

Preparación de una crema a base de extracto de *Ruta graveolens*: como posible tratamiento alternativo para vitiligo

Mateo Pérez Ruiz ^{1*}, Adriana Solares Basurto², Gabriela Valdez Jiménez³, German Orozco Gamboa⁴

^{1,2,3} Universidad Tecnológica de San Juan del Río, Qro.

⁴Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica, Parque Tecnológico. Querétaro, Sanfandila, Pedro Escobedo, Qro.
México.

*E-mail: mperezr@utsjr.edu.mx

Resumen

El vitiligo es una condición de la piel provocada por la deficiencia de melanina; no obstante, se puede considerar como un factor desencadenante de problemas psicológicos para quienes la padecen. Por ello, se investigan moléculas que cuenten con el poder de interactuar entre la radiación ultravioleta A (UVA) y ultravioleta B (UVB) para la repigmentación de manchas ocasionadas por la enfermedad. Con la finalidad de contrarrestar los daños consecuentes del vitiligo, se plantea un proceso para estandarizar la extracción de furanocumarinas de *Ruta graveolens* y, a su vez, utilizar el extracto para formular una crema de aplicación cutánea. Para el desarrollo del proyecto, se emplean métodos de análisis espectrofotométricos y cromatográfico para garantizar la presencia de furanocumarinas en el extracto obtenido para la formulación de la crema.

Palabras Clave: Furanocumarinas, crema, formulación, cromatografía y espectrofotometría UV-Vis.

Abstract

*Vitiligo is a skin condition caused by melanin deficiency. It can be considered as a triggering factor for psychological problems of those who suffer from it. Thus, molecules that have the power to interact with ultraviolet A (UVA) and ultraviolet B (UVB) radiation are sought and investigated for the repigmentation of spots caused by the disease. In order to counteract the consequential damages of vitiligo, a process is proposed to standardize the extraction of furanocoumarins from *Ruta graveolens* and in turn use the extract to formulate a cream for cutaneous application. For the development of the project, spectrophotometric and chromatographic analysis methods are used to guarantee the presence of furanocoumarins in the extract obtained for the formulation of the cream.*

Keywords: *Furanocoumarins, Cream, Formulation, Chromatography and UV-Vis spectrophotometry*

Artículo arbitrado

Recibido:
15 de agosto de 2020

Aceptado:
21 de septiembre de 2020

Introducción

El vitíligo es una anomalía pigmentaria de la piel caracterizada por lesiones acrómicas de diversos tamaños, producido por la pérdida progresiva de melanocitos de la epidermis. Las manchas del vitíligo pueden aparecer en cualquier parte de la piel; por lo común, suelen aparecer alrededor de los orificios, genitales o zonas expuestas al sol (Molé & Coringrato, 2019). Es una enfermedad adquirida con un curso crónico y no es contagiosa; la falta de pigmentación en la piel se debe a la ausencia de la melanina, ya que los melanocitos dejan de producirla. Esto puede ser provocado por algún trauma o lesiones en la piel, deficiencia de vitaminas, trastornos endócrinos, alteraciones en el sistema nervioso, enfermedades autoinmunes y, en muy pocos casos, factores genéticos. Esta enfermedad afecta al 0,5 a 1% de la población mundial (Mondélice, 2015); independientemente de la edad o el sexo, aunque en un 50% se presenta en los primeros 20 años de vida y, en el 14%, antes de los 10 años. Alrededor del 30% de los pacientes presentan antecedentes familiares de vitíligo y, con una frecuencia similar, se observan antecedentes personales o familiares de otras enfermedades autoinmunes (Molé & Coringrato, 2019). En México, la enfermedad por vitíligo ocupa entre el tercero y quinto lugares de todas las dermatosis y representa de dos a cuatro puntos porcentuales del total de los pacientes dermatológicos. (Secretaría de Salud, 2016) En resumen, entre el 1% y 2% de la población mexicana presenta esta enfermedad (Celaya, 2019; Muños, 2019).

