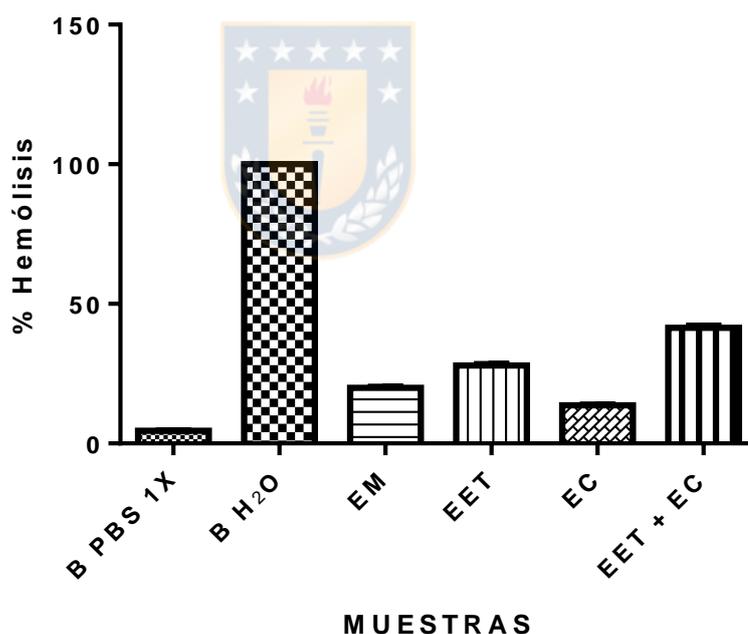


Figura 4.11 Porcentaje de hemólisis de los extractos de *U. molinae* con la adición de distintas especies vegetales. Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM.  $n = 3$ . Donde EM= Extracto de *U. molinae*, EET= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos, EC=Extracto de *Capsicum spp.*

Todos los extractos presentaron un grado de hemólisis, siendo superior en el extracto EET + EC seguido de EET, EM y EC respectivamente.

Se realizó el ensayo de hemólisis para seleccionar los extractos con mayor actividad biológica para incorporarlos en la base cosmética. Se espera obtener resultados similares en el estudio piloto.



#### 4.6. ESTANDARIZACIÓN DE EXTRACTOS

Los extractos se estandarizaron en base a la concentración de triterpenos, realizada por HPLC con detector UV a 201nm teniendo como estándar el ácido asiático, y las concentraciones obtenidas del extracto seleccionado correspondiente a la región de la Araucanía se observan en la tabla 4.3.

Tabla 4.3. Concentraciones de los triterpenos presentes en *U. molinae* de la región de la Araucanía, n=2

Nº	Tiempo de retención (min)	Area (mV.s)	Area (%)	Concentración mg/mL Eqq AA	mg Eqq AA/100g Ext
1	9,004	8493.03	26,40	0,24	237,45
2	25,568	1575.07	4,90	0,01	10,05
3	28,352	6061.80	18,9	0,16	157,53
4	31,692	2052.96	6,40	0,03	25,76
5	51,596	1482.68	4,60	0,01	7,02
6	60,868	3364.13	10,50	0,07	68,86

Los extractos son estandarizados en base a un marcador químico, en este caso se eligió el ácido asiático por ser representativo del extracto, fácilmente cuantificable y estable químicamente. En el cromatograma expuesto en la figura 4.3 el tiempo de retención para el estándar fue 8,864 min. Estos datos servirán como uno de los controles en los estudios de

estudios de estabilidad. Además, es parte importante dentro del etiquetado del producto final para obtener un producto homogéneo.



## 4.7. ELABORACIÓN DE FORMULACIONES

Las formulaciones fueron elaboradas con la base de gel proporcionada por N-active con los porcentajes de extracto descritos en la metodología en el punto 3.8.1. Además en la figura 4.12 se observan imágenes de las formulaciones finales.



Figura 4.12. Formulaciones con extractos de *U. molinae* con la adición de distintas especies vegetales. Donde P corresponde a la Formulación Placebo, EET: Formulación de extracto de *U. molinae* enriquecida con triterpenos y EETC: Formulación de de extracto de *U. molinae* enriquecida con triterpenos y extracto de *Capsicum spp*

El gel obtenido en todas las formulaciones con activos presentó una coloración café oscura uniforme, un olor agradable y característico en

cada formulación. Todas las especificaciones organolépticas obtenidas son expuestas en el punto 4.9.1.

Algo muy importante que resaltar es que al tratarse de una formulación tópica, proporciona una comodidad de administración y una baja o nula repercusión a nivel sistémico, aspecto importante al tratarse de terapias que se deben utilizar por largos periodos de tiempo.



#### 4.8. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD SOBRE MEMBRANAS DE GLÓBULOS ROJOS *in vitro* DE LAS FORMULACIONES

Se evalúa la actividad sobre membranas de glóbulos rojos de las formulaciones desarrolladas, obteniendo los valores observados en la tabla 4.4, evidenciándose la capacidad hemolítica de todas las formulaciones.

Tabla 4.4. Porcentaje de hemólisis de las diferentes formulaciones con extractos de *U. molinae* de la Araucanía. Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM. n = 3. Donde P= Placebo, EET= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos, EETC= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos y extracto de *Capsicum spp*

Muestra	Concentración Formulación	A 1	A 2	A 3	% A1	% A2	A3%	% Hemólisis
Blanco PBS	-	0,18	0,17	0,17	11,08	10,57	10,60	10,8
Blanco H2O	-	1,60	1,62	1,64	100,00	100,00	100,00	100,0
P	-	1,33	1,33	1,36	83,13	82,10	82,93	82,7
EET	10%	1,53	1,53	1,61	95,63	94,44	98,17	96,1
ETC	10%	1,45	1,49	1,46	90,63	91,98	89,02	90,5

El porcentaje de hemólisis es importante en todas las formulaciones incluyendo el placebo, esto se debe a que entre los componentes de la base de gel, se encuentra el propanodiol que ha demostrado tener propiedades hemolíticas. Sin embargo, al adicionarle a esta base los extractos seleccionados, el grado de hemólisis aumenta.

La base utilizada para este tipo de estudios *in vitro* no es la más adecuada puesto que sus componentes presentan interacción directa con el parámetro a ser evaluado.



## **4.9. CONTROLES Y ESTUDIOS DE ESTABILIDAD**

Los resultados de los controles tecnológicos se describen a continuación:

### **4.9.1. Características organolépticas**

Los resultados de la inspección visual y sensorial de las siguientes características: color, olor y aspecto se presentan en la tabla 4.5, según la escala arbitraria para indicar la magnitud del cambio en una determinada característica, por ejemplo: NH: no hay cambios, + cambios leves, ++ cambios apreciables, +++ cambios significativos.

Tabla 4.5 Seguimientos de características organolépticas de las formulaciones en las diferentes condiciones, según el transcurso del tiempo. Donde P= Placebo, EET= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos, EETC= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos y extracto de *Capsicum spp*, EEN= Estudio de estabilidad en condiciones normales, EE1= Estudio de estabilidad acelerada en condiciones de T=30° HR=60% y EE2= Estudio de estabilidad acelerada en condiciones de T=40° HR=75%.

	MUESTRAS EE/TIEMPO	MES 0	APARIENCIA	MES 1	APARIENCIA	MES 2	APARIENCIA	MES 3	APARIENCIA	
COLOR	EEN	P	TRASLUCIDO	NH	TRASLUCIDO	NH	TRASLUCIDO	NH	TRASLUCIDO	NH
		EET	CAFÉ	NH	CAFÉ	NH	CAFÉ	NH	CAFÉ	NH
		EETC	CAFÉ	NH	CAFÉ	NH	CAFÉ	NH	CAFÉ	NH
	EE1	P	TRASLUCIDO	NH	TRASLUCIDO	NH	TRASLUCIDO	NH	TRASLUCIDO	NH
		EET	CAFÉ	NH	CAFÉ	NH	CAFÉ	NH	CAFÉ	NH
		EETC	CAFÉ	NH	CAFÉ	NH	CAFÉ	NH	CAFÉ	NH
	EE2	P	TRASLUCIDO	NH	TRASLUCIDO	NH	TRASLUCIDO	NH	TRASLUCIDO	NH
		EET	CAFÉ	NH	CAFÉ	NH	CAFÉ	NH	CAFÉ	NH
		EETC	CAFÉ	NH	CAFÉ	NH	CAFÉ	NH	CAFÉ	NH
OLOR	EEN	P	LIG. ALCOHOLICO	-	LIG. ALCOHOLICO	-	LIG. ALCOHOLICO	-	LIG. ALCOHOLICO	-
		EET	HERBAL	-	PLANTA	-	PLANTA	-	PLANTA	-
		EETC	PICANTE	-	PICANTE	-	PICANTE	-	PICANTE	-
	EE1	P	LIG. ALCOHOLICO	-	LIG. ALCOHOLICO	-	LIG. ALCOHOLICO	-	LIG. ALCOHOLICO	-
		EET	HERBAL	-	PLANTA	-	PLANTA	-	PLANTA	-
		EETC	PICANTE	-	PICANTE	-	PICANTE	-	PICANTE	-
	EE2	P	LIG. ALCOHOLICO	-	LIG. ALCOHOLICO	-	LIG. ALCOHOLICO	-	LIG. ALCOHOLICO	-
		EET	HERBAL	-	PLANTA	-	PLANTA	-	PLANTA	-
		EETC	PICANTE	-	PICANTE	-	PICANTE	-	PICANTE	-

Las características organolépticas estudiadas, fueron estables en el transcurso del tiempo en todas las condiciones.

## 4.9.2. Control de pH

Los resultados obtenidos de pH se observan en la tabla 7.1 en la sección anexos, además se realizó una comparación por ANOVA para ver si existieron cambios significativos en el transcurso del tiempo como se observa en las figuras 4.13, 4.14 y 4.15.

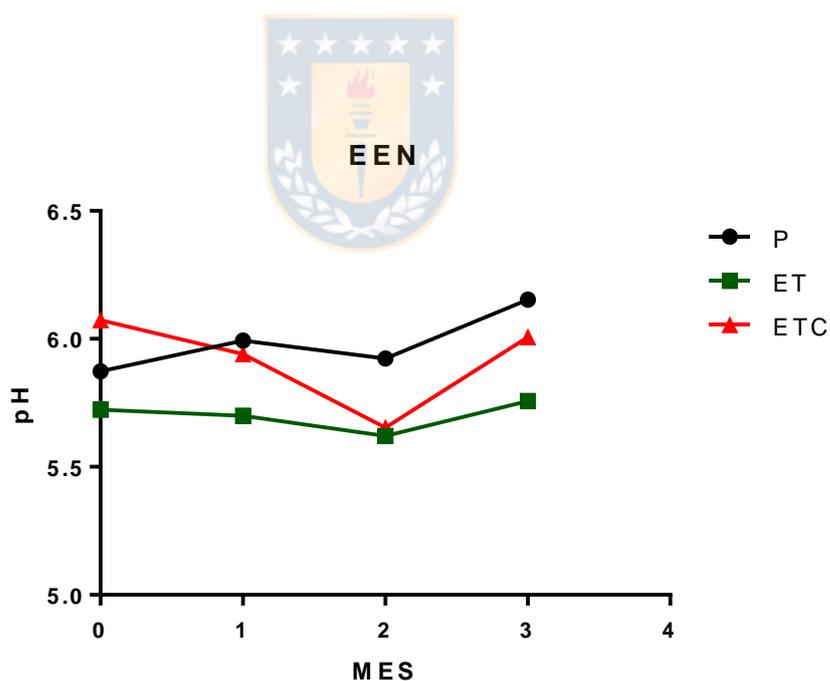


Figura 4.13 Variación de pH de las formulaciones en el transcurso del tiempo en condiciones normales. n=3. Donde P= Placebo, EET= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos, EETC= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos y extracto de *Capsicum spp*, EEN= Estudio de estabilidad en condiciones normales.

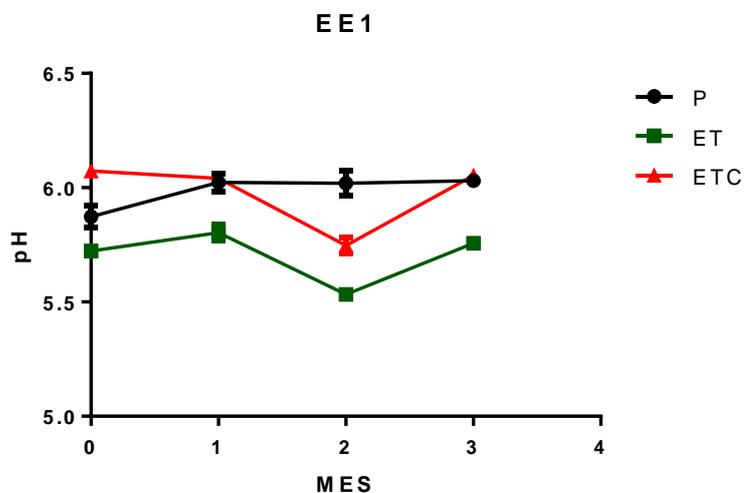


Figura 4.14 Variación de pH de las formulaciones en el transcurso del tiempo en condiciones aceleradas T= 30° HR= 60%. n=3. Donde P= Placebo, EET= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos, EETC= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos y extracto de *Capsicum spp* y EE1= Estudio de estabilidad acelerada en condiciones de T=30° HR=60%

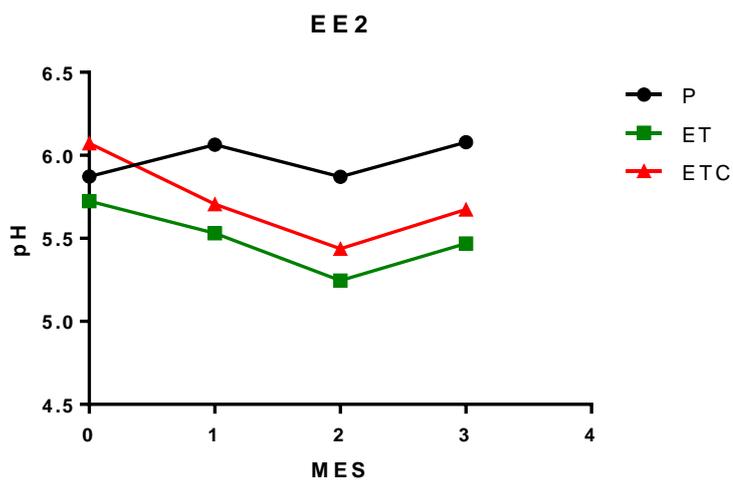


Figura 4.15 Variación de pH de las formulaciones en el transcurso del tiempo en condiciones aceleradas T= 40° HR= 75%. n=3. Donde P= Placebo, EET= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos, EETC= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos y extracto de *Capsicum spp* y EE2= Estudio de estabilidad acelerada en condiciones de T=40° HR=75%.

El análisis estadístico indica que hay variación significativa del pH en el transcurso del tiempo con un  $p < 0,05$  en todas las condiciones. Las variaciones son más pronunciadas en condiciones aceleradas, pero se mantiene dentro de los márgenes tolerables para la piel, además no interfiere en las características organolépticas.

#### **4.9.3. Control de viscosidad**

Para medir la viscosidad de las formulaciones se utilizó el viscosímetro con un spindle N°6, se realizaron las mediciones por triplicado y a diferentes rpm como se muestra desde la tabla 7.2 hasta la 7.4 en la sección anexos.

Los resultados obtenidos de viscosidad difieren según los extractos presentes en las formulaciones siendo superior en el placebo, seguido por el extracto enriquecido con triterpenos y finalmente la formulación ETC; esta variación se ve reflejada en todas las condiciones de almacenamiento, como también en las diferentes revoluciones por minuto a las que son sometidas las formulaciones. Conforme pasa el tiempo la viscosidad disminuye. Tendencia que se repite en todas.

Desde la figura 4.16 hasta la 4.23 se aprecian las variaciones de viscosidad en el transcurso del tiempo en las diferentes condiciones, siendo evidente el descenso de esta. Dichos resultados se encuentran en unidades de Pa. S.

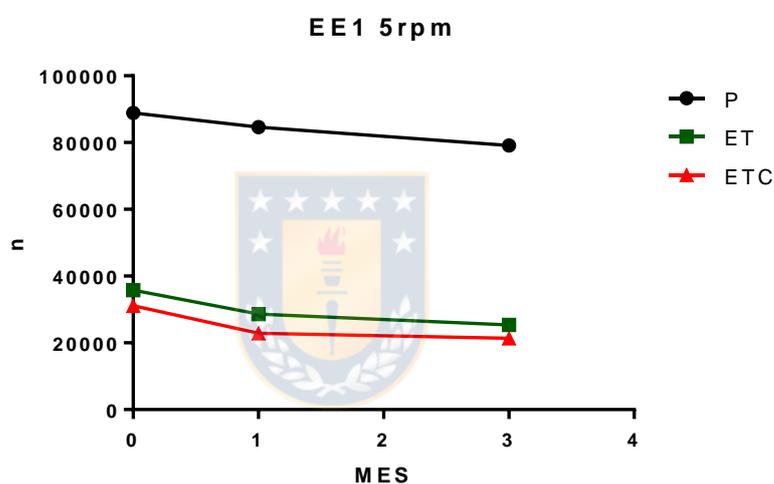


Figura 4.16 Variación de viscosidad de las formulaciones en el transcurso del tiempo en condiciones aceleradas a 5rpm T= 30° HR= 60%. Los valores se expresan como media ± SEM. n = 3. Donde P= Placebo, EET= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos, EETC= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos y extracto de *Capsicum spp* y EE1= Estudio de estabilidad acelerada en condiciones de T=30° HR=60%

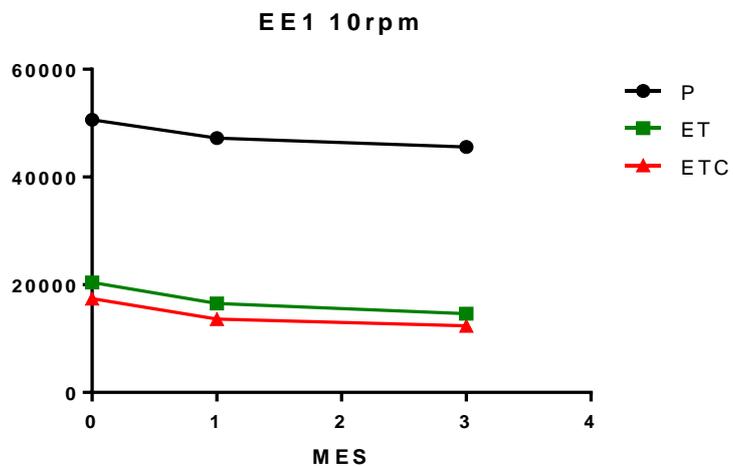


Figura 4.17 Variación de viscosidad de las formulaciones en el transcurso del tiempo en condiciones aceleradas a 10 rpm T= 30° HR= 60%. Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM. n = 3. Donde P= Placebo, EET= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos, EETC= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos y extracto de *Capsicum spp* y EE1= Estudio de estabilidad acelerada en condiciones de T=30° HR=60%.

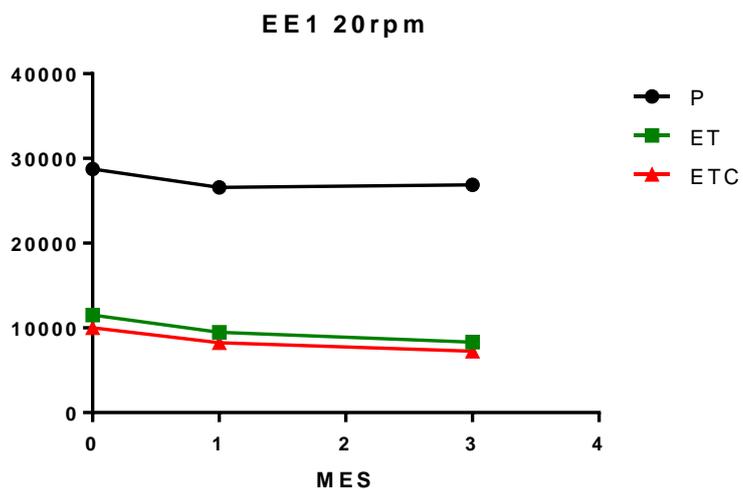


Figura 4.18 Variación de viscosidad de las formulaciones en el transcurso del tiempo en condiciones aceleradas a 20 rpm T= 30° HR= 60%. Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM. n = 3. Donde P= Placebo, EET= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos, EETC= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos y extracto de *Capsicum spp* y EE1= Estudio de estabilidad acelerada en condiciones de T=30° HR=60%.

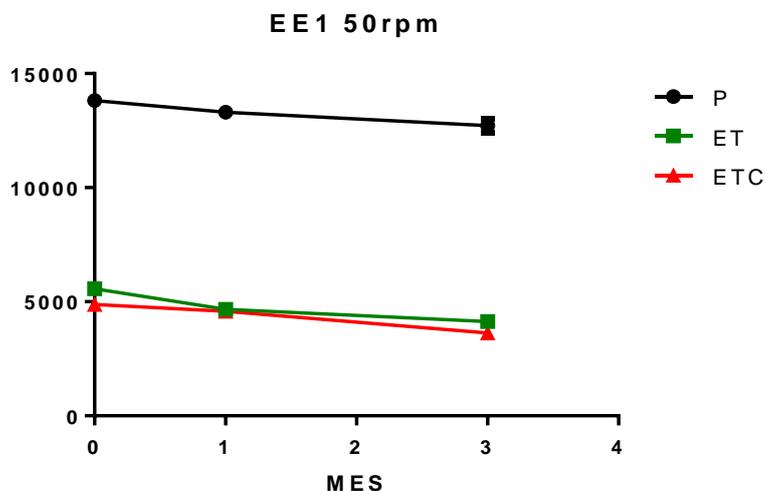


Figura 4.19 Variación de viscosidad de las formulaciones en el transcurso del tiempo en condiciones aceleradas a 50 rpm T= 30° HR= 60%. Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM. n = 3. Donde P= Placebo, EET= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos, EETC= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos y extracto de *Capsicum spp* y EE1= Estudio de estabilidad acelerada en condiciones de T=30° HR=60%.

