



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

**DESARROLLO DE UNA FORMA FARMACÉUTICA CON EFECTO
ANTIHIPERTENSIVO A PARTIR DE UN EXTRACTO ESTANDARIZADO DE
LA RAÍZ DE *Heliopsis longipes***

Opción de titulación

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Doctorado en Ciencias Químico Biológicas

Presenta:

M. en C. Dailenys Marrero Morfa

Dirigido por:

Dra. María Alejandra Rojas Molina

Co-dirigido por:

Dr. Carlos Tomás Quirino Barreda

Querétaro, 2023



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



DESARROLLO DE UNA FORMA FARMACÉUTICA CON
EFECTO ANTIHIPERTENSIVO A PARTIR DE UN
EXTRACTO ESTANDARIZADO DE LA RAÍZ DE
Heliopsis longipes

por

Dailenys Marrero Morfa

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0
Internacional](#).

Clave RI: FQDCC-290776



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Doctorado en Ciencias Químico Biológicas

**DESARROLLO DE UNA FORMA FARMACÉUTICA CON EFECTO
ANTIHIPERTENSIVO A PARTIR DE UN EXTRACTO ESTANDARIZADO
DE LA RAÍZ DE *Heliopsis longipes***

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de

Doctorado en Ciencias Químico Biológicas

Presenta:

M. en C. Dailenys Marrero Morfa

Dirigido por:

Dra. María Alejandra Rojas Molina

Co-dirigido por:

Dr. Carlos Tomás Quirino Barreda

Alejandra Rojas Molina

Presidente

Carlos Tomás Quirino Barreda

Secretario

Francisco Javier Luna Vázquez

Vocal

César Ibarra Alvarado

Suplente

Juana Isela Rojas Molina

Suplente

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano

Directora de la Facultad de Ciencias Químicas

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Lorca Piña

Directora de Investigación y Posgrado

AGRADECIMIENTOS

Mis agradecimientos infinitos a la Universidad Autónoma de Querétaro, a la Facultad de Química y al Posgrado en Ciencias Químico Biológicas por acogerme y sobre todo a la Dra. Alejandra Rojas Molina que me ha inspirado y apoyado incondicionalmente en este arduo trayecto. Quiero agradecer a todos los doctores del posgrado, quienes siempre empatizaron con mi condición de extranjera, siempre preguntando por mi familia que estaba en mi país. Al Dr. Quirino por la codirección, y por brindarme sus conocimientos. Agradezco también a los compañeros del posgrado y al equipo de trabajo que nos apoyan en todos los trámites.

Al CONAHCYT por la beca que me fue otorgada.

Agradezco a mi familia por su apoyo incondicional y por su preocupación continua. A mis amigos, a los que están cerca y a los que desde la distancia me han demostrado su amistad.

Pero sobre todo me doy gracias a mí, por mi gran esfuerzo, por las lágrimas, por sentir que a veces no podía y aun así seguir adelante con entusiasmo. Agradezco a la vida por esta oportunidad, por regalarme lo más importante: libertad.

ÍNDICE

RESUMEN.....	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUCCIÓN.....	13
2. ANTECEDENTES	15
2.1 Hipertensión Arterial	15
2.1.1 Prevalencia de la Hipertensión Arterial en el Mundo.....	15
2.1.2 Hipertensión arterial en México.	17
2.1.3 Tratamientos actuales para la HTA.....	18
2.2 Utilización de las plantas medicinales.....	19
2.2.1 Utilización de las plantas medicinales en México.....	21
2.3 <i>Heliopsis longipes</i> S.F. Blake (Chilcuague)	24
2.3.1 Estudios farmacológicos realizados sobre extractos de <i>H. longipes</i>	24
2.3.2 Alcamidas, principales metabolitos encontrados en <i>H. longipes</i>	26
2.4 Medicamentos Herbolarios	29
2.4.1 Medicamentos herbolarios aprobados por la FDA	30
2.4.2 Diferencias entre Medicamento Herbolario y Suplemento Nutricional	31
2.4.3 Medicamentos Herbolarios en México	33
2.5 Estandarización de un extracto natural.....	37
2.5.1 Extracto cuantificado	39
2.5.2 Extracto estandarizado	39
2.5.3 Ensayos preclínicos.....	40
2.6 Preformulación y formulación del extracto estandarizado	42
2.6.1 Farmacia Molecular y preformulación.....	44
2.6.2 Sistema de Clasificación Biofarmacéutica	46
2.6.3 Formulaciones de base lipídica y microemulsiones	49
3. JUSTIFICACIÓN	53
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	55