La familia *Rutaceae* está formada por 150 géneros y alrededor de 1600 especies, de las cuales sólo 178 contienen furanocumarinas (Díaz, 2015); de estas últimas son solo cuatro las más principales: psoraleno, 5-MOP, 8-MOP y 5,8-MOP, presentes principalmente en *Ruta graveolens* y *Ruta pinnata*, aunque también podemos encontrar otras

furanocumarinas lineales minoritarias como oxipeudaceína.

La estructura química de las furanocumarinas se muestra en la Figura (1). El psoraleno y el isopsoraleno presentes en las especies de *Psoralea* ayudan a la piel a producir un nuevo pigmento (Comini, 2016). Inician la transformación de dihidroxifenilalanina (DOPA) en melanina cuando se exponen a la luz solar y, por lo tanto, se utilizan para tratar el vitíligo, la psoriasis y la lepra (Koul et al., 2019). Estas son sólidos polares, cristalizables de color blanco o amarillento y son solubles en disolventes orgánicos (éter, cloroformo y alcohol). Las furanocumarinas presentan fluorescencia (azul, amarilla, verde, púrpura), lo cual permite su reconocimiento. Por ello, es común que su extracción a partir de una fuente vegetal se realice con mezclas hidroalcohólicas, sean monitoreadas por técnicas cromatográficas y se identifiquen mediante técnicas UV-Vis (Alvarez, et al., 2015).

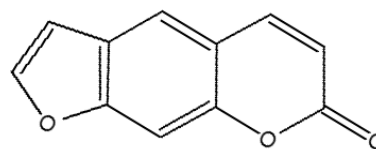


Figura 1. Estructura química de las Furanocumarinas (Koul, et al, 2019)

La cuantificación de furanocumarinas debe realizarse utilizando un compuesto de referencia de la misma familia química. Comúnmente se usa metoxaleno, el cual se puede adquirir fácilmente en una presentación de tabletas de 10 mg. La cuantificación se lleva a cabo en equipos de espectrofotometría UV-Vis, realizando un barrido para identificar los picos de absorbancia que corresponden al metoxaleno; posteriormente, la lectura de la absorbancia de la muestra (que ha sido macerada previamente en un disolvente hidroalcohólico) se relacionará con la curva de calibración de metoxaleno, para determinar la concentración de furanocumarinas presentes.

La formulación de la crema consiste generalmente en una emulsión de aceite en agua, con un contenido superior al 20% de aditivos y principios activos. Además, la crema puede tener una constitución líquida o semisólida (CPFEUM, 2018).

Metodología

Para el desarrollo de esta investigación se siguieron las siguientes etapas:

- a) Selección del material vegetal: se recolectaron las plantas de *Ruta graveolens* frescas, incluyendo tallos y hojas, las cuales fueron obtenidas en Amealco de Bonfil perteneciente a la región sur del estado de Querétaro.
- b) Deshidratación del material vegetal: las plantas recolectadas se cortaron en trozos pequeños y se colocaron sobre una superficie limpia y protegida de la luz solar hasta su deshidratación. Cabe destacar que previamente se acondicionó con un lavado y eliminación de material dañado del cuerpo vegetal o cualquier materia extraña.
- c) Maceración: este proceso se realizó con las hojas y tallos mezclados y separados con la finalidad de identificar que partes de la planta ofrece una mayor cantidad de furanocumarinas. El proceso se llevó a cabo con una disolución hidroalcohólica al 75% en un frasco de vidrio y protegido de la luz durante siete días.
- d) Caracterización cualitativa: las muestras de *Ruta graveolens* fueron sometidas a una identificación de componentes secundarios por medio de las pruebas de cal sodada, hidroxamato férrico, con los reactivos de Lieberman Burchard, Salkowki, Shinoda, cloruro férrico y prueba de espuma (Colina Ramos, 2016) (Bañuelos Valenzuela et al, 2018).
- e) Identificación y cuantificación de furanocumarinas: para llevar a cabo las pruebas de espectrofotometría UV-Vis y cromatografía de capa fina. Las muestras de los macerados se hicieron pasar inicialmente por un filtro de papel con una capa de carbón activado y posteriormente se filtraron por acrodisco de 0.45µm para eliminar parte de las clorofilas presentes. Se utilizó un espectrómetro marca Shimadzu modelo UV-1800. En los espectros, se realizó un barrido de 200 nm – 400 nm considerando la longitud onda de 301 como la señal de especies de interés. Se prepararon muestras por duplicado y se leyeron 2 veces cada una. Para la medición, se realizó un ajuste de blancos y las lecturas de las muestras se compararon contra la curva de calibración de 5 puntos en el estándar de metoxaleno.
- f) Formulación de la crema: para este desarrollo se consideró la cantidad de excipientes para formar una emulsión de aceite en agua fácil de aplicar sobre la piel, debido a una consistencia suave, manejable y no grasosa. Se propuso la fórmula siguiente: furanocumarinas (principio activo), propilglicerol (humectante), polisorbato 80 y glicerina (emulsificantes acuoso), monoestearato de glicerilo (emulsificante oleoso), cera blanca de abeja (oclusivo de fase oleosa), aceite mineral (lubricidad), miristato de isopropilo (agente de penetración), propilparabeno y metilparabeno (conservadores) y agua purificada (vehículo).
- g) La caracterización fisicoquímica de la crema se realizó mediante algunas de las pruebas indicadas en la norma mexicana Estabilidad de fármacos y medicamentos, así como de remedios herbolarios NOM-073-SSA1-2015 para semisólidos, entre las cuales destacan: densidad, pH y viscosidad. La densidad se realizó con una probeta de 25 mL tarada y con una balanza marca Sartorius Modelo BP150. Para el pH, se usó un potenciómetro marca Hanna, modelo HI98103 *Checker* y para la viscosidad se utilizó un viscosímetro *Brookfield LVT*.

Resultados

En la Tabla (1), se presentan los resultados de la caracterización cualitativa de los componentes secundarios del material vegetal de la ruda. La tabla indica la presencia de componentes no esenciales para el desarrollo de la crema y características bromatológicas de la planta. Esta determinación

permitirá en futuras investigaciones encontrar nuevas aplicaciones a esta planta. Sin embargo, el resultado más relevante, en este trabajo es la identificación cualitativa de las furanocumarinas.

| Prueba | Componente a identificar | Resultado |
|---------------------|--|-----------|
| Cal sodada | Nitrógeno | Positiva |
| Hidroxamato férrico | Sequiterpenolactonas y cumarinas | Positiva |
| Lieberman Burchard | Esteroides, esteroles y triterpenoides | Negativa |
| Salkowski | Terpenos y Carotenos | Negativa |
| Shinoda | Fenoles y flavonoides | Positiva |
| Cloruro Férrico | Flavonoides, fenoles y taninos | Positiva |
| Espuma | Saponinas | Positiva |

Tabla 1. Pruebas de identificación de componentes secundarios de *Ruta graveolens*.

En identificación de las furanocumarinas por cromatografía en capa fina, se utilizaron placas CCF de gel de sílice 60 F254 y como estándar de referencia, el metoxaleno que fue eluido en un matraz Erlenmeyer con una mezcla de tolueno:acetato de etileno. De esta manera, se obtuvo la relación de frentes (R_f) mostrados en la Tabla 2, donde la señal de la muestra tiene un valor de R_f cercano al valor de referencia. Este resultado sugiere la presencia de las furanocumarinas. Para confirmar, se presenta más adelante mediciones realizadas con la técnica de espectrofotometría UV-Vis.

| Muestra | R_f |
|--------------------|-------|
| Metoxaleno | 0.40 |
| Extracto de tallos | 0.44 |
| Extracto de hojas | 0.44 |

Tabla 2. R_f obtenidos por CCF de los extractos de ruda usando metoxaleno como referencia.

En la Figura 2, se pueden observar las señales correspondientes a las furanocumarinas tanto de referencia como en las muestras. Cabe destacar que en la imagen se presenta un R_f del extracto de las hojas asignable a furanocumarinas. Sin embargo, no

se alcanza a apreciar presencia de estas sustancias en el extracto del tallo.