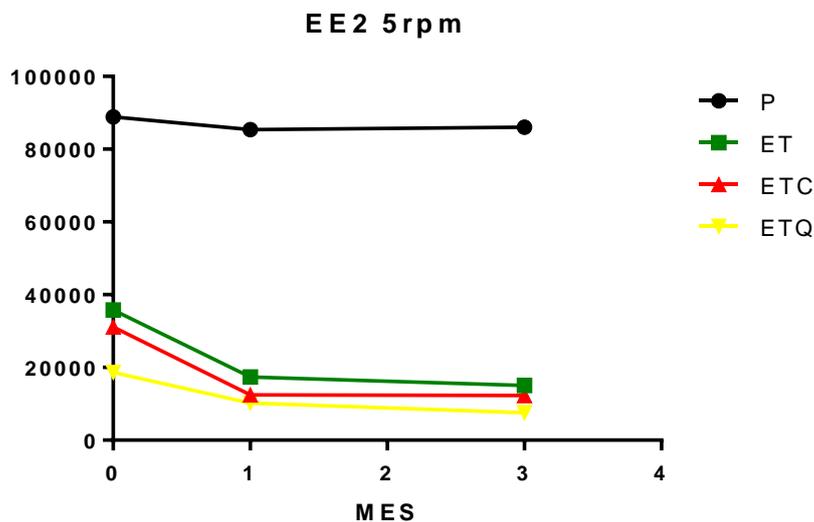


Figura 4.20 Variación de viscosidad de las formulaciones en el transcurso del tiempo en condiciones aceleradas a 5 rpm T= 40° HR= 75%. Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM. n = 3. Donde P= Placebo, EET= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos, EETC= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos y extracto de *Capsicum spp* y EE2= Estudio de estabilidad acelerada en condiciones de T=40° HR=75%.

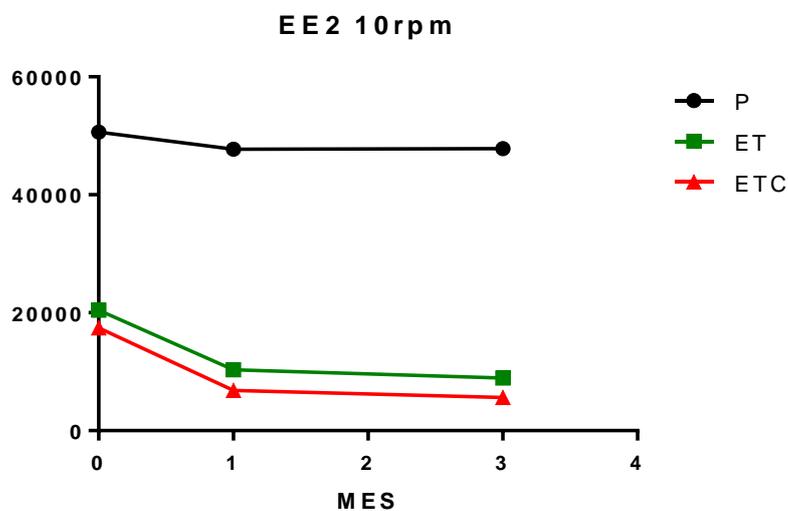


Figura 4.21 Variación de viscosidad de las formulaciones en el transcurso del tiempo en condiciones aceleradas a 10 rpm T= 40° HR= 75%. Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM. Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM. n = 3. Donde P= Placebo, EET= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos, EETC= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos y extracto de *Capsicum spp* y EE2= Estudio de estabilidad acelerada en condiciones de T=40° HR=75%.

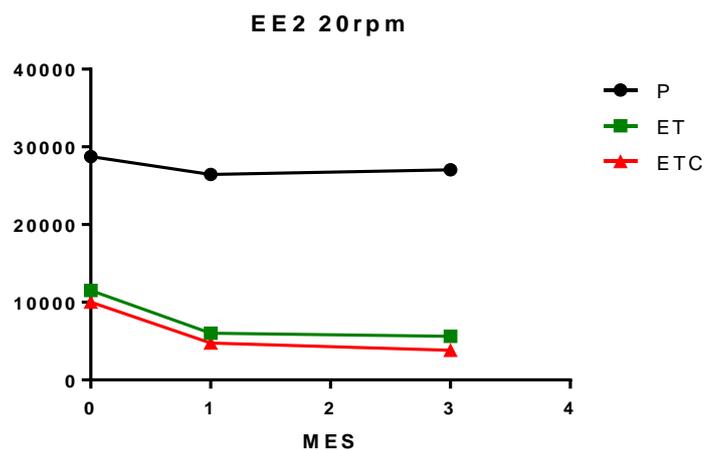


Figura 4.22 Variación de viscosidad de las formulaciones en el transcurso del tiempo en condiciones aceleradas a 20 rpm T= 40° HR= 75%. Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM. n = 3. Donde P= Placebo, EET= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos, EETC= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos y extracto de *Capsicum spp* y EE2= Estudio de estabilidad acelerada en condiciones de T=40° HR=75%.

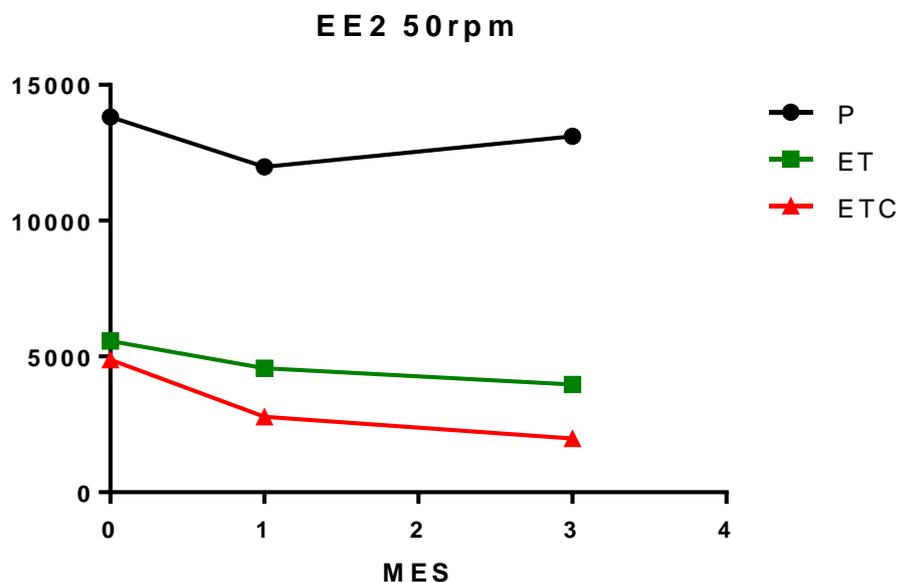


Figura 4.23 . Variación de viscosidad de las formulaciones en el transcurso del tiempo en condiciones aceleradas a 50 rpm T= 40° HR= 75%. Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM. n = 3. Donde P= Placebo, EET= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos, EETC= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos y extracto de *Capsicum spp* y EE2= Estudio de estabilidad acelerada en condiciones de T=40° HR=75%.

El análisis estadístico indica que hay variación significativa de la viscosidad en el transcurso del tiempo con un  $p < 0,05$  en todas las condiciones. La tendencia al descenso en todas las formulaciones, podría ser consecuencia de la recaptación de humedad por parte de las saponinas, puesto que estas son higroscópicas. Por lo tanto, se sugiere que las condiciones de almacenamiento sean lo más herméticas posibles.

#### 4.9.4. Control de crecimiento microbiano

Se realizó un recuento en placa para verificar si existe crecimiento microbiano en las formulaciones. Como se observa en la figura 4.24.



Figura 4.24. Recuento en placa de aerobios mesófilos de las diferentes formulaciones.

#### - Recuento en placa

Los resultados se exponen desde la tabla 4.6 hasta la 4.8, donde se evidencia la existencia o ausencia de crecimiento microbiano, transcurrido diferente tiempo de preparación de la formulación.

Tabla 4.6 Control microbiológico de formulaciones en condiciones normales ambientales. Donde EEN= Estudio de estabilidad en condiciones normales, P= Placebo, EET= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos y EETC= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos y *Capsicum spp.*

<b>EEN</b>			
TIEMPO (DÍAS)/FORMULACIONES	P	EET	EETC
0	+	+	+
15	+	+	+
30	+	+	+
90	-	-	-
120	-	-	-

Tabla 4.7 Control microbiológico de formulaciones en condiciones aceleradas T=30° y HR=60%. Donde EE1= Estudio de estabilidad en condiciones de T=30° y HR= 60%, P= Placebo, EET= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos y EETC= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos y *Capsicum spp*

<b>EE1</b>			
TIEMPO (DIAS)/FORMULACIÓN	P	EET	EETC
0	+	+	+
15	+	+	+
30	+	+	+
90	-	-	-
120	-	-	-

Tabla 4.8 Control microbiológico de formulaciones en condiciones aceleradas T=40° y HR=75%. Donde EE2= Estudio de estabilidad en condiciones de T=40° y HR= 75%, P= Placebo, EET= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos y EETC= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos y *Capsicum spp*

<b>EE2</b>			
TIEMPO (DIAS)/ FORMULACIÓN	P	EET	EETC
0	+	+	+
15	+	+	+
30	+	+	+
90	-	-	-
120	-	-	-

Los resultados no se condicen, ya que no hay un comportamiento lógico en el crecimiento microbiano. Esto podría deberse a una contaminación cruzada en el momento de realizar la siembra, ya que hay una disminución de carga microbiana tanto en la formulación placebo como en las que poseen activos.

#### 4.9.5. MARCADORES QUÍMICOS

El marcador químico utilizado fue el ácido asiático. Mismo que fue monitoreado para corroborar su presencia en las formulaciones empleadas. Cada formulación fue analizada por HPLC para corroborar la estabilidad de los triterpenos presentes en cada una de estas conforme pasaba el tiempo, los resultados se aprecian en la tabla 4.9.

Tabla 4.9 Variación de la concentración de los triterpenos presentes en la formulaciones en condiciones de estabilidad aceleradas T=40° y HR= 75%. Donde P= Placebo, EET= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos, EETC= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos y extracto de *Capsicum spp*

TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	mg Eqq AA/100g Extracto					
	FORMULACIÓN P		FORMULACIÓN EET		FORMULACIÓN EETC	
	MES 1	MES 3	MES 1	MES 3	MES 1	MES 3
4,37 ± 0,33	15,32	13,67	163,46	158,65	172,63	168,35
56,55 ± 3,14	-	-	28,34	29,62	27,40	25,32
57,92 ± 2,27	-	-	75,35	73,45	78,23	78,35

Al no identificar los mismos tiempos de retención que en el extracto puro, se sugiere que la base de gel presenta interacción con estos, formando puentes de hidrogeno entre el polialcohol (gel) y los azúcares del triterpeno, ocasionando que no se puedan liberar óptimamente de la matriz para su análisis químico; aunque los resultados obtenidos se mantienen constantes en el tiempo por lo que es químicamente estable.



#### **4.10. ESTUDIO DE CESIÓN DE LA FORMULACIÓN**

Los resultados obtenidos para cuantificar la cesión de triterpenos del medio receptor, luego de la confección de una nueva curva de calibración no pudieron ser expresados en las figuras; debido a que la cantidad de muestra que logra atravesar la membrana de celulosa en el transcurso de las 8 horas evaluadas es insuficiente para ser cuantificada, en todos los casos los puntos obtenidos estuvieron por debajo de los valores de la curva de calibración. Esto podría deberse a que la concentración liberada en el transcurso del tiempo estipulado, fue insuficiente para ser cuantificada. Se recomienda utilizar cantidades de gel mayores y realizar el estudio por un tiempo más prolongado.

## 4.11. ESTUDIO PILOTO

Los resultados expuestos en esta sección denotan la evolución de tres meses de administración de las formulaciones: P (Base de gel o placebo), EET (extracto de *U. molinae* (1%) enriquecido con triterpenos (0,25%) de la especie), EETC (extracto enriquecido de *U. molinae* (1%) con triterpenos (0,25%) de la especie y extracto de *Capsicum spp* (2,8%, Eqq 0,15% de capsaïcina).



### 4.11.1. Evaluación de la aplicación del gel por medio de sesión fotográfica

A continuación se muestran las figuras correspondientes a las fotografías de la evolución del tratamiento. Vale aclarar que ninguna de las voluntarias presentó reacción alérgica a las formulaciones.

- Formulación P

Los resultados de las sesiones fotográficas de las voluntarias de la formulación placebo (P) se presentan en la tabla 4.10, según la escala arbitraria para indicar intensidad del cambio registrado (aumento o disminución de la piel de naranja), por ejemplo: + cambios leves, ++ cambios apreciables, +++ cambios importantes. En caso de no existir variación se marca con + en el casillero “se mantiene”. La evolución del tratamiento de cada una de las voluntarias se ve reflejada de manera visual desde la figura 4.25 hasta la 4.34.

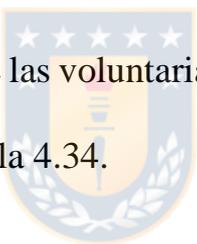


Tabla 4.10 Resultado de 3 meses de tratamiento de voluntarias con la formulación placebo.

FORMULACIÓN PLACEBO			
VOLUNTARIA	AUMENTA	DISMUYE	SE MANTIENE
1	+		
2	+		
3	+		
4	+		
5			+
6			+
7	+		
8			+
9	+		
10			+
TOTAL	6	0	4

## FOTOGRAFÍAS VOLUNTARIAS

### VOLUNTARIA 1

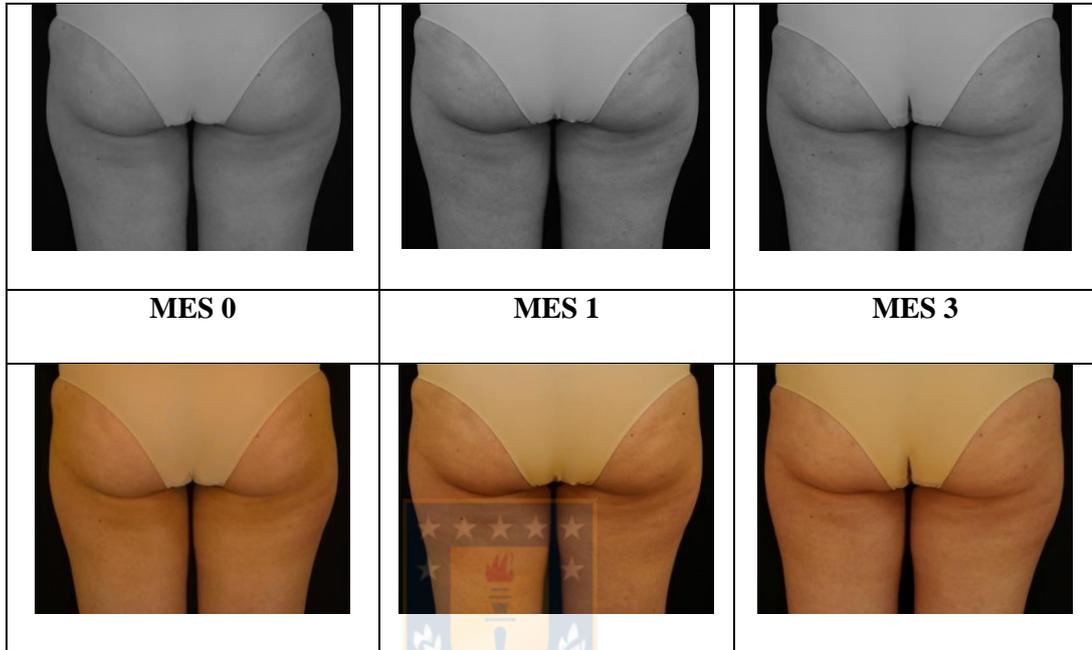


Figura 4.25. Evolución del tratamiento de la formulación P del mes 0 al 3 de la voluntaria 1.

### VOLUNTARIA 2



Figura 4.26. Evolución del tratamiento de la formulación P del mes 0 al 3 de la voluntaria 2.

**VOLUNTARIA 3**



Figura 4.27. Evolución del tratamiento de la formulación P del mes 0 al 3 de la voluntaria 3.



**VOLUNTARIA 4**

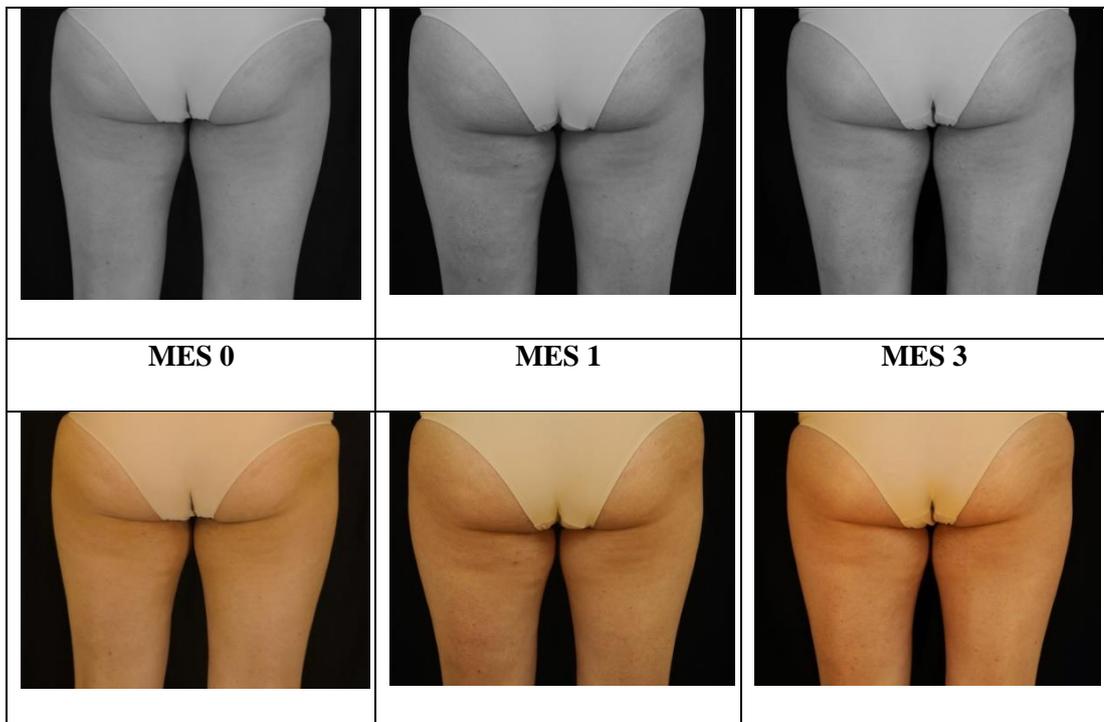


Figura 4.28. Evolución del tratamiento de la formulación P del mes 0 al 3 de la voluntaria 4.

### VOLUNTARIA 5

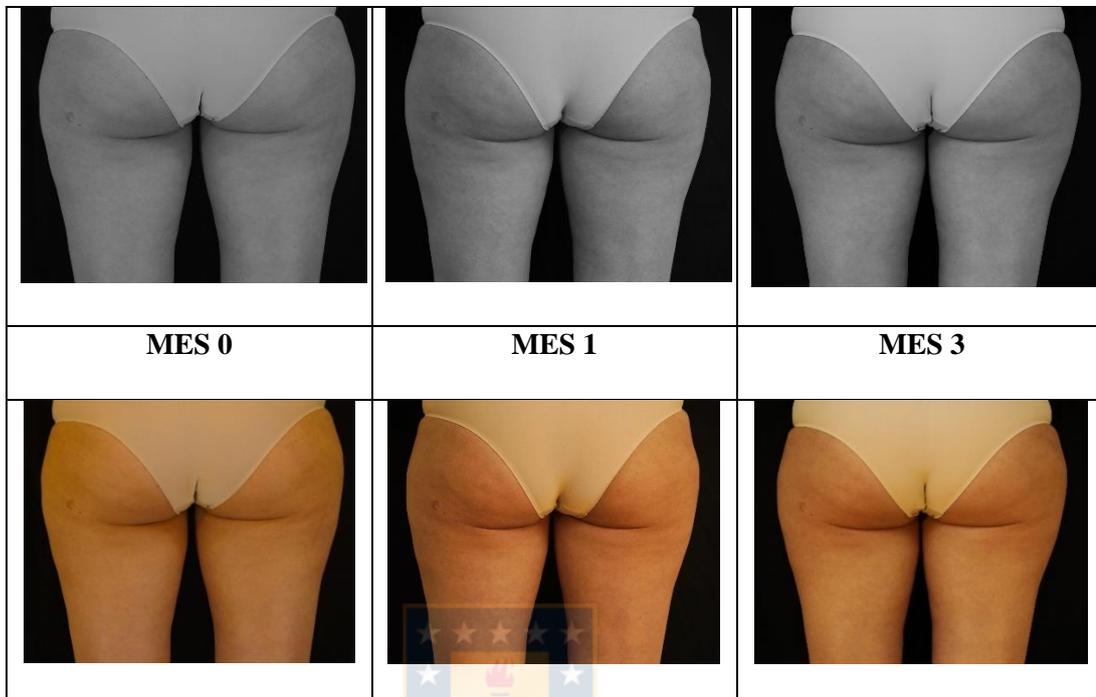


Figura 4.29. Evolución del tratamiento de la formulación P del mes 0 al 3 de la voluntaria 5.