5.	HIPÓTESIS.....	55
6.	OBJETIVOS.....	56
6.1.	Objetivo general	56
6.2.	Objetivos específicos	56
7.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	58
7.1	Reactivos y disolventes	58
7.2	Animales de experimentación.....	58
7.3	Material vegetal	59
7.4	Secado y molienda de la raíz de <i>H. longipes</i>	59
7.5	Preparación del extracto etanólico de la raíz de <i>H. longipes</i>	59
7.6	Validación del método para la detección y cuantificación de afinina	59
7.6.1	Validación del sistema de análisis	60
7.6.2	Validación del método de análisis.....	61
7.7	Cuantificación de afinina en el extracto etanólico de la raíz de <i>H. longipes</i> ..	64
7.8	Caracterización del extracto etanólico de la raíz de <i>H. longipes</i>	64
7.8.1	Propiedades organolépticas	64
7.8.2	Miscibilidad acuosa a dos temperaturas: 25° y 37°C	65
7.8.3	Análisis microbiológicos.....	66
7.8.4	Índice de refracción	67
7.9	Obtención de un SMEDDS utilizando diagramas de fase pseudoternarios ...	67
7.9.1	Selección del sistema autoemulsificable óptimo	68
7.10	Caracterización del sistema microemulsificable lipídico óptimo	68
7.10.1	Propiedades organolépticas	68
7.10.2	Determinación del tamaño de partícula y el índice de polidispersidad ...	69
7.10.3	Determinación del potencial zeta.....	69
7.10.5	Determinación de la transmitancia.....	69
7.10.6	Determinación del índice de refracción.....	70
7.10.7	Determinación del pH.....	70

7.11	Estabilidad física y química a diferentes valores de pH	70
7.12	Estudios de estabilidad acelerada del HL-SMEDDS	70
7.13	Evaluación de la cinética de liberación.....	71
7.14	Determinación del efecto antihipertensivo del HL-SMEDDS	71
7.15	Efecto de la administración oral a largo plazo del HL-SMEDDS sobre la reactividad vascular: experimentos <i>ex vivo</i>	72
7.16	Prueba preliminar con cápsulas cargadas con el HL-SMEDDS.....	72
7.17	Análisis estadístico	72
8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	74
8.1	Validación del método analítico	74
8.2	Cuantificación de afinina	75
8.3	Caracterización del extracto etanólico cuantificado	76
8.4	Obtención del sistema auto-microemulsificable	77
8.5	Caracterización del sistema automicroemulsificable (HL-SMEDDS).....	81
8.6	Estabilidad a diferentes valores de pH.....	82
8.7	Estudio de estabilidad acelerada	84
8.8	Cinética de liberación de afinina	86
8.9	Determinación del efecto antihipertensivo del HL-SMEDDS.....	87
8.10	Efecto de la administración oral a largo plazo del HL-SMEDDS sobre la reactividad vascular: experimentos <i>ex vivo</i>	89
8.11	Prueba preliminar con cápsulas cargadas con el HL-SMEDDS	90
	CONCLUSIONES.....	91
	REFERENCIAS	93
	ANEXOS	122

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de la afinina.	27
Figura 2. Medicamentos herbolarios aprobados en México periodo 2001-2021.....	36
Figura 3 Curva de calibración obtenida para la cuantificación de afinina en el extracto etanólico de la raíz de <i>H. longipes</i>	75
Figura 4. Diseño simplex reticular aumentado.	79
Figura 5. Gráficos de contorno y superficie de las diez formulaciones del sistema D cargadas con el extracto de la raíz de <i>H. longipes</i>	80
Figura 6. Imagen STEM del HL-SMEDDS, después de diluir 20 veces con agua destilada (dilución 1:20).	82
Figura 7. (A) Concentración de afinina en el extracto etanólico de la raíz de <i>H. longipes</i> (B) Tamaño de gota del HL-SMEDDS.	83
Figura 8. Perfil de liberación de afinina desde el HL-SMEDDS y el extracto etanólico de la raíz de <i>H. longipes</i> en dos soluciones a diferente pH.....	86
Figura 9. Efecto de la administración del extracto etanólico de <i>H. longipes</i> y del HL-SMEDDS (150 mg/Kg/día) sobre la presión arterial sistólica (PAS).	87
Figura 10. Efecto de la administración del HL-SMEDDS (150 mg/Kg/día), sobre la reactividad vascular.	89

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Grado de auto-emulsificación	51
Tabla 2. Solubilidad aproximada en agua.....	65
Tabla 3. Propuestas de sistemas lipídicos.....	67
Tabla 4. Composición de los sistemas lipídicos A, B, C y D.	68
Tabla 5. Parámetros evaluados para la validación del método analítico utilizado en la cuantificación de afinina.....	74
Tabla 6. Miscibilidad acuosa del extracto etanólico de la raíz de <i>H. longipes</i>	76
Tabla 7. Resultados del análisis microbiológico del extracto etanólico de la raíz de <i>H. longipes</i>	77
Tabla 8. Formulaciones preparadas con los excipientes del sistema D obtenidos a partir de un diseño simplex reticular aumentado.....	78
Tabla 9. Medidas de estabilidad del HL-SMEDDS.....	85

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE: Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