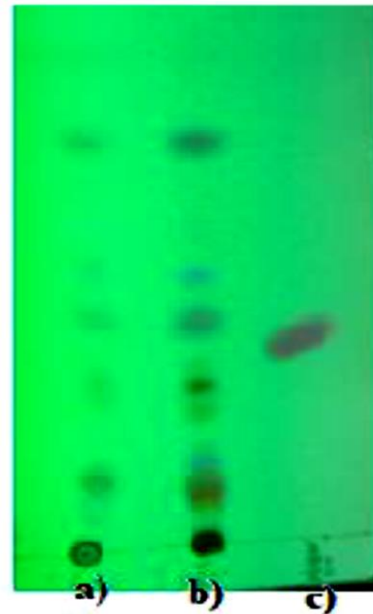


Figura 2. Placa de cromatografía de capa fina donde: a) corresponde al extracto del tallo, b) extracto de las hojas y c) preparación de referencia.

Por otro lado, para realizar la cuantificación de furanocumarinas, se utilizó una curva de calibración de la sustancia de referencia metoxaleno, dichos datos se muestran en la Tabla (3).

| Muestra | No. | Abs (301 nm) | Concentración mg/mL |
|-----------------------|-----|--------------|---------------------|
| Referencia Metoxaleno | 1 | 0.131 | 0.0024 |
| | 2 | 0.258 | 0.0048 |
| | 3 | 0.392 | 0.0072 |
| | 4 | 0.522 | 0.0096 |
| | 5 | 0.650 | 0.0120 |
| Tallo | 1 | 0.711 | 0.0203 |
| Hoja | 1 | 3.487 | 0.0659 |

Tabla 3. Resultados obtenidos en el análisis de UV-Vis aplicado a los extractos de ruda.

En la Figura 3, se puede apreciar el barrido realizado a los extractos de las muestras, en el que se identifican los picos característicos de las furanocumarinas.

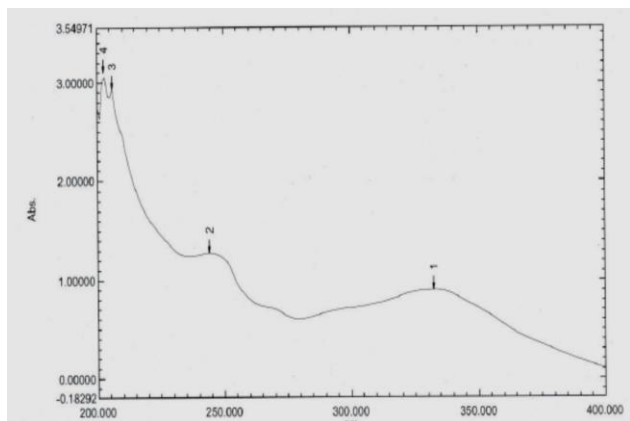


Figura 3. Espectro UV-Vis del barrido de los extractos de ruda.

Se determinó una concentración de espectros 0.0659 mg/mL mediante espectroscopia UV-Vis para las hojas y de 0.0230 mg/mL en los tallos, lo que explica por qué la muestra de estos no mostró evidencia en la cromatografía de capa fina por su baja concentración.

En lo que concierne a la preparación de la crema con base en la normatividad vigente, se realizaron las pruebas de calidad del producto que incluyen: pH, viscosidad y densidad cuyos resultados se muestran en la Tabla 4 y los cuales son valores característicos de estas formulaciones. Estos valores indican que la formulación es viable.

| Prueba | Resultado |
|------------|------------|
| pH | 6.5 |
| Densidad | 1.052 g/mL |
| Viscosidad | 0.0120 cp |

Tabla 4. Resultados de las pruebas de calidad a la formulación de la crema.

Como resultado final en la formulación, se obtuvo una crema de apariencia café, la cual puede observarse en la Figura 4 y con aromas característicos de la planta de ruda. Cabe mencionar que el extracto fue concentrado previamente por medio de rota-vapor para eliminar el exceso de diluyente.