### VOLUNTARIA 6

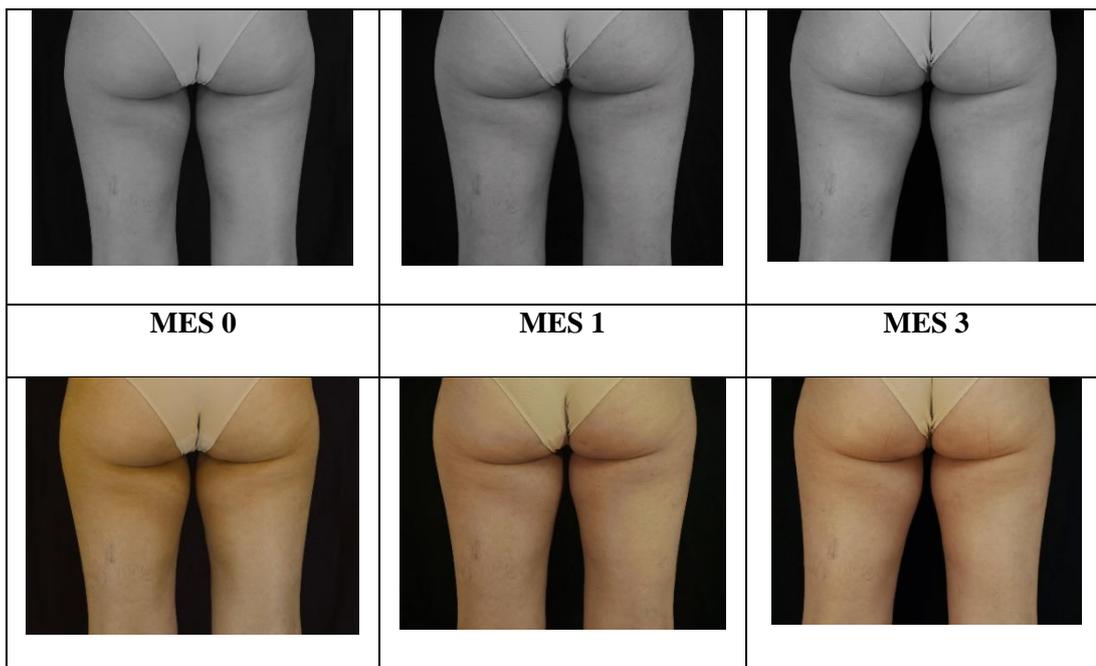


Figura 4.30. Evolución del tratamiento de la formulación P del mes 0 al 3 de la voluntaria 6.

### VOLUNTARIA 7

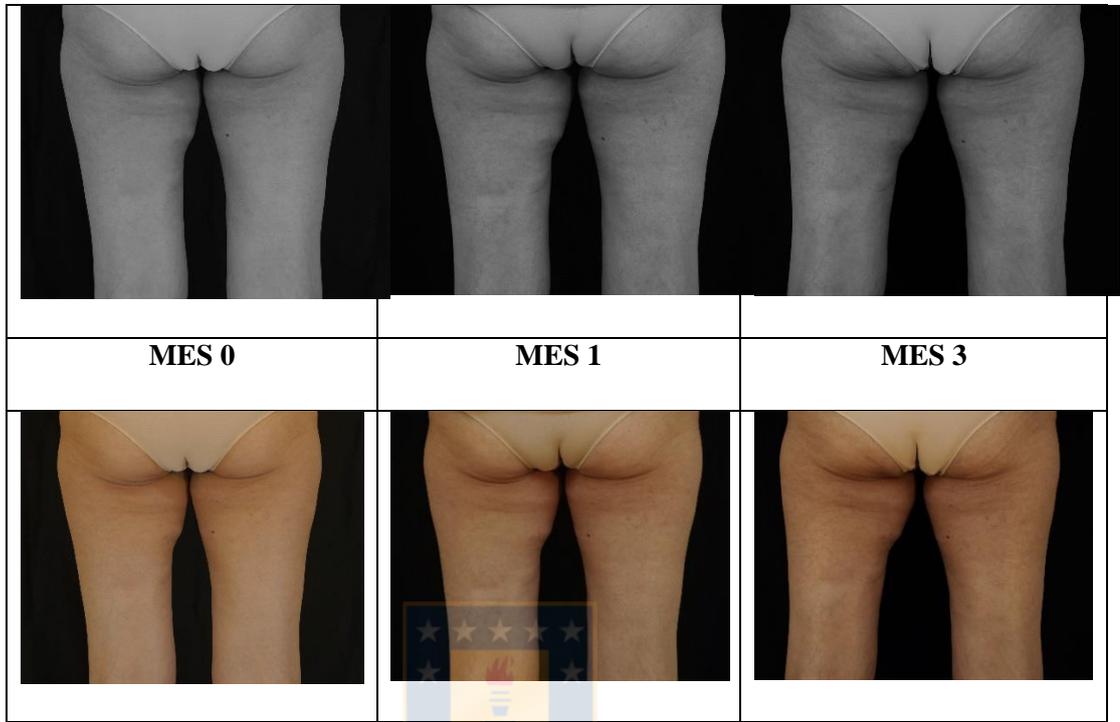


Figura 4.31. Evolución del tratamiento de la formulación P del mes 0 al 3 de la voluntaria 7.

### VOLUNTARIA 8

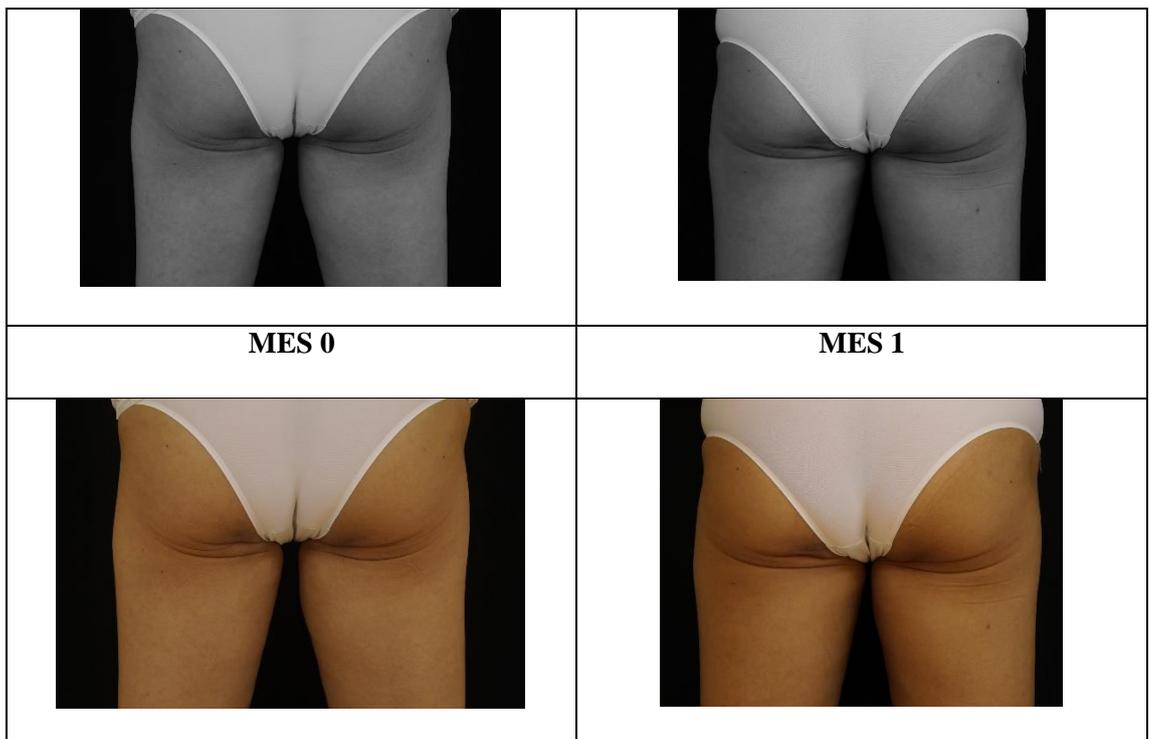


Figura 4.32. Evolución del tratamiento de la formulación P del mes 0 al 3 de la voluntaria 8.

**VOLUNTARIA 9**

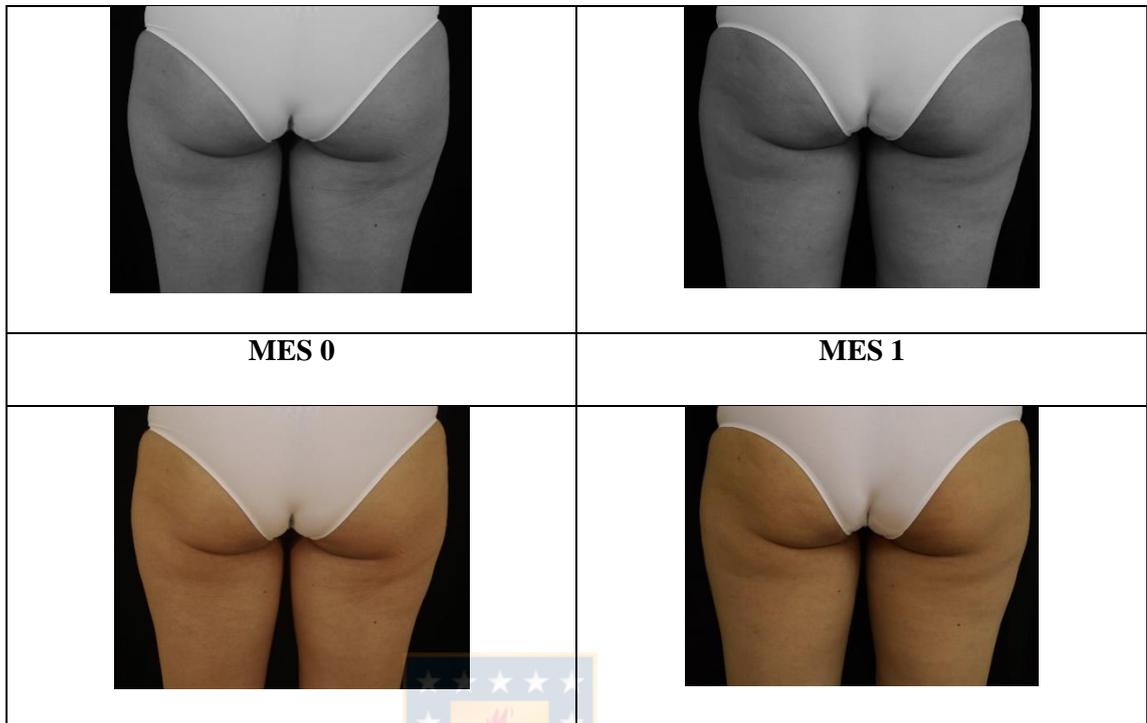


Figura 4.33. Evolución del tratamiento de la formulación P del mes 0 al 3 de la voluntaria 9.

**VOLUNTARIA 10**

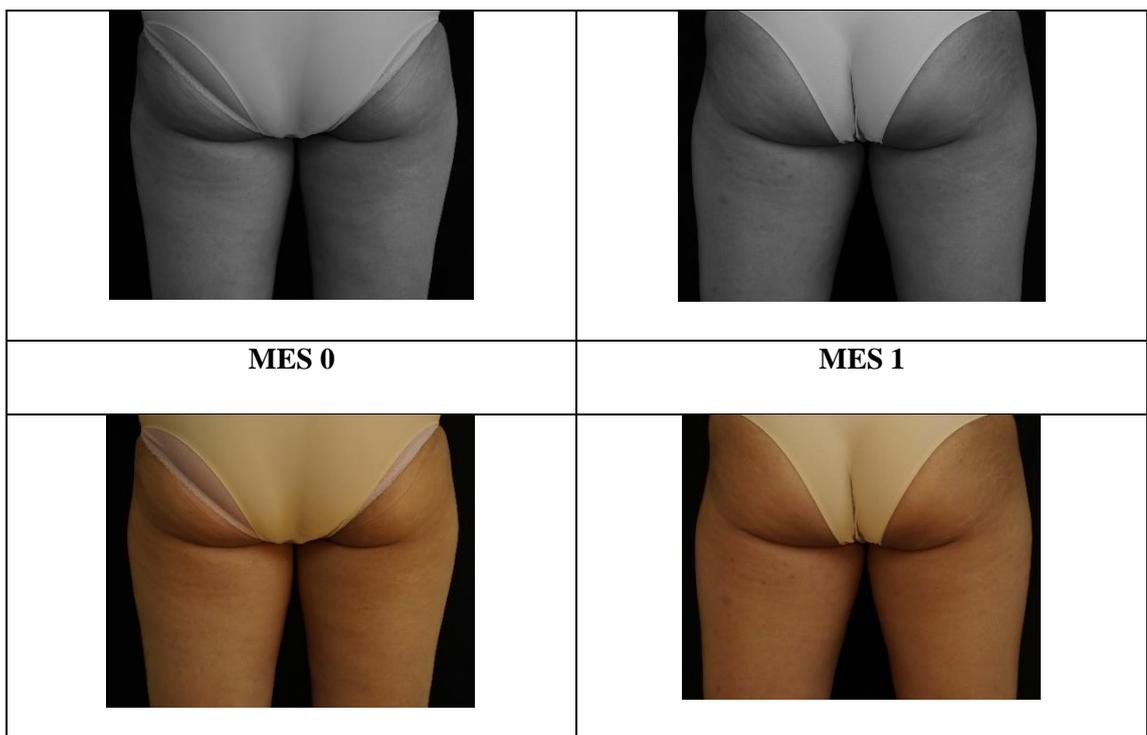


Figura 4.34. Evolución del tratamiento de la formulación P del mes 0 al 3 de la voluntaria 10.

En la formulación Placebo, en 6 de las voluntarias se denota un incremento del FGMS y las 4 restantes mantienen su estado inicial. Los motivos se desconocen.



### - Formulación de extracto enriquecido con triterpenos (EET)

Los resultados de las sesiones fotográficas de las voluntarias de la formulación EET se presentan en la tabla 4.11, según la escala arbitraria para indicar intensidad del cambio registrado (aumento o disminución de la piel de naranja), por ejemplo: + cambios leves, ++ cambios apreciables, +++ cambios importantes. En caso de no existir variación se marca con + en el casillero “se mantiene”. La evolución del tratamiento de cada una de las voluntarias se ve reflejada de manera visual desde la figura 4.35 hasta la 4.44.



Tabla 4.11 Resultado de 3 meses de tratamiento de voluntarias con la formulación EET.

FORMULACIÓN EET			
VOLUNTARIA	AUMENTA	DISMUYE	SE MANTIENE
1		+	
2		++	
3			+
4		++	
5	+		
6		++	
7		+	
8		+	
9		+	
10		+	
TOTAL	1	8	1

## FOTOGRAFÍAS VOLUNTARIAS

### VOLUNTARIA 1

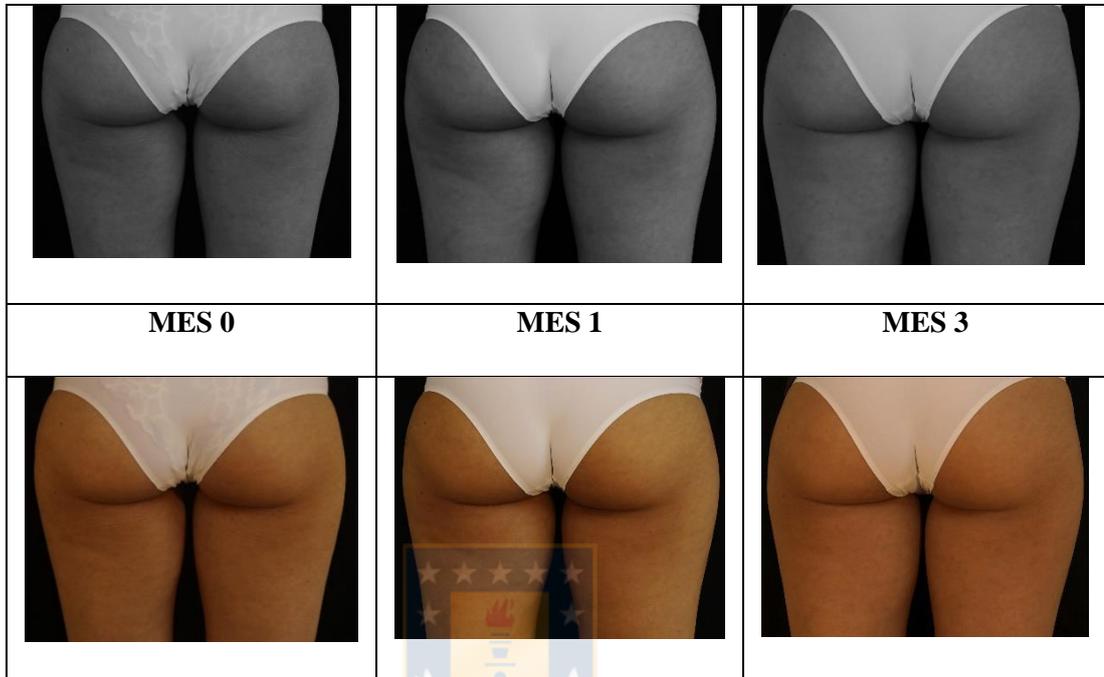


Figura 4.35. Evolución del tratamiento de la formulación EET del mes 0 al 3 de la voluntaria 1

### VOLUNTARIA 2

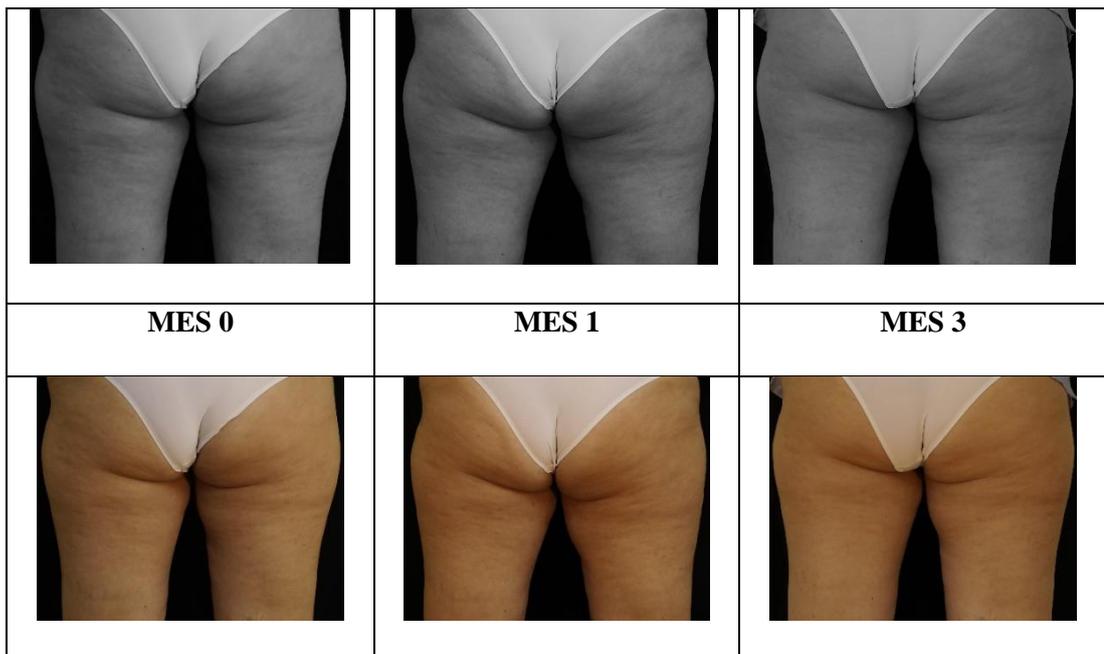


Figura 4.36. Evolución del tratamiento de la formulación EET del mes 0 al 3 de la voluntaria 2.

### VOLUNTARIA 3

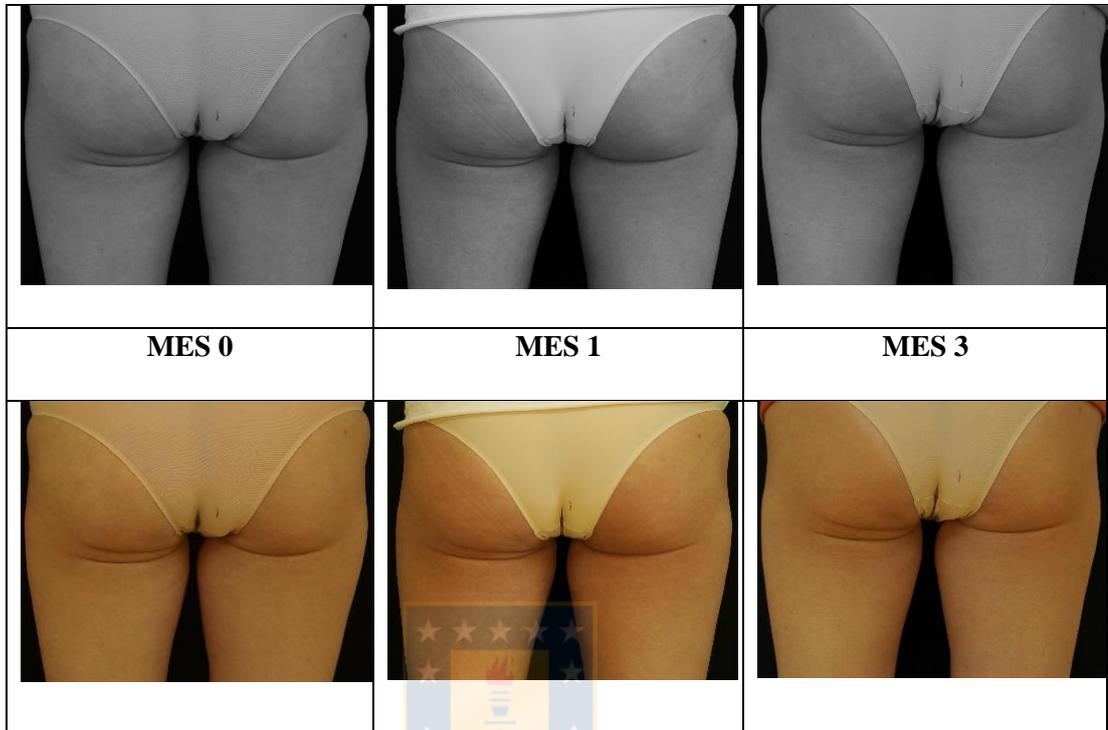


Figura 4.37. Evolución del tratamiento de la formulación EET del mes 0 al 3 de la voluntaria 3.

### VOLUNTARIA 4



Figura 4.38. Evolución del tratamiento de la formulación EET del mes 0 al 3 de la voluntaria 4.

### VOLUNTARIA 5

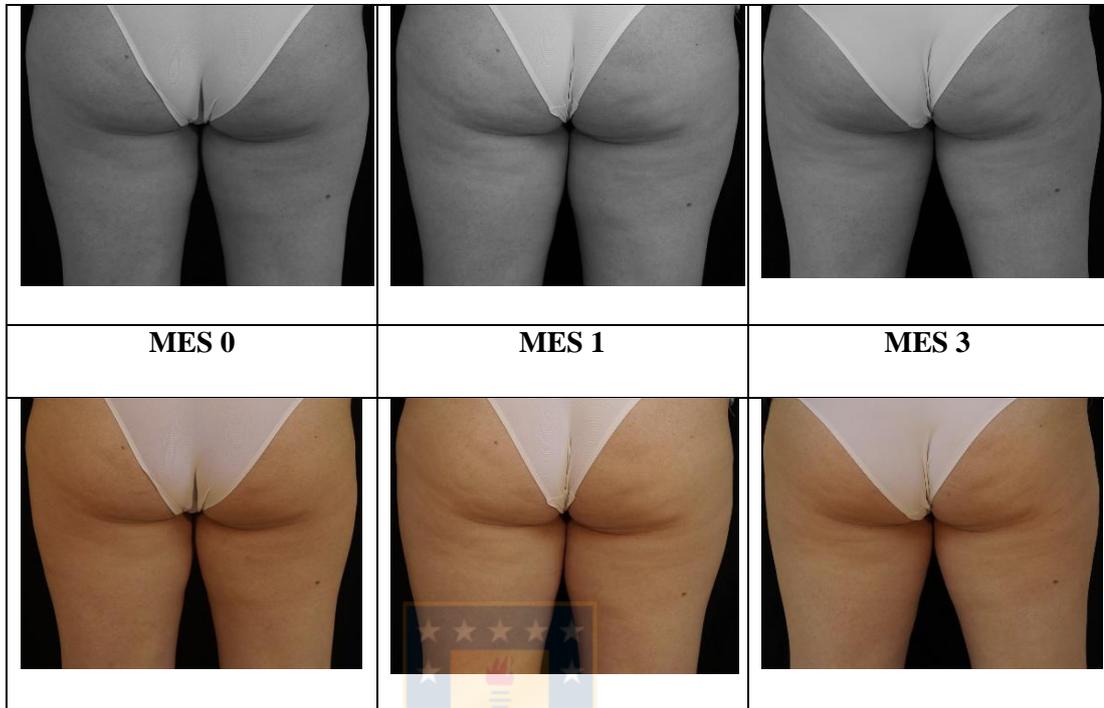


Figura 4.39. Evolución del tratamiento de la formulación EET del mes 0 al 3 de la voluntaria 5.

### VOLUNTARIA 6

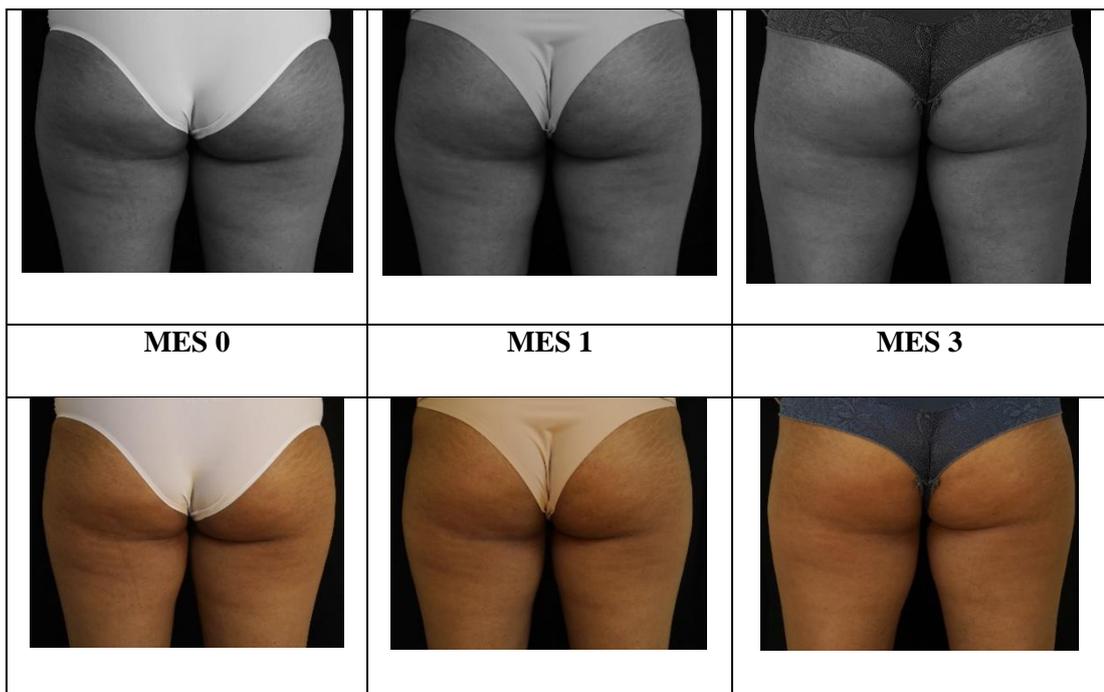


Figura 4.40. Evolución del tratamiento de la formulación EET del mes 0 al 3 de la voluntaria 6.

### VOLUNTARIA 7

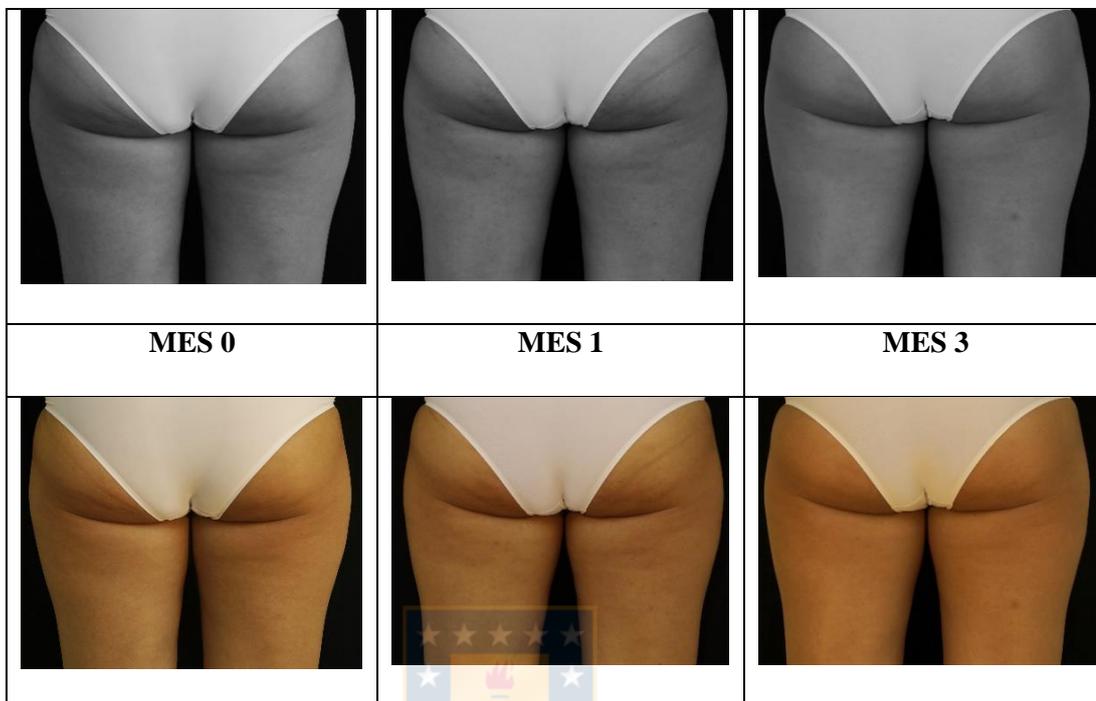


Figura 4.41. Evolución del tratamiento de la formulación EET del mes 0 al 3 de la voluntaria 7

### VOLUNTARIA 8

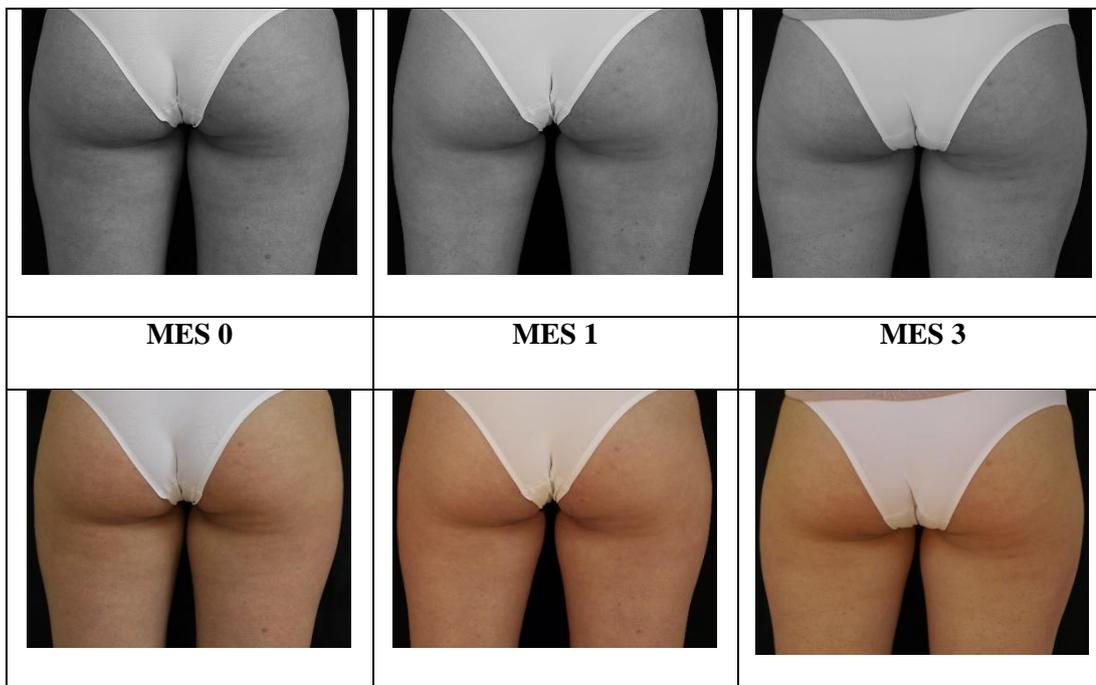


Figura 4.42. Evolución del tratamiento de la formulación EET del mes 0 al 3 de la voluntaria 8.

### VOLUNTARIA 9

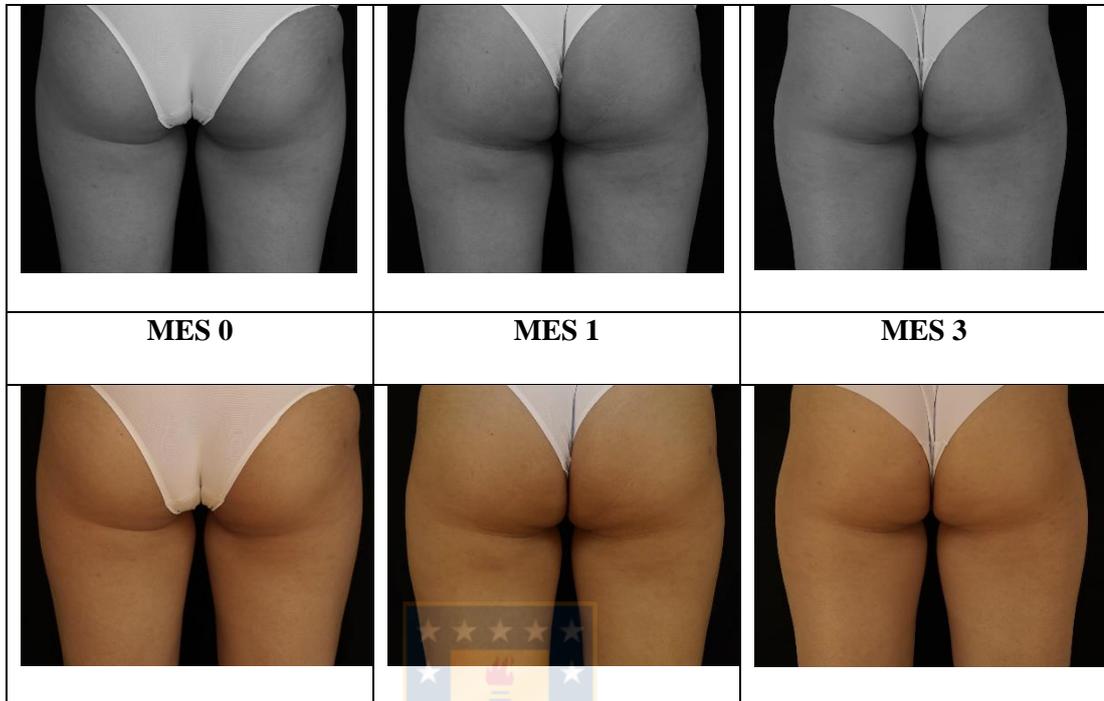


Figura 4.43. Evolución del tratamiento de la formulación EET del mes 0 al 3 de la voluntaria 9.

### VOLUNTARIA 10



Figura 4.44. Evolución del tratamiento de la formulación EET del mes 0 al 3 de la voluntaria 10.

En la formulación de Extracto enriquecido con triterpenos, 1 de las voluntarias presentó incremento de la FGMS y otra mantuvo su estado inicial. Mientras que las 8 restantes disminuyeron la apariencia de FGMS en diferentes grados. Lo que se atribuye al contenido de principios activos (triterpenos monodemosídicos).



**- Formulación extracto enriquecido con triterpenos y capsicum  
(EETC)**

Los resultados de las sesiones fotográficas de las voluntarias de la formulación EETC se presentan en la tabla 4.12, según la escala arbitraria para indicar intensidad del cambio registrado (aumento o disminución de la piel de naranja), por ejemplo: + cambios leves, ++ cambios apreciables, +++ cambios importantes. En caso de no existir variación se marca con + en el casillero “se mantiene”. La evolución del tratamiento de cada una de las voluntarias se ve reflejada de manera visual desde la figura 4.45 hasta la 4.46.



Tabla 4.12 Resultado de 3 meses de tratamiento de voluntarias con la formulación EETC. Donde EETC= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos de la especie y *Capsicum spp.*

FORMULACIÓN EETC			
VOLUNTARIA	AUMENTA	DISMUYE	SE MANTIENE
1		+	
2		++	
3		++	
4		+	
5			+
6		++	
7		+	
8	+		
9		++	
TOTAL	1	7	1

## FOTOGRAFÍAS VOLUNTARIAS

### VOLUNTARIA 1

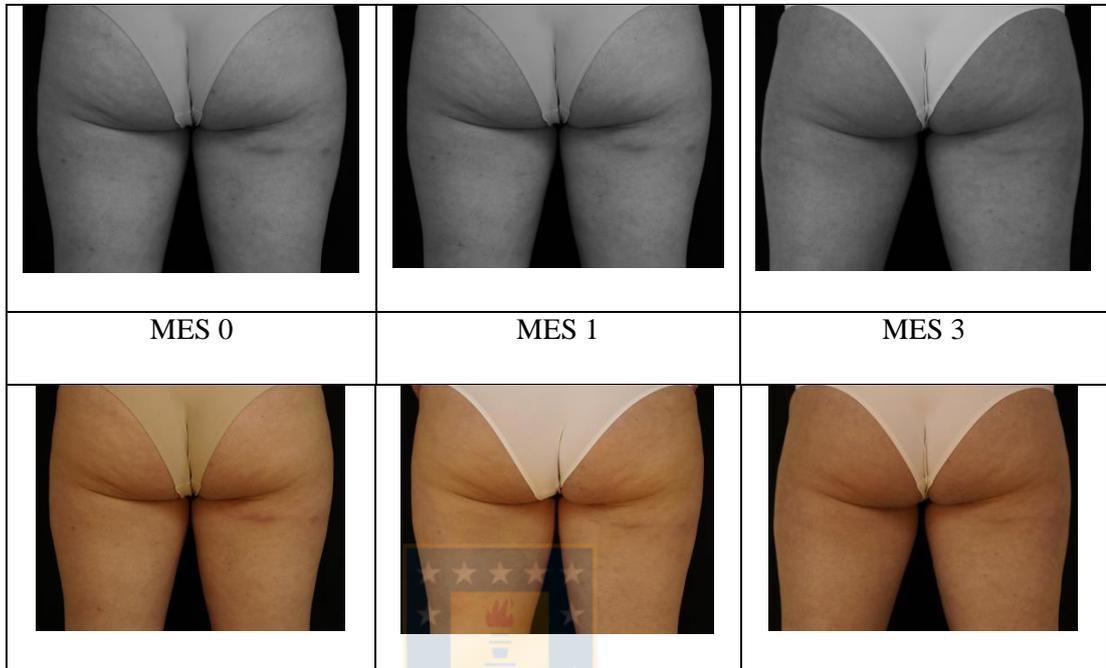


Figura 4.45. Evolución del tratamiento de la formulación EETC del mes 0 al 3 de la voluntaria 1.

### VOLUNTARIA 2

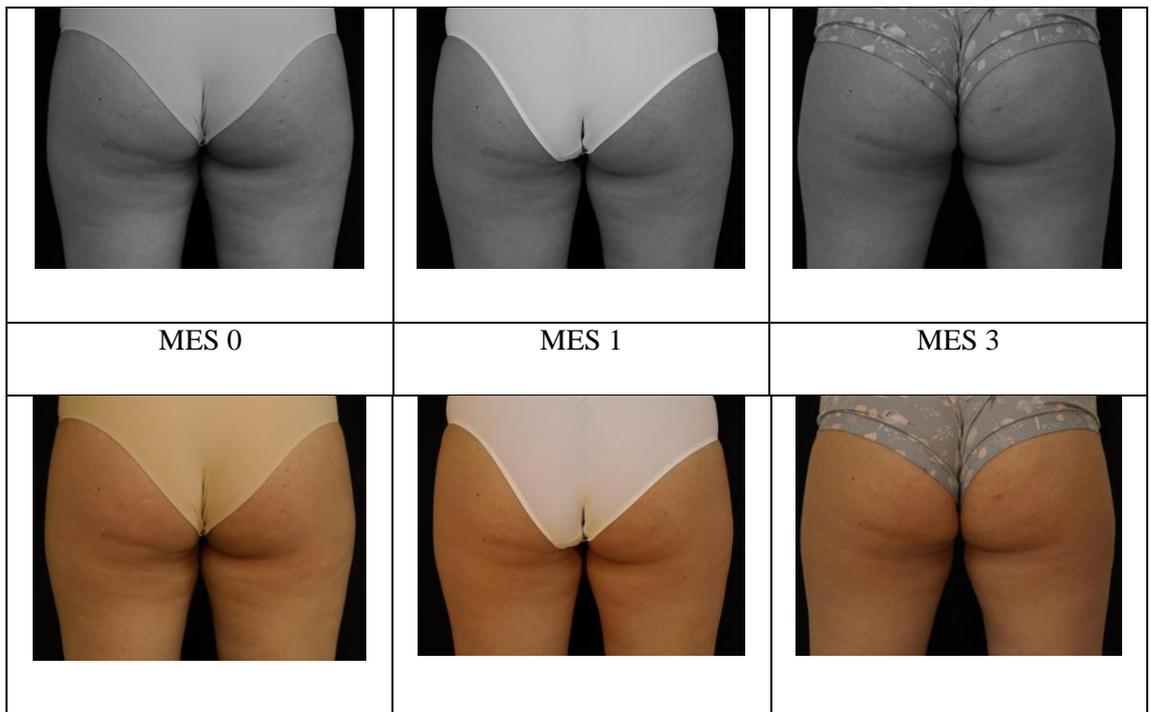


Figura 4.46. Evolución del tratamiento de la formulación EETC del mes 0 al 3 de la voluntaria 2.