Figura 4. Crema a partir del extracto concentrado de *Ruta graveolens*.

Conclusiones

Se caracterizó favorablemente la planta y se logró una estandarización del proceso de obtención del extracto rico en furanocumarinas. Las pruebas de cromatografía de capa fina comprueban la presencia de estas sustancias en las hojas de la planta; pero debido a la baja concentración en los tallos, esta técnica no es capaz de detectarlos. Por otra parte, la espectroscopia UV-Vis, también determina que en las hojas existe la mayor concentración de las sustancias de interés. Este alto valor del principio activo en las hojas permite preparar una formulación de crema de uso tópico, con posibilidad de éxito en el tratamiento de vitiligo. La crema desarrollada cumplió con los parámetros primarios de estabilidad de la fórmula, lo que permite plantear a futuro una evaluación con base en un protocolo un clínico.

Referencias

- Alvarez Hernández, N. L., López Morales, A. B., y Marroquín Tintí, S. M. (2015). *Formulación de una loción a partir de (Citrus latifolia) limón persa, (Citrus aurantifolia) limón criollo, (Apium graveolens) apio y (Petroselinum crispum) perejil, como sustitutos de la esencia de bergamota (Citrus bergamia) utilizada en el Hospital Roos*. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala. Obtenido de http://www.repositorio.usac.edu.gt/975/1/06_3712.pdf
- Bañuelos Valenzuela, R., Delgadillo Ruiz, L., Echavarría Cháirez, F., Delgadillo Ruiz, O., y Meza López, C. (2018). Composición química y fito de extractos etanólicos de *Larrea tridentata*, *Origanum vulgare*, *Artemisa ludoviciana* y *Ruta graveolens*. *Agrociencia*, 52(3), 309-321.

Celaya, O. (25 de 06 de 2019). Afecta vitiligo hasta al 2% de la población. 1. Michoacan, México. Obtenido de <https://www.quadratin.com.mx/principal/afecta-vitiligo-hasta-al-2-de-la-poblacion/>

Colina Ramos, A. C. (2016). *Análisis fitoquímico, determinación cualitativa y cuantitativa de flavonoides y taninos, actividad antioxidante, antimicrobiana de las hojas de "Muehlenbeckia hastulata (J.E.Sm) I.M. Johnston" de la zona de Yucaj (Cusco) (tesis de licenciatura)*. Lima, Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

CPFEUM. (2018). *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*. CDMX: CPFEUM.

Díaz Expósito, L. (2015). *Furanocumarinas e isoflavonas de interés farmacológico en Bituminaria bituminosa (tesis de doctorado)*. Murcia, España: Universidad de Murcia.

Koul, B., Taak, P., Kumar, A., Kumar, A., y Sanyal, I. (2019). Genus Psoralea: A review of the traditional and modern uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 201-226.

Molé, M., y Coringrato, M. (Junio de 2019). Actualización sobre el vitiligo. *Dermatología Argentina*, 25(2), 50-57.

Mondélice, M. (2015). *Le Vitiligo: Physiopathologie, prise en charge thérapeutique et conseils à L'Officine (tesis de licenciatura)*. Toulouse, Francia: Université toulouse iii paul sabatier.

Montealegre Pinzón, C. (2011). *Etnobotánica preliminar del espíngo (ocotea quixos (lam.) kosterm.) en la medicina*. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.

Muñoz, F. (28 de Enero de 2019). Vitiligo, más allá de la piel. CDMX, Ciudad de México, México. Obtenido de <https://www.reporteindigo.com/piensa/vitiligo-mas-alla-de-la-piel-afectaciones-emocionales-criticas-sociedad-estetica/>

R. Comini, L., y Núñez Montoya, S. (2016). Fotosensibilizadores naturales activos en terapia fotodinámica. *Bitacora Digital, Revista electronica FCQ-UNC*, 3(7).

Secretaría de Salud. (2016). *Vitiligo en México entre los primeros cinco lugares de las dermatosis*. CDMX: Salud.