### VOLUNTARIA 3

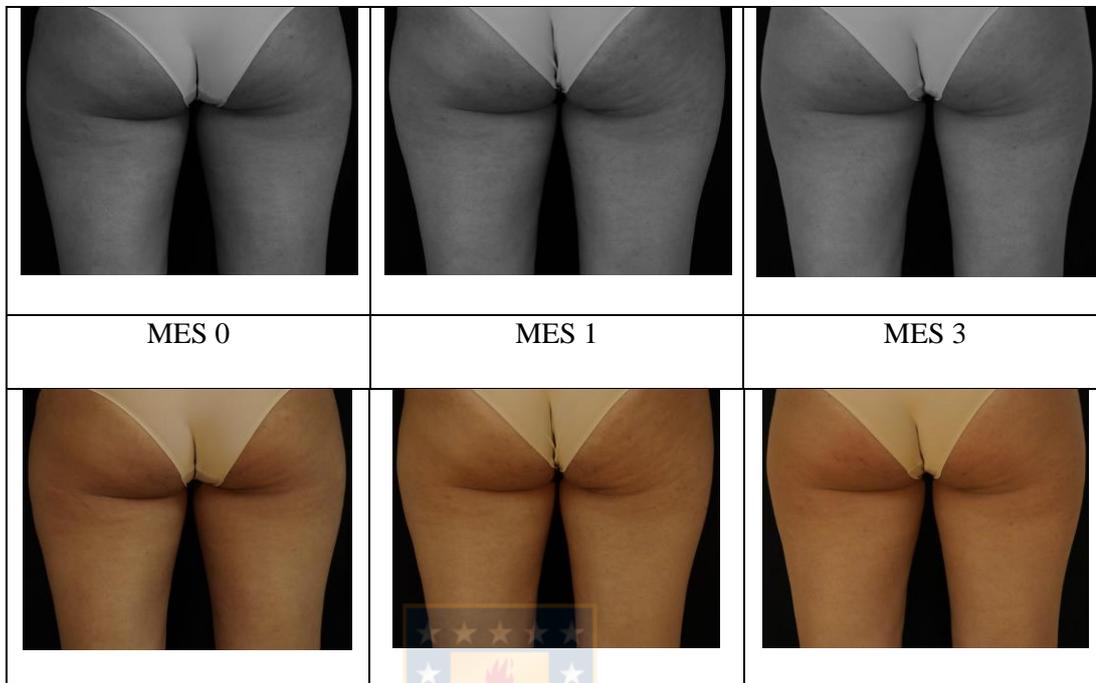


Figura 4.47. Evolución del tratamiento de la formulación EETC del mes 0 al 3 de la voluntaria 3.

### VOLUNTARIA 4

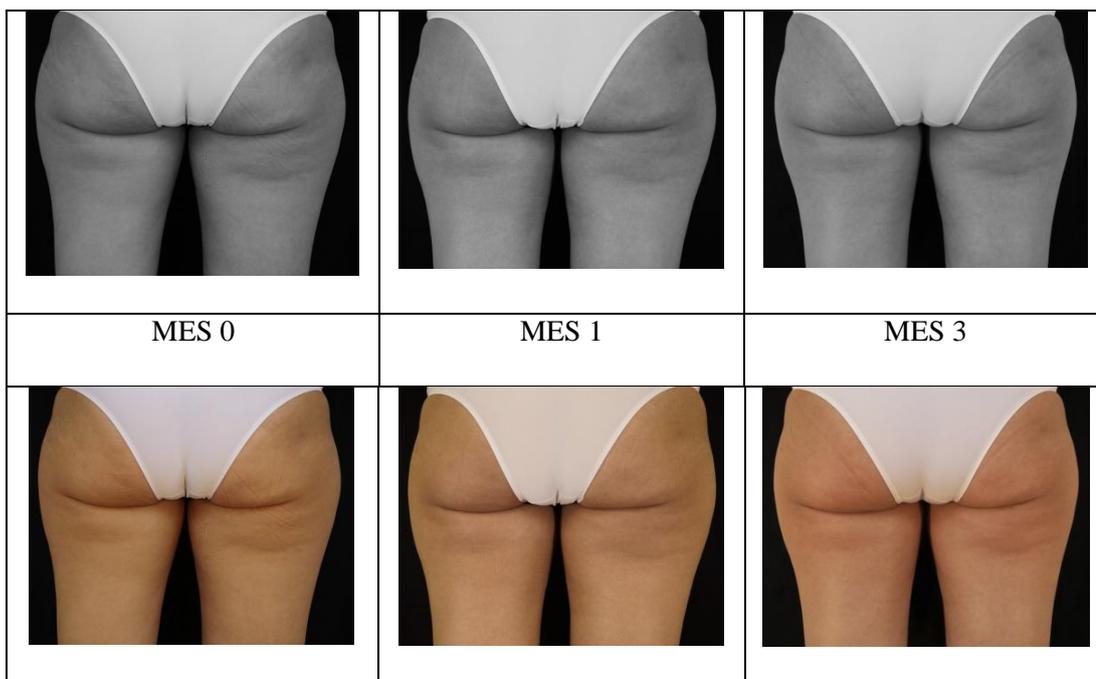


Figura 4.48. Evolución del tratamiento de la formulación EETC del mes 0 al 3 de la voluntaria 4.

### VOLUNTARIA 5

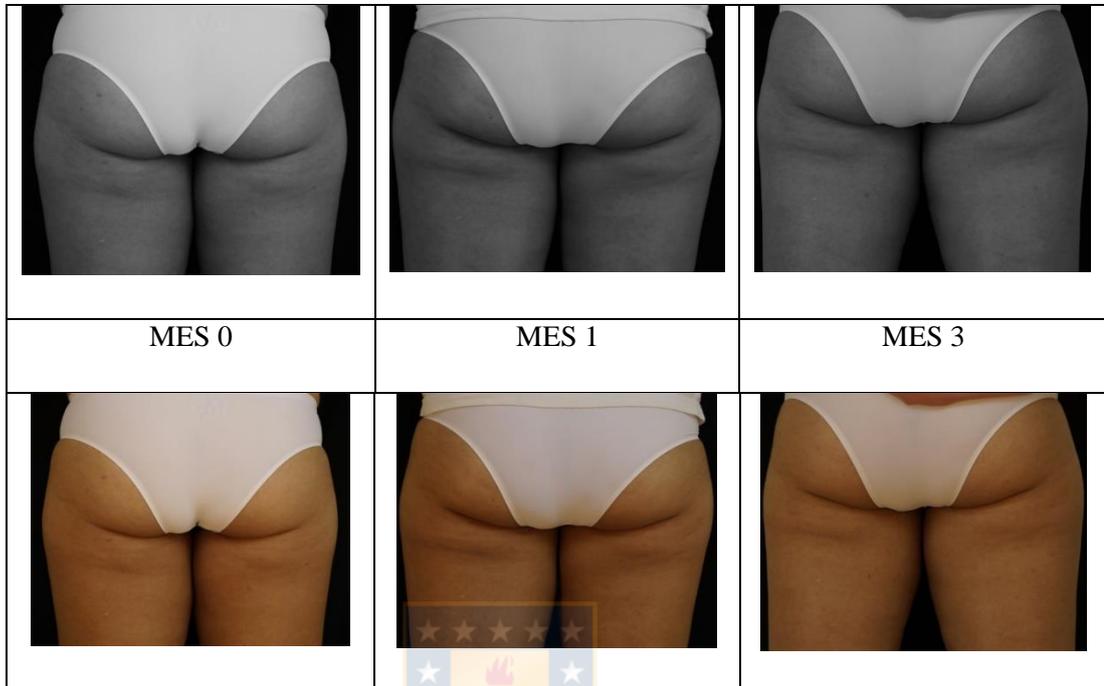


Figura 4.49. Evolución del tratamiento de la formulación EETC del mes 0 al 3 de la voluntaria 5.



### VOLUNTARIA 6

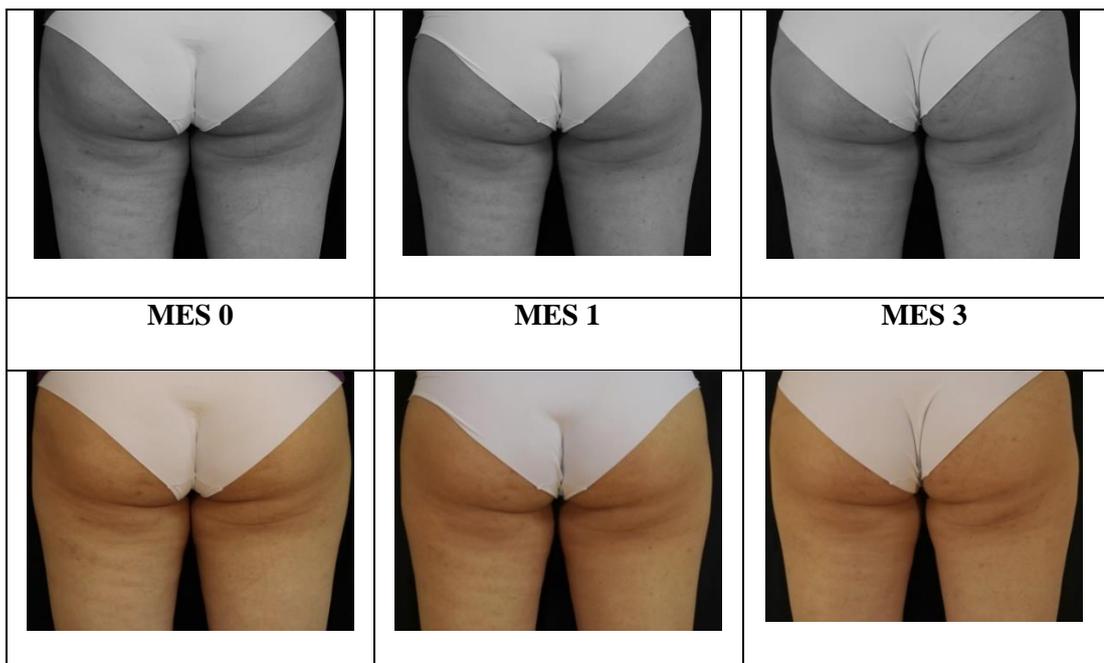


Figura 4.50. Evolución del tratamiento de la formulación EETC del mes 0 al 3 de la voluntaria 6.

### VOLUNTARIA 7

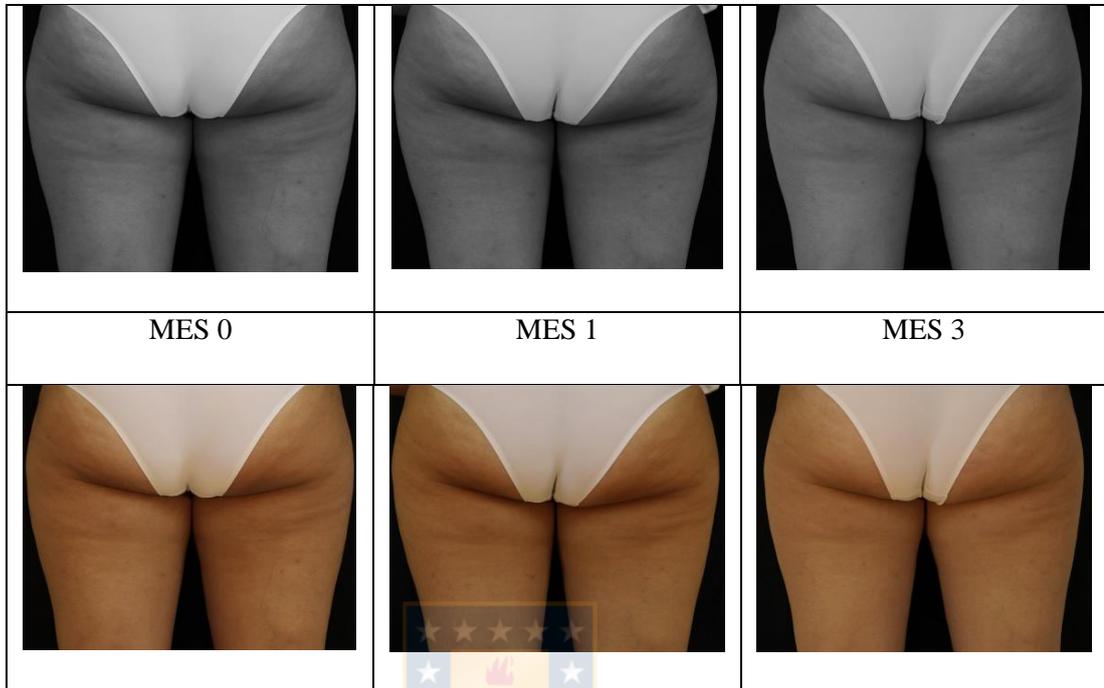


Figura 4.51. Evolución del tratamiento de la formulación EETC del mes 0 al 3 de la voluntaria 7.



### VOLUNTARIA 8

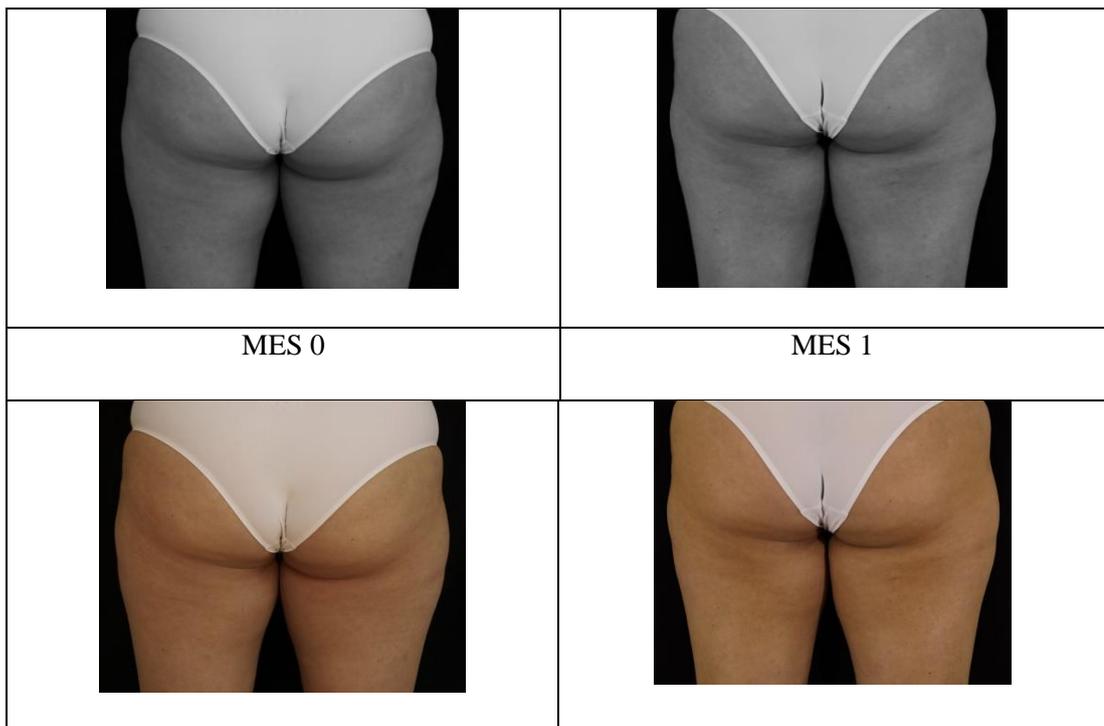


Figura 4.52. Evolución del tratamiento de la formulación EETC del mes 0 al 3 de la voluntaria 8.

### VOLUNTARIA 9



Figura 4.53. Evolución del tratamiento de la formulación EETC del mes 0 al 3 de la voluntaria 9.

En la formulación de extracto enriquecido con triterpenos con extracto de *Capsicum spp*, 1 de las voluntarias presento incremento de la FGMS y otra mantuvo su estado inicial. Mientras que las 7 restantes disminuyeron la apariencia de FGMS en diferentes grados y en mayor medida que las formulaciones anteriores. Lo que se atribuye al contenido de principios activos (triterpenos monodemosídicos y capsaícina).

Según el análisis cualitativo de las fotografías se observa que la formulación EETC es la que mejora la apariencia del FGMS en mayor proporción. Esto coincide con los resultados observados en los ensayos *in vitro*. Los efectos farmacológicos atribuidos a la capsaïcina dan paso a su aplicación a través del tracto gastrointestinal, como analgésico y en pérdida de peso. Investigaciones realizadas en roedores arrojó la disminución de tejido adiposo al aumentar la energía y el metabolismo energético; esto se debería a la activación del sistema nervioso que aumentaría la secreción de catecolaminas por la glándula suprarrenal.

Por otro lado la formulación P no presenta efectos beneficiosos sobre la piel con FGMS a pesar de haber observado un efecto sobre los glóbulos rojos, lo que indica que no hay efecto sobre el tejido adiposo *in vivo* pero si efecto hemolítico *in vitro*.

#### **4.11.2. Análisis de encuestas**

Con el propósito de evaluar la aceptación del producto, se realizó una encuesta de percepción a cada una de las voluntarias que participó en el

estudio, los resultados son expuestos en el presente trabajo considerando cada una de las formulaciones por separado.

A continuación se presentan desde la figura 4.54 a la 4.74 cada una de las interrogantes evaluadas con las respectivas respuestas agrupadas por formulación.

1.- En relación a los resultados esperados de aplicación gel entregados, por favor indique que tan de acuerdo o en desacuerdo se encuentra usted, con respecto a las siguientes afirmaciones:

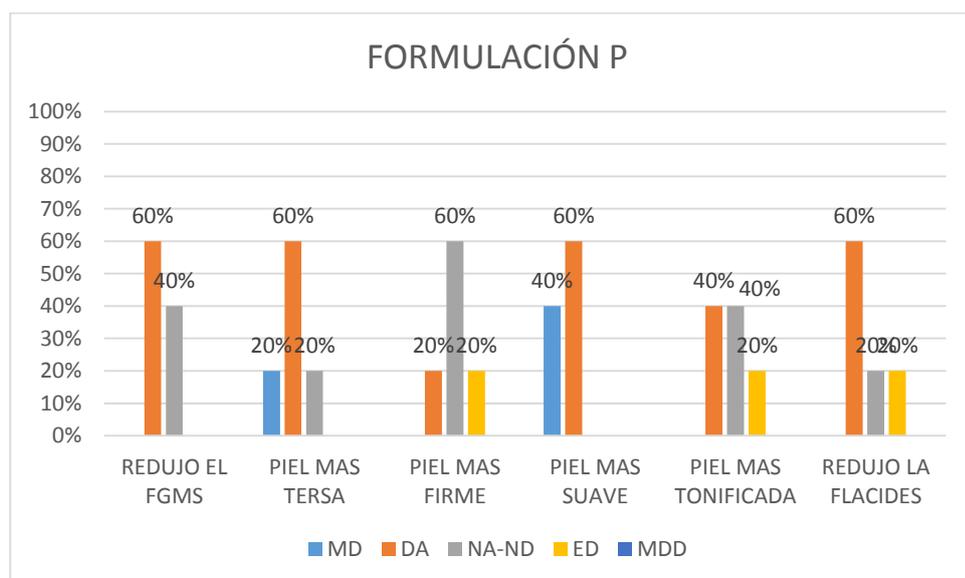


Figura 4.54 Percepción de voluntarias de la Formulación P. Donde P=Placebo, MD= Muy de acuerdo, DA= De acuerdo, NA-ND= ni de acuerdo, ni en desacuerdo, ED= En desacuerdo y MDD= Muy en desacuerdo.

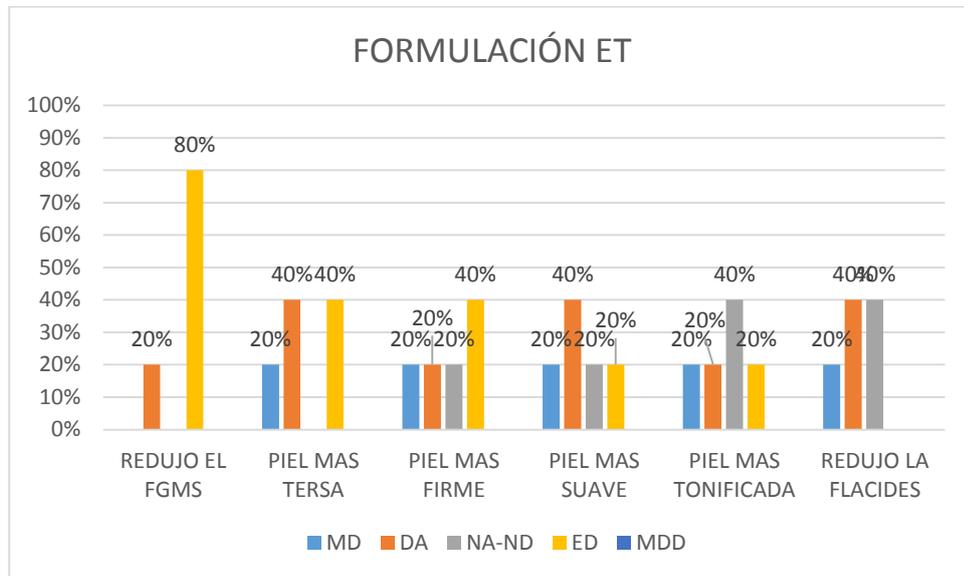


Figura 4.55 Percepción de voluntarias de la Formulación EET. Donde EET= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos de la especie, MD= Muy de acuerdo, DA= De acuerdo, NA-ND= ni de acuerdo, ni en desacuerdo, ED= En desacuerdo y MDD= Muy en desacuerdo.

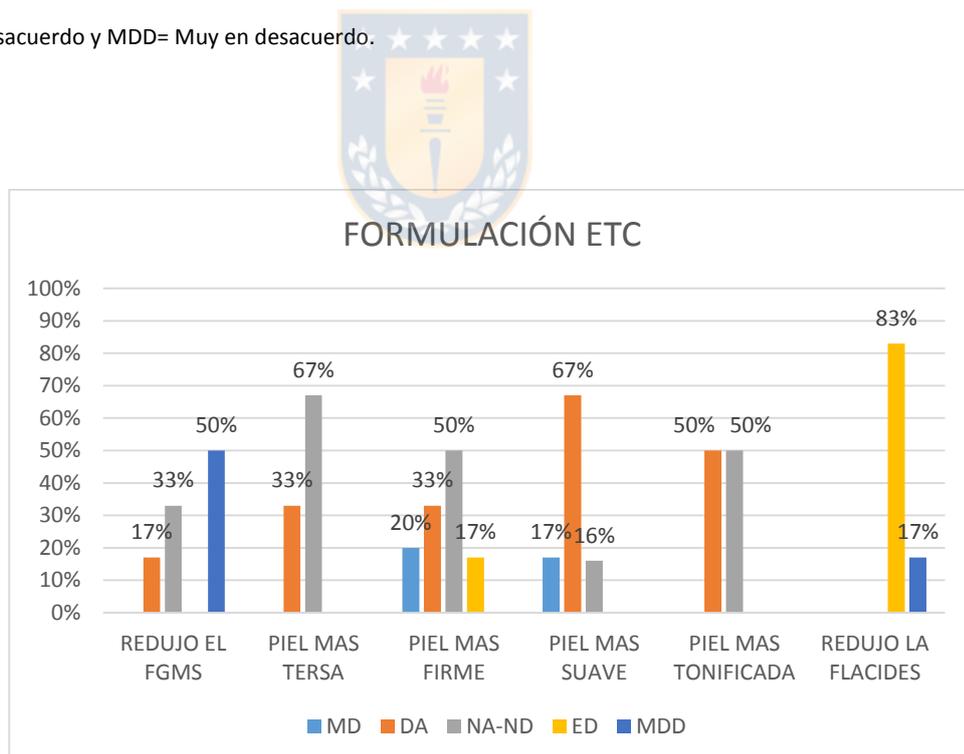


Figura 4.56 Percepción de voluntarias de la Formulación EETC. Donde EETC= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos de la especie y *Capsicum spp*, MD= Muy de acuerdo, DA= De acuerdo, NA-ND= ni de acuerdo, ni en desacuerdo, ED= En desacuerdo y MD= Muy en desacuerdo.

2.- En relación a la facilidad de uso aplicación gel entregada, por favor indique que tan de acuerdo o en desacuerdo se encuentra usted, con respecto a las siguientes afirmaciones:

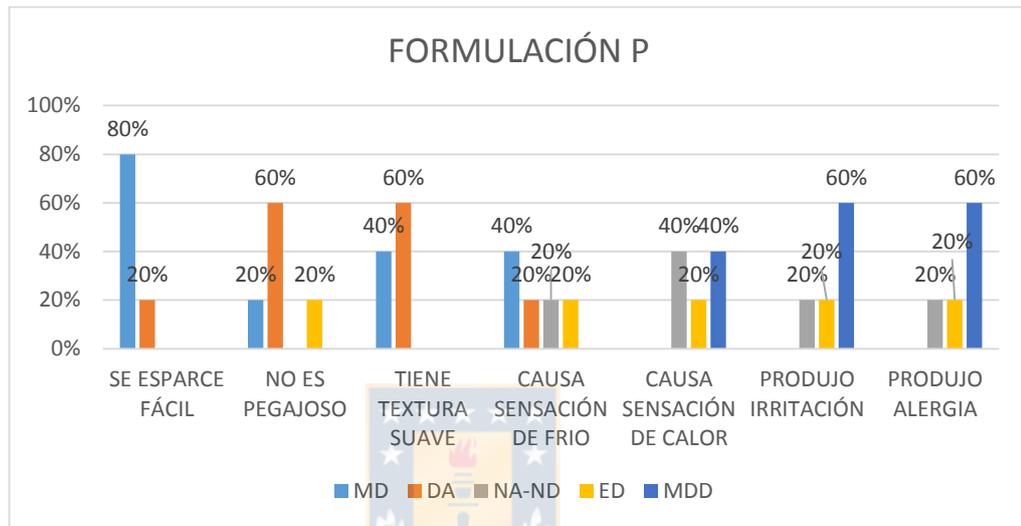


Figura 4.57 Percepción de voluntarias sobre sensaciones de la Formulación P. Donde P= Placebo MD= Muy de acuerdo, DA= De acuerdo, NA-ND= ni de acuerdo, ni en desacuerdo, ED= En desacuerdo y MDD= Muy en desacuerdo.

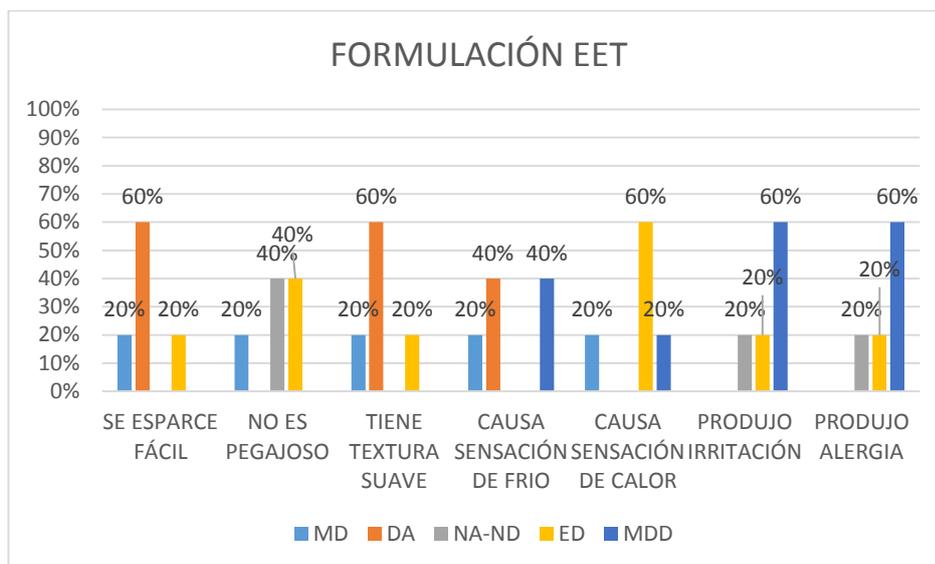


Figura 4.58 Percepción de voluntarias sobre sensaciones de la Formulación EET. Donde EET= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos de la especie, MD= Muy de acuerdo, DA= De acuerdo, NA-ND= ni de acuerdo, ni en desacuerdo, ED= En desacuerdo y MD= Muy en desacuerdo y MDD= Muy en desacuerdo.

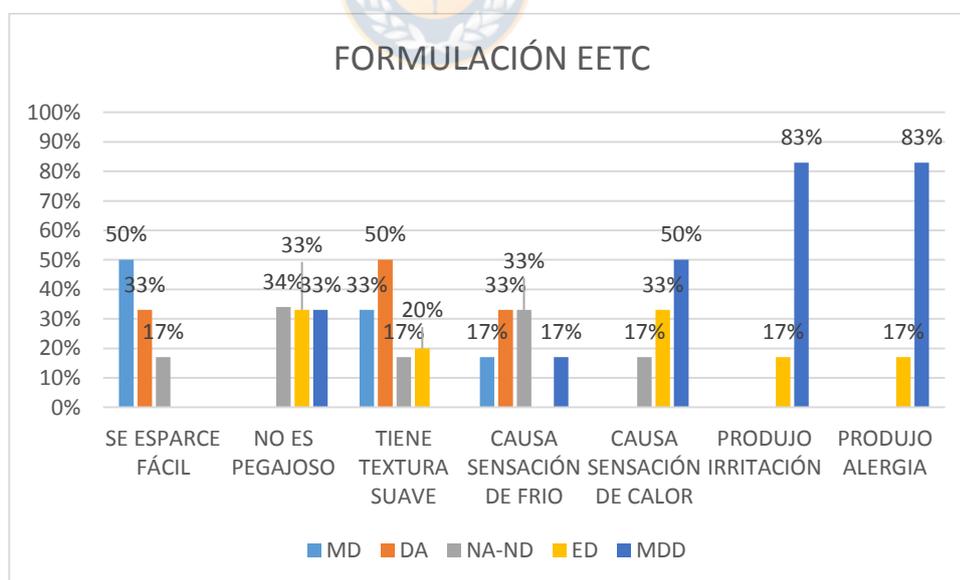


Figura 4.59 Percepción de voluntarias sobre sensaciones de la Formulación EETC. Donde EETC= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos de la especie y *Capsicum spp*, MD= Muy de acuerdo, DA= De acuerdo, NA-ND= ni de acuerdo, ni en desacuerdo, ED= En desacuerdo y MDD= Muy en desacuerdo.

3.- En relación a las características del producto gel entregada, por favor indique que tan de acuerdo o en desacuerdo se encuentra usted, con respecto a las siguientes afirmaciones, marcando una “X” por favor, en el recuadro de su preferencia:

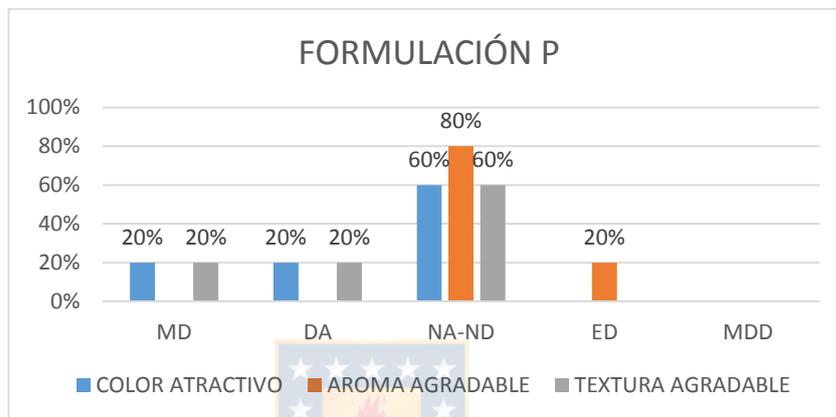


Figura 4.60 Percepción de voluntarias sobre características del gel de la Formulación P. Donde P= Placebo, MD= Muy de acuerdo, DA= De acuerdo, NA-ND= ni de acuerdo, ni en desacuerdo, ED= En desacuerdo y MDD= Muy en desacuerdo.

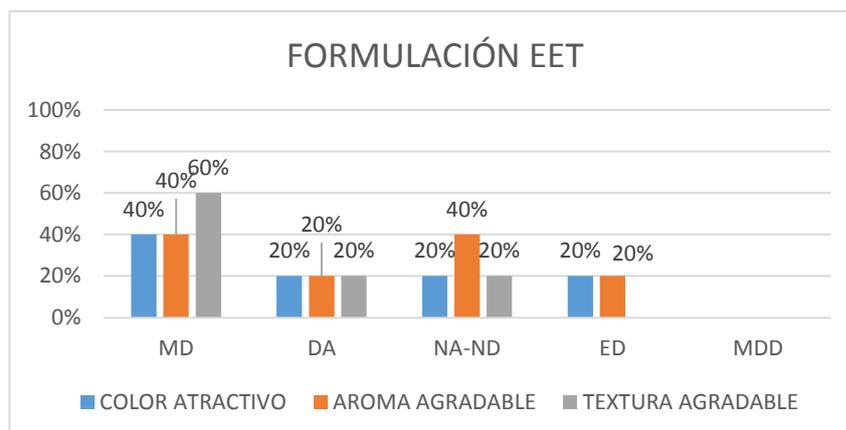


Figura 4.61 Percepción de voluntarias sobre características del gel de la Formulación EET. Donde EET= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos de la, MD= Muy de acuerdo, DA= De acuerdo, NA-ND= ni de acuerdo, ni en desacuerdo, ED= En desacuerdo y MDD= Muy en desacuerdo.

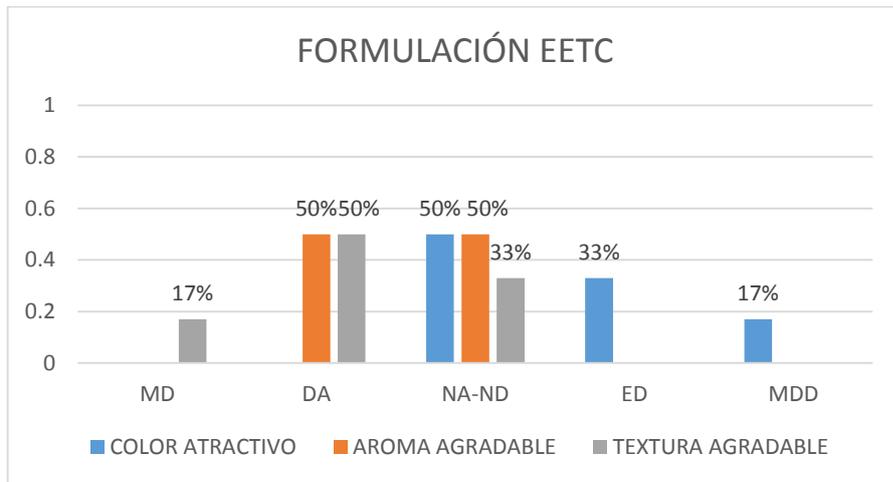


Figura 4.62 Percepción de voluntarias sobre características del gel de la Formulación EETC. Donde EETC= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos de la especie y *Capsicum spp*, MD= Muy de acuerdo, DA= De acuerdo, NA-ND= ni de acuerdo, ni en desacuerdo, ED= En desacuerdo y MDD= Muy en desacuerdo



4.- Si el producto estuviera a la venta, marque una “X” por favor, en el recuadro de su preferencia

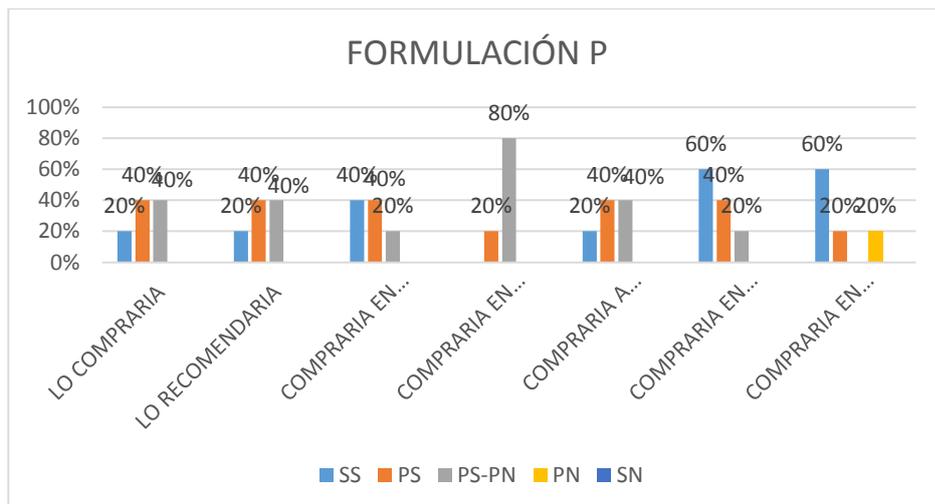


Figura 4.63 Percepción de voluntarias sobre posible adquisición de la Formulación P. Donde P= Placebo, SS=Seguro que sí, PS=Probablemente sí, PS-PN= Puede que sí, puede que no, PN= Probablemente no y SN= Seguro que no.

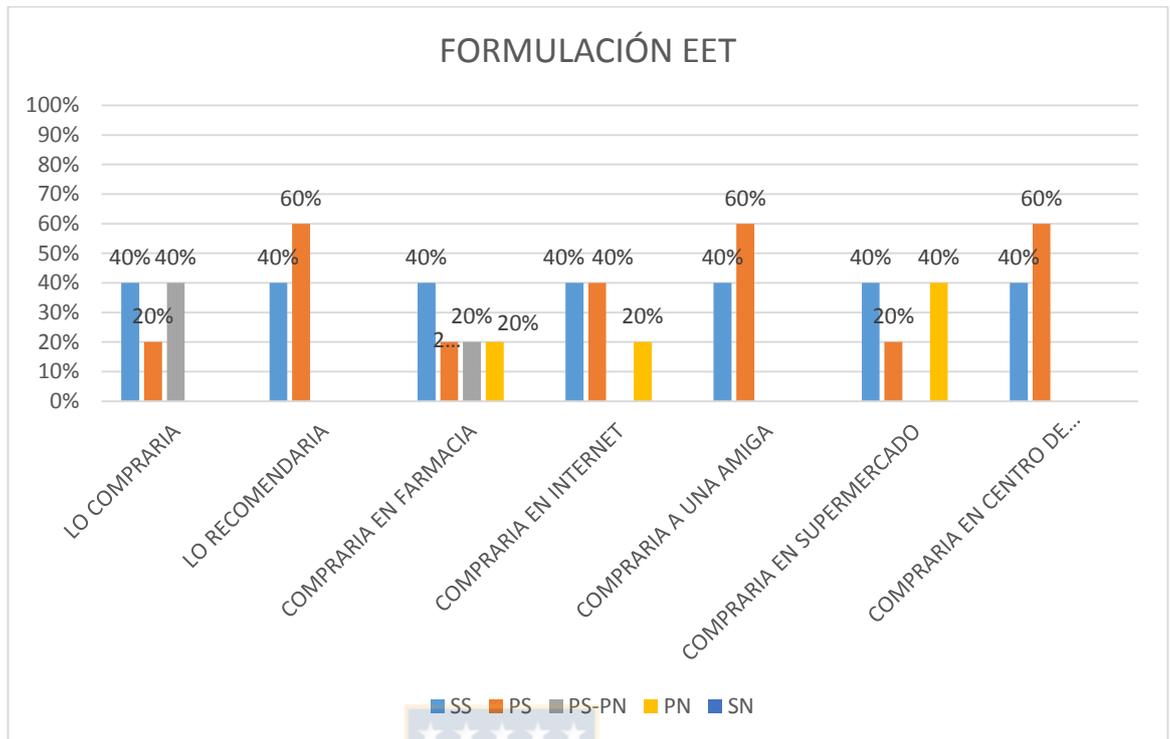


Figura 4.64 Percepción de voluntarias sobre posible adquisición de la Formulación EET. Donde EET= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos de la especie, SS=Seguro que sí, PS=Probablemente sí, PS-PN= Puede que sí, puede que no, PN= Probablemente no y SN= Seguro que no

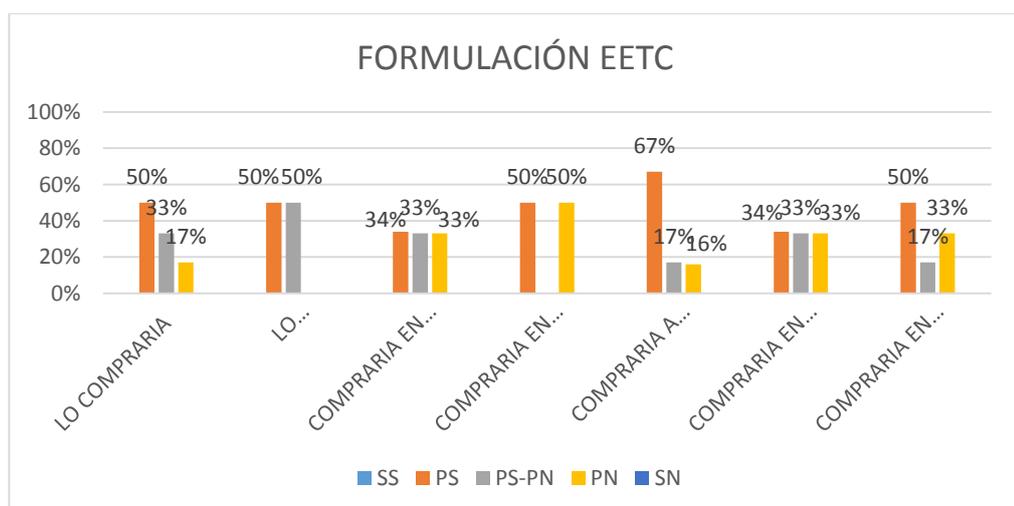


Figura 4.65 Percepción de voluntarias sobre posible adquisición de la Formulación EETC. Donde EETC= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos de la especie y *Capsicum spp*, SS=Seguro que sí, PS=Probablemente sí, PS-PN= Puede que sí, puede que no, PN= Probablemente no y SN= seguro que no

5.- Si el producto estuviera a la venta en un envase de 200 gramos, cuanto usted estaría dispuesta a pagar, marque por favor, en el recuadro de su preferencia.

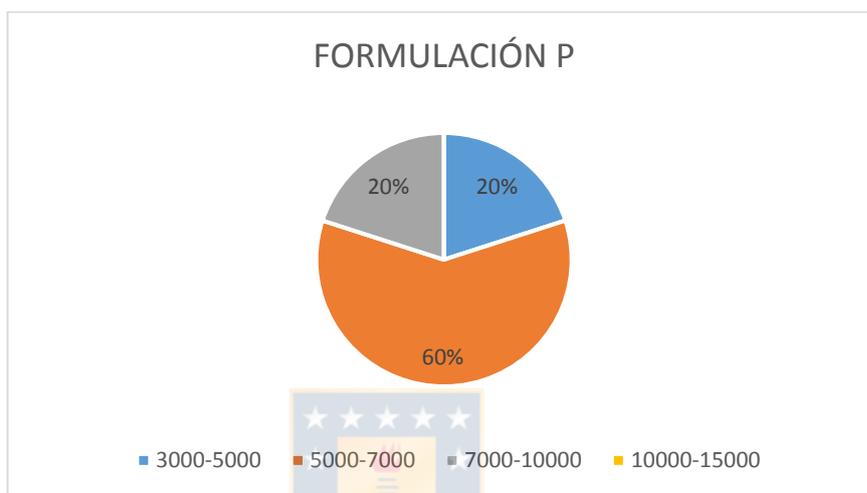


Figura 4.66 Percepción de voluntarias sobre posible costo del gel de la Formulación P. Valores expresados en pesos chilenos. Donde P= Placebo

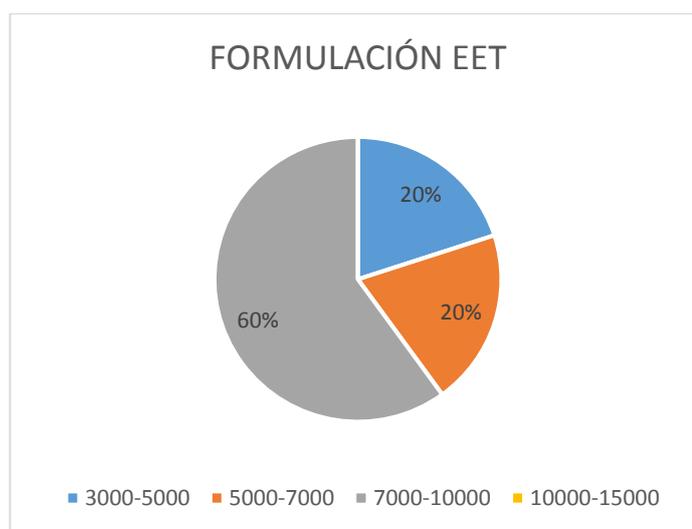


Figura 4.67 Percepción de voluntarias sobre posible costo del gel de la Formulación EET. Valores expresados en pesos chilenos. Donde EET= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos de la especie.

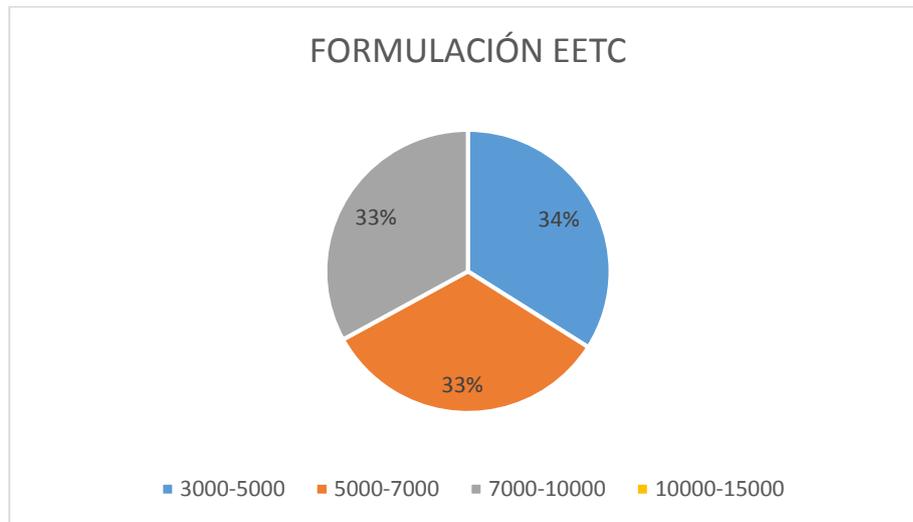


Figura 4.68 Percepción de voluntarias sobre posible costo del gel de la Formulación EETC. Valores expresados en pesos chilenos. Donde EETC= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos de la especie y *Capsicum spp.*



6.- En cuanto al protocolo de uso, marque por favor, en el recuadro de su preferencia.

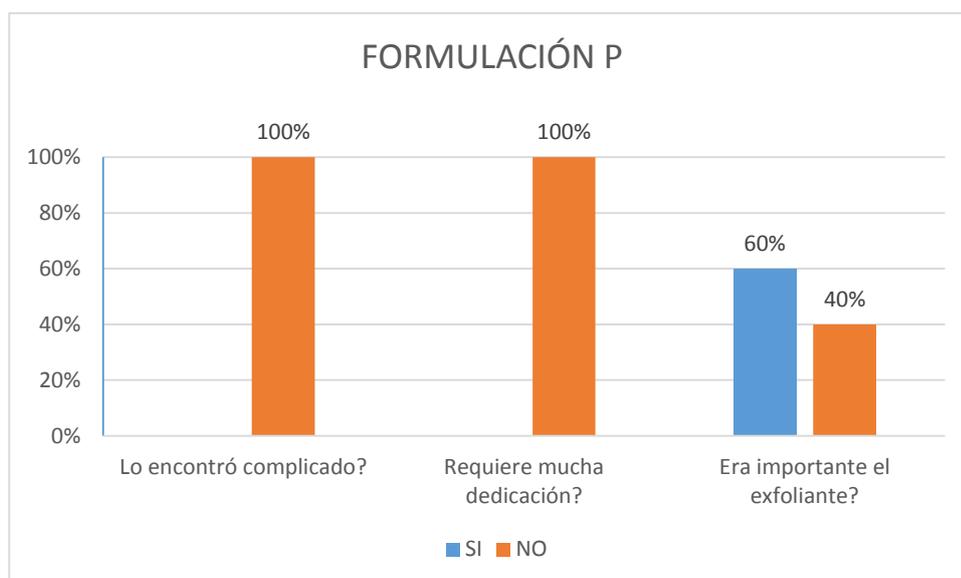


Figura 4.69 Percepción de voluntarias sobre protocolo de uso del gel de la Formulación P. Donde P= Placebo

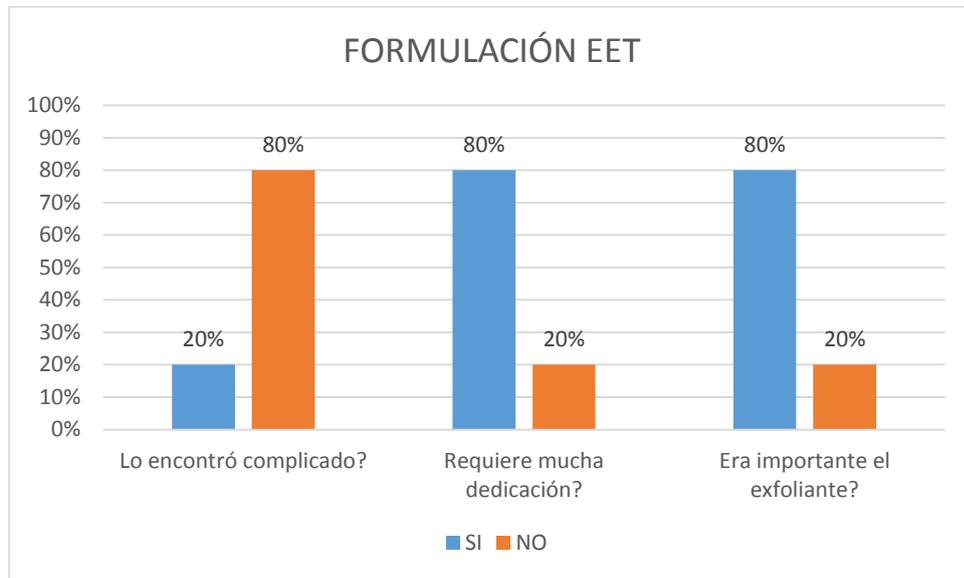


Figura 4.70 Percepción de voluntarias sobre protocolo de uso del gel de la Formulación EET. Donde EET= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos de la especie.

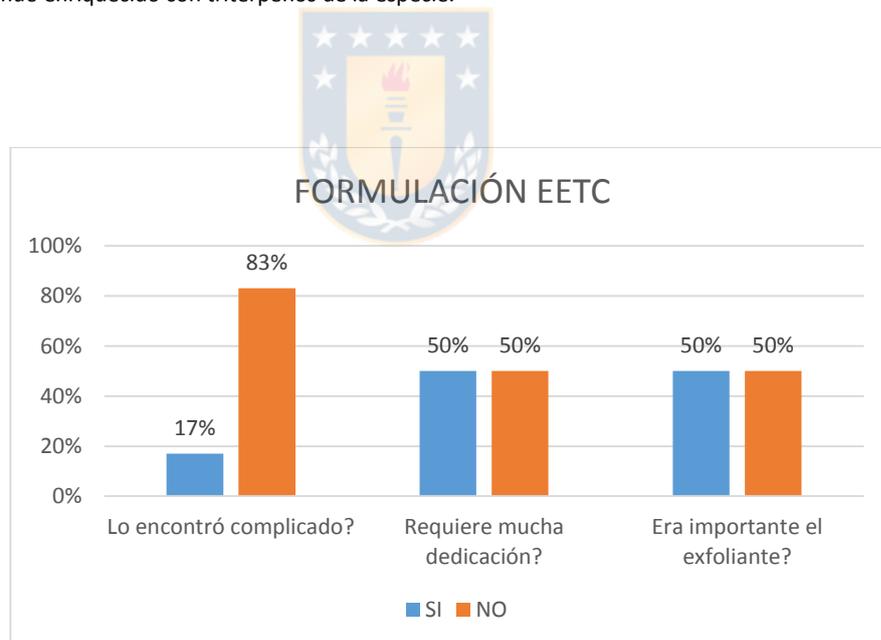


Figura 4.71 Percepción de voluntarias sobre protocolo de uso del gel de la Formulación EETC. Donde EETC= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos de la especie y *Capsicum spp.*

7.- En cuanto al seguimiento de la pauta de uso, marque por favor, en el recuadro de su preferencia.

**Con que frecuencia utilizo el producto?**

Formulación P = El 20% de los voluntarios manifestaron utilizarlo cada dos días mientras que el 80% restante indicó que lo uso dos veces al día.

Formulación EET = El 20% de los voluntarios manifestaron utilizarlo cada dos días mientras que el 80% restante indicó que lo uso dos veces al día.

Formulación EETC = El 67% de los voluntarios manifestaron utilizarlo 2 veces al día, el 17% una vez al día y el 16% restante indicó que lo uso en otra frecuencia.

**Con que frecuencia utilizó el exfoliante antes de usar el producto?**

Formulación P = El 20% de los voluntarios manifestaron utilizarlo una vez por medio mientras que el 80% restante indicó que lo una vez al día.

Formulación EET = El 20% de los voluntarios manifestaron utilizarlo una vez por medio mientras que el 80% restante indicó que lo una vez al día.

Formulación EETC = El 50% de los voluntarios manifestaron utilizarlo una vez al día, el 33% una vez por medio y el 17% restante indicó que lo uso en otra frecuencia.

**Usted pudo apreciar resultados en cuanto tiempo de uso del producto?**

Formulación P:



Figura 4.72 Percepción de tiempo de efecto del producto por parte de las voluntarias de la formulación P. Donde P= Placebo

## Formulación EET:



Figura 4.73 Percepción de tiempo de efecto del producto por parte de las voluntarias de la formulación EET.

Donde EET= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos.

## Formulación EETC:

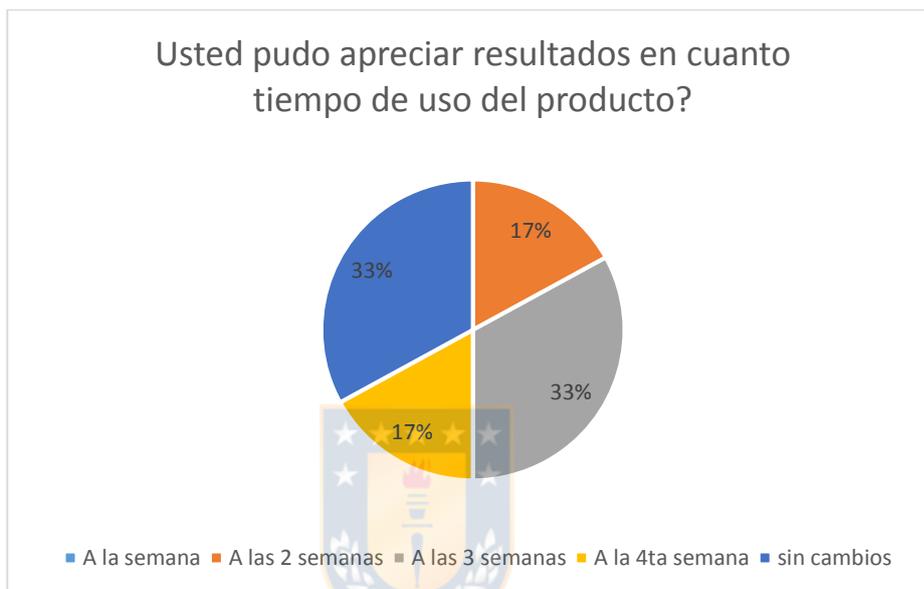


Figura 4.74 Percepción de tiempo de efecto del producto por parte de las voluntarias de la formulación EET.

Donde EET= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos y *Capsicum spp.*

8.- Si quiere dejarnos sus comentarios, acerca de esta evaluación, por favor indíquelo acá:

## FORMULACIÓN P:

*“Me gustaría que tuviera olor a mutilla. El hecho de que huelga a "lo que es" me da más confianza en los resultados”.*

*“Me gusto el producto”.*

*“Cuanto es mínimo de tiempo en el que se deberían haber notados los cambios ???”.*

*“parece que me toco la formulación placebo por lo que no evidencie cambios”.*

FORMULACIÓN EET:



*“Me agradó participar de este Proyecto, agradezco enormemente la preocupación de Maira y de todo su equipo”.*

*“Quizás esta encuesta debería ser al terminar la prueba, en mi caso estoy en el segundo mes de uso”.*

*“Creo que aún hay que esperar a que termine el tratamiento, pues voy a la mitad”.*

*“Que bien que monitoreen a través de una encuesta virtual”.*

*“En cuanto al uso, la frecuencia en promedio es una vez al día, dado que hubieron días en que no lo apliqué, pero he intentado utilizarlo las dos veces en el día cuando me lo aplico. Creo que el aroma se puede mejorar utilizando escencias”.*

#### FORMULACIÓN EETC:

*“atenúo mi piel de naranja, pero no ha desaparecido por completo”.*



*“Creo que debería mejorar el hecho que uno quede pegajosa”.*

*“No podría decir si tengo o no cambios, no me percaté de mi piel al inicio ni entremedio. Solo me puse la crema. Con respecto a la frecuencia de la aplicación, la mayoría de los días lo aplicaba 2 veces al día, y algunas veces lo utilizaba 1 vez”.*

*“Seguiré participando, pienso que es difícil para uno tener una apreciación objetiva de los cambios”.*

*“A más de un mes de tratamiento, los cambios vistos tienen relación con la suavidad de la piel. No he visto cambios en la reducción de piel de naranja”.*

*“no”*



## Capítulo 5

### Conclusiones



## 5.1. CONCLUSIONES:

Se logró desarrollar 3 formulaciones cosméticas a base de extractos hidrofílicos (hidroalcohólicos) de hojas de *Ugni molinae* Turcz (Murtilla, población de la región de la Araucanía 1%) enriquecidos con triterpenos de la especie (0.25%), con efecto reductor del fibroedema geloide mucoso subcutáneo grado 3. La formulación fue enriquecida con *Capsicum spp* (2,8% Eqq 0.15% capsaïcina).

Se desarrolló un método de extracción de hojas de *Ugni molinae* para obtener extractos hidrofílicos enriquecidos con fracciones triterpénicas de la especie. Este consistió en una maceración hidroalcohólica (50:50) por dos semanas a agitación constante y temperatura ambiente, utilizando el 5% de material vegetal en relación al volumen total del extracto (hoja pulverizada/Solvente). En estas condiciones se obtuvieron los extractos con mayor concentración de triterpenos (HPLC), dentro de éstos se seleccionó el que fue sometido a fraccionamiento por TMB para obtener el extracto enriquecido con triterpenos.

Los extractos seleccionados fueron aquellos con mayor concentración de triterpenos, siendo los de la región del Biobío (Mayor concentración), y región de la Araucanía (Segunda en concentración). Sin embargo se decidió trabajar con este último extracto por provocar un mayor porcentaje de hemólisis en relación al material vegetal de la región del Biobío. Lo que se debe a la presencia de mono y bidesmósidos. Por lo tanto del extracto de la población de la región de la Araucanía se obtuvo la fracción triterpénica para enriquecer el mismo extracto.

Las formulaciones fueron desarrolladas en base a las condiciones expuestas en la conclusión 2 y adicionalmente a estas formulaciones se les incorporó extractos de *Capsicum spp* que presentaron altos índices de hemólisis. Para el extracto de *Capsicum spp* (2,8%) un porcentaje de hemólisis de (13,73%), el extracto de *U. molinae* (1%) (19,90%) de hemólisis y finalmente el extracto de *U. molinae* (1%) enriquecido con triterpenos (0,25%) de la especie y *Capsicum spp* (2,8%) (41,44%) de hemólisis.

Se obtuvieron 3 formulaciones con una base de gel: 1. Formulación Placebo (P), 2. Formulación de extracto de *Ugni molinae* (1%) enriquecido con triterpenos (0.25%) de la especie (EET), 3. Formulación de extracto de *Ugni molinae* (1%) enriquecido con triterpenos de la

especie (0,25%) con extracto de *Capsicum spp* (2,8%, Eqq a 0,15% de capsaïcina) (EETC).

Las mejores formulaciones según los ensayos de hemólisis fueron EET>EETC>P. Situación que no se condice con el orden de hemólisis en los extractos posiblemente por la interacción de la base de gel con los mismos.

Las formulaciones obtenidas fueron sometidas a controles tecnológicos con los cuales fueron caracterizadas. También fueron sometidas a estudios de estabilidad a condiciones normales y aceleradas (T=30° y HR=60%, T=40° y HR=75%), en donde se monitorearon los parámetros descritos en controles tecnológicos. Se obtuvieron formulaciones estables con una vida útil de 9 meses según este estudio.

Según el estudio piloto bajo la observación cualitativa la formulación más efectiva y segura fue la EETC, siendo alrededor de un 60% la mejoría observada.

## Capítulo 6

### Bibliografía



Ahumada, A., Ortega, A., Chito, D., & Benítez, R. (2016). Saponica quinua. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm*, 45(3), 438–469. <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v45n3.62043>

AlphaCrom. (n.d.). Retrieved from <https://www.alphacrom.com/en/tmb-true-moving-bed>

Arancibia-Radich, J., Peña-Cerda, M., Jara, D., Valenzuela-Bustamante, P., Goity, L., Valenzuela-Barra, G., ... Seguel, I. (2016). Comparative study of anti-inflammatory activity and qualitative-quantitative composition of triterpenoids from ten genotypes of *Ugni molinae*. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, 15(5), 274–287.

Augusto, T. R., Salinas, E. S. S., Alencar, S. M., D'arce, M. A. B. R., Camargo, A. C. de, & Vieira, T. M. F. de S. (2014). Phenolic compounds and antioxidant activity of hydroalcoholic extracts of wild and cultivated murtila (*Ugni molinae* Turcz.). *Food Science and Technology (Campinas)*, 34(4), 667–679. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.6393>

Avello, M., Pastene, E., Barriga, A., Bittner, M., Ruiz, E., & Becerra, J. (2014). Chemical properties and assessment of the antioxidant capacity of leaf extracts from populations of *ugni molinae* growing in continental Chile and in Juan fernandez archipelago. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 6(4), 746–752.

Carvalho, A., & Mejia, D. (2014). Efeito da Carboxiteparia no Tratamento do Fibroedema Gelóide. *Faculdade Ávila*, 1–12.

Germán Téllez, Lily Johanna, Diana Henao, Juan Rivera, J. C. (2017). HEMOLISIS. Retrieved from <https://www.protocols.io/view/prueba-de-hemolisis-de-eritrocitos-humanos-jh9cj96>

- Goity, L. (2012). Caracterización de los compuestos activos de *Ugni molinae* (murtilla) y sus potenciales efectos hipoglicemiantes, anti-inflamatorios y antioxidantes, 152.
- Hauser, C., Peñaloza, A., Guarda, A., Galotto, M. J., Bruna, J. E., & Rodríguez, F. J. (2016). Development of an Active Packaging Film Based on a Methylcellulose Coating Containing Murta (*Ugni molinae* Turcz) Leaf Extract. *Food and Bioprocess Technology*, 9(2), 298–307. <https://doi.org/10.1007/s11947-015-1623-8>
- Josefina de Peña, M. H.-P. (2005). Lipodistrofia ginecoide (celulitis). *Rev Cent Dermatol Pascua*, 14(3), 132–135.
- Lopez Luengo, M. (2001). Saponósidos. *OFFARM*, 124–128.
- Madrigal, D. J. L. C. (1995). *Stop a la celulitis. Todas las soluciones.*
- Manrique-Moreno, M., Londoño-Londoño, J., Jemioła-Rzemińska, M., Strzałka, K., Villena, F., Avello, M., & Suwalsky, M. (2014). Structural effects of the Solanum steroids solasodine, diosgenin and solanine on human erythrocytes and molecular models of eukaryotic membranes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1838(1 PARTB), 266–277. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.08.003>
- Peña-Cerda, M., Arancibia-Radich, J., Valenzuela-Bustamante, P., Pérez-Arancibia, R., Barriga, A., Seguel, I., ... Delporte, C. (2017). Phenolic composition and antioxidant capacity of *Ugni molinae* Turcz. leaves of different genotypes. *Food Chemistry*, 215, 219–227. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.159>
- Peredo Sandoval, N. (2008). Desarrollo de un producto dermatológico a partir de un extracto estandarizado obtenido desde las hojas de *Ugni molinae turcz.*, 1–72.

Pires, V. A., Arrieiro, A. N., & Xavier, M. (2004). Fibro Edema Gelóide : Etiopatogenia , Avaliação E Aspectos Relevantes – Uma Revisão De Literatura. *UFVJM – Universidade Federal Dos Vales Do Jequitinhonha e Mucuri*, 1–4.

Queupil Carrasco, M. J. (2011). Actividad inhibitoria de glicógeno fosforilasa A de los extractos obtenidos desde las hojas de *Ugni molinae* Turcz. (murtilla) Myrtaceae : identificación de los principios activos, 98. Retrieved from <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/112090>

Rosales Ricardo, Y. (2014). Masaje y ejercicios físicos en casos con paniculopatía edemato-fibro esclerótica en la atención primaria. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 13(3), 475–486.

Sanchez, A. (2011). Bekia y Belleza. Retrieved from <https://www.bekiabelleza.com/cuerpo/factores-influyen-formacion-celulitis/>

Sandoval, B. (2003). Fibroedema gelóide subcutáneo: qué conocemos de esta entidad clínica? *Folia Dermatológica*.

# Capítulo 7

## Anexos



Anexo N°1. Certificado de aprobación del comité de ética del consentimiento informado, junto al mismo.

### CERTIFICADO

El Comité de Ética de la Universidad de Concepción ha revisado el protocolo de la propuesta para optar al título de Magister en Ciencias Farmacéuticas por la Universidad de Concepción, titulado "Desarrollo de formulaciones cosméticas a base de extractos de hojas de *Ugni molinae* Turcz (Murtilla) enriquecidos con triterpenos de la especie, con efecto reductor del fibroedema geloide mucoso subcutáneo (piel de naranja)", postulado por la Bioquímica Farmacéutica **MAIRA CAROLINA CAMACHO BENALCÁZAR**, en calidad de candidata a título, junto a su Profesora Guía, **DRA. MARCIA AVELLO LORCA**, docente del Departamento de Farmacia de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción, y ha comprobado que cumple con las normas y procedimientos éticos y los principios bioéticos establecidos nacional e internacionalmente para estudios que involucran seres humanos y manipulación de materiales biológicos y químicos.

La propuesta del Proyecto de Tesis para la obtención del grado de Magister en Ciencias Farmacéuticas, presenta como objetivo general desarrollar formulaciones cosméticas a base de extractos hidrofílicos de hojas de *Ugni molinae* Turcz (Murtilla) enriquecidos con triterpenos de la especie con efecto reductor del fibroedema geloide mucoso subcutáneo (piel de naranja) grado 3. Para ello prevé cumplir con 05 (cinco) objetivos específicos. Inicialmente, pretende desarrollar métodos de extracción de hojas de Murtilla para obtener extractos hidrofílicos enriquecidos con fracciones triterpénicas de la especie, y seleccionar los mejores extractos, según criterios químicos y biológicos. Después buscará formular y estandarizar formulaciones cosméticas en base a extractos hidrofílicos de hojas de *Ugni molinae* enriquecidos con triterpenos de la especie y con activos lipolíticos de otras especies vegetales. Con estos resultados propone caracterizar las formulaciones seleccionadas a través de controles tecnológicos. La ejecución de este objetivo, contempla un estudio de cesión de la formulación, que será realizado *in vitro* utilizando celda de Franz. Por último, buscará evaluar la efectividad y seguridad de las formulaciones, a través de un estudio piloto en grupos de mujeres con fibroedema geloide mucoso subcutáneo grado 3.

Por el desarrollo libre del espíritu

COMITÉ DE ÉTICA, BIOÉTICA Y BIOSEGURIDAD  
VICERRECTORIA DE INVESTIGACION Y DESARROLLO

Edificio Emprender • Barrio Universitario S/N • Concepción • Chile  
Fono (56-41) 2204302 e-mail: vrid@udec.cl • http://www.udec.cl/vrid



En "5.METODOLOGÍA" se presenta el inicio de la investigación con el reclutamiento de voluntarias, mujeres adultas de edades entre los 20 y 50 años, sin régimen dietético, con estado nutricional normal, según índice de masa corporal clasificación de la Organización Mundial de la Salud, no embarazadas y con fibroedema geloide mucoso subcutáneo grado 3 y sin tratamiento farmacológico a la época de la intervención. El procedimiento se inicia con una medición inicial del grado de vascularización de la parte trasera de los muslos (con ayuda del Perimed, equipo proporcionado por la Universidad del Bio-Bio) y fotografías localizadas de esta parte. Después, será aplicado la formulación por 28 (veintiocho) días, dos veces al día, con masajes necesarios para la absorción del producto. Después de este periodo se medirá y registrará por imágenes fotográficas nuevamente y así los próximos 02 (dos) meses. Para evaluar la efectividad del gel y su aceptabilidad en las voluntarias, se le entregará a cada voluntaria dos encuestas para dejar registro de su percepción tanto de la formulación como de la aceptabilidad del producto.

Para el análisis de los datos se utilizará el programa y test estadístico adecuado para responder al objetivo planteado, todo lo cual está detallado en la propuesta para obtener el título de postgrado.

Todos los procedimientos para el estudio con las muestras biológicas, así como los procedimientos que requieren manipulación de materiales peligrosos que se contempla realizar dentro de las instalaciones del Laboratorio de Farmacognosia y Fitofármacos en conjunto con el Laboratorio de Tecnología Farmacéutica, ambos de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción, como Unidades ejecutoras, están bajo protocolos de trabajo estandarizado y de uso rutinario de ésta, que cuenta con personal debidamente preparado, además de contar con la infraestructura necesaria para este tipo de estudio.

Los residuos biológicos y químicos generados en el desarrollo del presente proyecto serán retirados y dispuestos por la Unidad de Seguridad de la Universidad de Concepción – MATPEL, de acuerdo a las indicaciones del Manual de Bioseguridad de CONICYT, Edición de 2008 y las propias emanadas por la unidad ejecutora.

Toda la información y resultados del estudio que se presenta, se mantendrán bajo custodia y responsabilidad de la Bioquímica Farmacéutica Maira Carolina Camacho Benalcázar, Investigadora Responsable en este proyecto.

La participación de cada sujeto seleccionado para el presente estudio estará basada en el proceso de Consentimiento Informado, toda vez que sea regularmente firmado.

*Por el desarrollo libre del espíritu*

COMITÉ DE ÉTICA, BIOÉTICA Y BIOSEGURIDAD  
VICERRECTORIA DE INVESTIGACION Y DESARROLLO

Edificio Empedrado • Barrio Universitario S/N • Concepción • Chile  
Fono: (56-41) 2204207 • [comite@uconcepcion.cl](mailto:comite@uconcepcion.cl)



La ejecución del proyecto asegura que no vulnera los derechos y la dignidad de los sujetos participantes en el estudio, garantizando la libertad, la autonomía, la voluntariedad y la privacidad de los mismos, presentando para ello los métodos de protección que aseguran la confidencialidad de los datos de investigación y de custodia estricta de la información obtenida, observando todas las características formales y necesarias para su validez.

Este Comité considera que el Proyecto de Tesis presentado observa los derechos asegurados en la Declaración Universal de los Derechos Humanos, los derechos y principios de la Declaración Universal sobre Bioética y Derechos Humanos, las Normas Éticas de la Organización Panamericana de la Salud para Investigaciones con Sujetos Humanos, la Constitución de la República de Chile, la Ley N° 20.120 "Sobre la Investigación Científica en el Ser Humano, su Genoma y Prohíbe la Clonación Humana" y la Ley n° 19.628 "Sobre Protección de la Vida Privada". Así también, sigue las Sugerencias para Escribir un Consentimiento Informado en Estudios con Personas, del Comité Asesor de Bioética FONDECYT/CONICYT.

En atención a lo anterior y dado que el proyecto de tesis presentado no muestra elementos que puedan transgredir las normas y principios éticos rectores de nuestra Institución Universitaria, los principios delineados en la Declaración de Singapur sobre la Integridad en la Investigación y las normas adoptadas por la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica – CONICYT, este Comité resuelve aprobarlo, confiriendo el presente Certificado.



**DRA. ANDREA RODRÍGUEZ TASTETS**  
**PRESIDENTA**  
**COMITÉ DE ÉTICA, BIOÉTICA Y BIOSEGURIDAD**  
**VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO**  
**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN**



## CONSENTIMIENTO INFORMADO

**Título del Proyecto:** "Desarrollo de formulaciones cosméticas a base de extractos de hojas de *Ugni molinae* Turcz (Murtilla) enriquecidos con triterpenos de la especie, con efecto reductor del fibroedema geloide mucoso subcutáneo (piel de naranja)"

Dicho proyecto, corresponde al Proyecto de tesis de Maira Carolina Camacho Benalcázar para optar al grado de Magister en Ciencias Farmacéuticas.

**Investigadora responsable:** Maira Carolina Camacho Benalcázar, Bioquímica Farmacéutica.

**Profesora guía:** Marcia Avello, Químico Farmacéutico.

**Profesor co-guía:** Marco Fernández, Químico Farmacéutico.

**Equipo investigador y de apoyo:** Roxana Valdivieso, Cosmetóloga  
Daniel Sepúlveda, Estudiante Química y Farmacia  
Delegado de la UBB

El propósito de este documento es invitarla a participar a un proyecto de investigación y entregarle toda la información necesaria para que usted pueda decidir libre y voluntariamente si desea participar.

**Objetivo del Proyecto:** Desarrollar formulaciones cosméticas a base de extractos hidrofílicos de hojas de *Ugni molinae* Turcz (Murtilla) enriquecidos con triterpenos de la especie con efecto reductor del fibroedema geloide mucoso subcutáneo (piel de naranja) grado 3.

Los triterpenos son compuestos activos sobre esta alteración.

Para lograr dicho objetivo, se hace necesario realizar un estudio piloto en voluntarias que posean piel de naranja grado 3, lo que será corroborado por la cosmetóloga Roxana Valdivieso. En caso de ser seleccionada usted como voluntaria deberá comprometerse a realizar la aplicación del producto 2 veces al día en la zona posterior del muslo con masajes circulares, además de transcurrido 28 días y a los 3 meses del tratamiento será citada para observar la evolución del mismo, mediante encuesta de percepción del producto, fotografías y medición del grado de vascularización. Esta sesión tendrá una duración de 20 minutos aproximados, se le avisará con una semana de anticipación el horario de la misma.

Participar en este estudio será una alternativa para disminuir el problema de piel de naranja que afecta aproximadamente al 90% de la población femenina. Además al tratarse de una formulación tópica, es un método no invasivo y de acción local, que no traerá consigo ningún costo de inversión, teniendo como único riesgo presentar alergia al producto y como medida se le realizará la prueba de alergia, antes de la exposición al tratamiento, considerado como parámetro directo de exclusión en caso de que presente algún tipo de irritación, picazón y enrojecimiento, relacionada con la exposición al gel. Además vale recalcar que tras un uso prolongado del tratamiento si aparecen síntomas de alergia, usted debe reportar dicho suceso a la investigadora responsable, para su retiro obligatorio del estudio. En estos casos se le recomienda contactar con la investigadora quien le facilitará unnexo médico para tratar los síntomas de la alergia.





Como voluntaria, usted no debe modificar su dieta habitual, puesto que la intención del estudio es evaluar el impacto de la formulación y la modificación de su dieta podría repercutir en los resultados.

El presente estudio se hará con el apoyo del Laboratorio de Farmacognosia y Fitofármacos en conjunto con el Laboratorio de Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción.

Para cumplir el objetivo es necesario que usted participe activamente durante 12 semanas en el citado estudio, realizando todas las actividades que se detallan más adelante.

1. Asistir a la charla informativa sobre objetivos del estudio. Dicho evento tendrá una duración de 1 hora.
2. Asistir a la sesión fotográfica de la zona posterior del muslo a cargo del Sr. Daniel Sepúlveda (Estudiante de Química y Farmacia), para evaluar el grado de la alteración y descartar a las personas que eventualmente hayan confundido su condición dérmica con la ayuda de la cosmetóloga Roxana Valdivieso. Deberá disponer de 10 minutos para esta actividad.
3. Test cutáneo para descartar alergia. En esta etapa participaran las voluntarias seleccionadas, previa evaluación de la cosmetóloga, el test se realizará probando la formulación a la que usted será expuesta en el estudio.
4. Encuestas de percepción del producto. Se realizará en línea, para facilitar el manejo de la información recabada, está contendrá preguntas abiertas, cerradas y de opción múltiple que tomarán un tiempo aproximado de 10 minutos, serán realizadas al mes del estudio.
5. Aplicación de la formulación en gel (2 veces al día) con masajes circulares ascendentes en la zona del muslo posterior. Vale aclarar que en el estudio se valoran 4 formulaciones (Formulación 1: Base de gel; Formulación 2: extracto de murtila enriquecido en terpenos (EMET), Formulación 3: EMET más capsicum y Formulación 4: EMET más saponinas de quinoa), solamente una de estas formulaciones será utilizada en usted, previo sorteo aleatorio. Además se le proporcionará un exfoliante para que realice una limpieza en la zona del muslo procurando que esta quede limpia y seca antes de la aplicación del gel. El gel se le proporcionará mensualmente, en envases dosificables.
6. Asistir a las sesiones informadas para la determinación de medidas antropométricas, grado de vascularización y fotografías en la zona del muslo posterior para observar los cambios. Las mediciones del grado de vascularización estarán a cargo de la investigadora y un delegado de la universidad del BíoBío, éstas se realizarán en la Universidad de Concepción; las fotografías se realizarán con el apoyo del Sr. Daniel Sepúlveda.

Además es necesario recolectar información personal, que sólo usted nos puede proporcionar y son fundamentales para el desarrollo de esta intervención.

Cabe mencionar, que la participación en el estudio está exenta de compensación económica.

Es importante señalar que todos los datos personales obtenidos son confidenciales y la información obtenida será utilizada exclusivamente para fines científicos. Las fotografías serán sujetas a publicaciones, manteniendo siempre el anonimato de usted como voluntaria. Esta información será custodiada por la investigadora responsable.





Meira Camacho Benalcázar, quien mantendrá los registros de datos en archivos pertenecientes al proyecto de investigación, y el anonimato será resguardado entregando un número correlativo a su nombre.

Los resultados estarán disponibles para usted, y para ello debe comunicarse con la investigadora responsable.

A su vez destacar que su participación es completamente libre y voluntaria. Si no desea participar del presente proyecto de investigación su negativa no traerá ninguna consecuencia para usted. De la misma manera si lo estima conveniente usted puede dejar de participar en el estudio en cualquier momento de éste.

Adicionalmente, la investigadora responsable Meira Carolina Camacho Benalcázar, como electrónico maicamacho@udec.cl y número de contacto (+56)967190458, le manifieste su voluntad en orden a aclarar cualquier duda que le surja sobre su participación en la actividad realizada. Además, usted puede contactarse con el Comité de Ética, Bioética y Bioseguridad de la Dirección de Investigación y Creación Artística de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo de la Universidad de Concepción, a través de su presidenta, Dra. María Andrea Rodríguez Tastets, cuyo teléfono de contacto es el (41)2204302.



Anexo N°2. Encuesta de satisfacción realizada a las voluntarias para evaluar su percepción sobre el producto.

## ENCUESTA DE SATISFACCIÓN

A continuación le pedimos por favor, complete la siguiente encuesta para que nos ayude a mejorar el producto que se le entregó y uso durante el tiempo de evaluación, que no le tomará más de 5 minutos completarla:

Sus respuestas serán tratadas de forma confidencial

Nombre y Apellido:

Edad:



1.- En relación a los resultados esperados de aplicación gel entregado, por favor indique que tan de acuerdo o en desacuerdo se encuentra usted, con respecto a las siguientes afirmaciones, marcando una “X” por favor, en el recuadro de su preferencia:

	Muy de Acuerdo	De Acuerdo	Ni de acuerdo ni en desacuerdo	En desacuerdo	Muy en Desacuerdo
Se redujo la apariencia de la piel de naranja					
Me dejó la piel más tersa					
Me dejó la piel más firme					
Me dejó la piel más suave					
Me dejó la piel más tonificada					
Me redujo la flacidez					

2.- En relación a la facilidad de uso aplicación gel entregada, por favor indique que tan de acuerdo o en desacuerdo se encuentra usted, con respecto a las siguientes afirmaciones, marcando una “X” por favor, en el recuadro de su preferencia:

	Muy de Acuerdo	De Acuerdo	Ni de acuerdo ni en desacuerdo	En desacuerdo	Muy en Desacuerdo
Se esparce fácilmente					
No es pegajoso					
Tiene una textura suave					
Al aplicarlo daba una sensación de frío					
Al aplicarlo daba una sensación de calor					
Me produjo irritación					
Me produjo alergia					

3.- En relación a las características del producto gel entregada, por favor indique que tan de acuerdo o en desacuerdo se encuentra usted, con respecto a las siguientes afirmaciones, marcando una “X” por favor, en el recuadro de su preferencia:

	Muy de Acuerdo	De Acuerdo	Ni de acuerdo ni en desacuerdo	En desacuerdo	Muy en Desacuerdo
Tiene un color atractivo					
Tiene un aroma agradable					
Tiene una textura agradable					

4.- Si el producto estuviera a la venta, marque una “X” por favor, en el recuadro de su preferencia

	Seguro que sí	Probablemente sí	Puede que sí, puede que no	Probablemente no	Seguro que no
Usted lo compraría?					
Usted lo recomendaría?					
Usted lo compraría en una farmacia?					
Usted lo compraría por internet?					
Usted se lo compraría a una amiga?					
Usted lo compraría en un supermercado?					
Usted lo compraría en un centro de estética?					

5.- Si el producto estuviera a la venta en un envase de 200 gramos, cuanto usted estaría dispuesta a pagar, marque una “X” por favor, en el recuadro de su preferencia

Entre \$3.000 y \$5.000.-	
Entre \$5.000 y \$7.000.-	
Entre \$7.000 y \$10.000.-	
Entre \$10.000 y \$15.000.-	
Entre \$15.000 y \$25.000.-	
Entre \$25.000 y \$50.000.-	

6.- En cuanto al protocolo de uso, marque una “X” por favor, en el recuadro de su preferencia

	SI	Porqué SI?	NO
Lo encontré complicado?			
Requiere mucha dedicación?			
Era importante el exfoliante?			

7.- En cuanto al seguimiento de la pauta de uso, marque una “X” por favor, en el recuadro de su preferencia

Con que frecuencia utilizó el producto?

Dos veces al día	1 vez al día	Cada 2 días	Cada 3 días	Otra frecuencia? Escriba aca por favor

Con que frecuencia utilizo el exfoliantes antes de usar el producto?

Siempre	Una vez por medio	Otra frecuencia? Escriba aca por favor

Usted pudo apreciar resultados en cuanto tiempo de uso del producto?

A la semana	A las 2 semanas	A las 3 semana	A la cuarta semana	No apreció cambios durante el tratamiento

8.- Si quiere dejarnos sus comentarios, acerca de esta evaluación, por favor indíquelo acá:


Si quiere dejar su email para que le contemos como sigue este desarrollo, por favor escríbalo acá: \_\_\_\_\_@\_\_\_\_\_.

**MUCHAS GRACIAS POR SU PARTICIPACION!**

### Anexo 3: Tablas de resultados de estudios de estabilidad (pH y viscosidad)

Tabla 7.1 Variación de pH en el transcurso del tiempo de las diferentes formulaciones en las diferentes condiciones de almacenamiento. Donde P= Placebo, EET= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos, EETC= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos y extracto de *Capsicum spp*, EEN= Estudio de estabilidad en condiciones normales, EE1= Estudio de estabilidad acelerada en condiciones de T=30° HR=60% y EE2= Estudio de estabilidad acelerada en condiciones de T=45° HR=75%.

MUESTRAS EE/TIEMPO		MES 0	MES 1	MES 2	MES 3
EEN	P	5,89	6,03	5,97	6,11
		5,91	5,99	5,9	6,18
		5,82	5,96	5,9	6,17
	EET	5,72	5,68	5,58	5,77
		5,72	5,7	5,63	5,77
		5,73	5,72	5,65	5,73
	EETC	6,07	5,95	5,6	6,00
		6,09	5,93	5,67	6,05
		6,06	5,94	5,69	5,97
EE1	P	5,89	6,06	6,01	6,04
		5,91	6,03	6,08	6,03
		5,82	5,98	5,97	6,02
	EET	5,72	5,84	5,55	5,73
		5,72	5,77	5,54	5,77
		5,73	5,8	5,51	5,77
	EETC	6,07	6,02	5,78	6,07
		6,09	6,03	5,71	6,05
		6,06	6,07	5,75	6,04
EE2	P	5,89	6,06	5,91	6,07
		5,91	6,07	5,83	6,09
		5,82	6,06	5,87	6,08
	EET	5,72	5,53	5,23	5,45
		5,72	5,56	5,25	5,47

		5,73	5,5	5,26	5,49
	EETC	6,07	5,68	5,33	5,66
		6,09	5,74	5,53	5,69
		6,06	5,7	5,45	5,67

Tabla 7.2 Variación de viscosidad de la formulación P en el transcurso del estudio de estabilidad. Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM. n = 3. Unidades de Pa.s Donde P= Placebo, EE1= Estudio de estabilidad acelerada en condiciones de T=30° HR=60% y EE2= Estudio de estabilidad acelerada en condiciones de T=40° HR=75%.

FORMULACIÓN P						
TIEMPO/RPM	EE1			EE2		
	MES 0	MES 1	MES 3	MES 0	MES 1	MES 3
5	88867	84600	79133	88867	85333	86000
10	50600	47233	45567	50600	47733	47833
20	28750	26583	26883	28750	26433	27050
50	13813	13307	12720	13813	11987	13100

Tabla 7.3 Variación de viscosidad de la formulación ET en el transcurso del estudio de estabilidad. Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM. n = 3. Unidades de Pa.s Donde EET= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos, EE1= Estudio de estabilidad acelerada en condiciones de T=30° HR=60% y EE2= Estudio de estabilidad acelerada en condiciones de T=40° HR=75%.

FORMULACION EET						
TIEMPO/RPM	EE1			EE2		
	MES 0	MES 1	MES 3	MES 0	MES 1	MES 3
5	35800	28600	25400	35800	17400	15083
10	20433	16500	14600	20433	10300	8907
20	11517	9467	8317	11517	6000	5617
50	5567	4667	4127	5567	4567	3967

Tabla 7.4 Variación de viscosidad de la formulación ETC en el transcurso del estudio de estabilidad. Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM. n = 3. Unidades de Pa.s. Donde EETC= Extracto de *U. molinae* enriquecido con triterpenos y extracto de *Capsicum spp*, EE1= Estudio de estabilidad acelerada en condiciones de T=30° HR=60% y EE2= Estudio de estabilidad acelerada en condiciones de T=40° HR=75%.

FORMULACION EETC						
TIEMPO/RPM	EE1			EE2		
	MES 0	MES 1	MES 3	MES 0	MES 1	MES 3
5	31133	68600	21400	31133	12483	12317
10	17433	40900	12367	17433	6800	5607
20	10017	24750	7233	10017	4750	3813
50	4887	13740	3627	4887	2783	1983