RESUMEN

La hipertensión arterial afecta a un elevado número de personas en todo el mundo y se ha convertido en uno de los problemas de salud pública más crítico y costoso. En la actualidad, continúa la búsqueda de nuevas alternativas para tratar esta afección, siendo las plantas medicinales una de las fuentes más valiosas de compuestos prototipo para el desarrollo de nuevos fármacos. *Heliopsis longipes* es una planta endémica de México, cuyas raíces son empleadas para tratar el dolor orofacial y la odontalgia. Los efectos farmacológicos que presentan estas raíces se atribuyen principalmente a las alcanidas, siendo la afinina la alcanida mayoritaria. Nuestro grupo de trabajo demostró que el extracto de diclorometano, preparado a partir de la raíz de *H. longipes*, induce un efecto vasodilatador en el modelo de aorta aislada de rata y la afinina pura induce una significativa relajación del músculo liso arterial. Sin embargo, los extractos orgánicos de la raíz de *H. longipes* y la afinina son poco solubles en agua y por lo tanto, son difíciles de administrar y dosificar por vía oral. En este contexto, la presente investigación tuvo como objetivo desarrollar, a partir de un extracto estandarizado de la raíz de *H. longipes*, una forma farmacéutica autoemulsificable de administración oral con efecto antihipertensivo. Inicialmente se validó el método analítico que se utilizó para cuantificar afinina en el extracto etanólico preparado a partir de la raíz de *H. longipes*. Posteriormente, se caracterizó dicho extracto y, utilizando diagramas de fase pseudoternarios, se obtuvo un sistema auto-microemulsificable (HL-SMEDDS). Se caracterizó la formulación óptima, se comprobó su estabilidad y se determinó el perfil de liberación de afinina *in vitro*. Posteriormente, se determinó el efecto antihipertensivo del HL-SMEDDS utilizando un modelo *in vivo* y se realizaron ensayos de reactividad endotelial *in vitro*. La formulación compuesta por Transcutol: 55% (solubilizante), Tween80/PG: 10% (surfactante/cosolvente), Labrasol: 35% (surfactante), fue seleccionada como óptima. Las pruebas de estabilidad mostraron que el HL-SMEDDS se mantuvo estable a lo largo del tiempo en condiciones extremas. Además, la cantidad de afinina liberada desde HL-SMEDDS a pH 1 y 6.8 fue mayor que la del extracto etanólico de la raíz de *H. longipes*. El HL-SMEDDS, administrado por vía

intragástrica, mostró un efecto antihipertensivo a una dosis de 150 mg de extracto/kg de peso, significativamente mayor que el efecto inducido por la misma dosis del extracto etanólico obtenido de la raíz de *H. longipes*. La administración del HL-SMEDDS aumentó significativamente la reactividad endotelial en comparación con el captopril y el control negativo. Estos resultados indican que el HL-SMEDDS es una alternativa novedosa para mejorar la solubilidad acuosa del extracto y de la afinina, así como evitar la posible precipitación de afinina en los fluidos gastrointestinales a valores de pH 1.0 y 6.8 y, por lo tanto, favorecer la biodisponibilidad oral del extracto etanólico de la raíz de *H. longipes*. Por tanto, el sistema HL-SMEDDS constituye el punto de partida para obtener un medicamento herbolario útil para el tratamiento de la hipertensión arterial.

Palabras clave: Sistemas de administración de fármacos auto-microemulsificables (SMEDDS); *Heliopsis longipes*; afinina; efecto antihipertensivo; plantas medicinales.

ABSTRACT

High blood pressure affects a large number of people worldwide and has become one of the most critical and expensive public health problems. Currently, the search for new alternatives to treat this condition continues, with medicinal plants being one of the most valuable sources of compounds for the development of new drugs. *Heliopsis longipes* is an endemic plant to Mexico, whose roots are used to treat orofacial pain and toothache. The pharmacological effects of these roots are mainly attributed to alkaloids, being affinin the most abundant. Our research group previously demonstrated that the dichloromethane extract, prepared from *H. longipes* root, induces a vasodilator effect in the isolated rat aorta model and pure affinin elicits a significant relaxation of arterial smooth muscle. However, the organic extracts of *H. longipes* root and affinin are poorly water soluble and therefore difficult to administer and dose orally. In this context, the present investigation aimed to develop, from a standardized extract of *H. longipes* root, a self-emulsifying pharmaceutical form for oral administration with antihypertensive effect. Initially, the analytical method obtained to quantify affinin in the ethanolic extract prepared from *H. longipes* root was validated. Subsequently, the crude extract was characterized and a self-microemulsifiable system (HL-SMEDDS) was developed, using pseudo-ternary phase diagrams. HL-SMEDDS was also characterized and its stability and its *in vitro* release profile was determined. Subsequently, the antihypertensive effect of HL-SMEDDS was assessed through an *in vivo* model and endothelial reactivity assays were performed. The formulation composed of Transcutol: 55% (solubilizer), Tween80/PG: 10% (surfactant/cosolvent), Labrasol: 35% (surfactant), was selected as optimal. The stability tests showed that HL-SMEDDS remained stable over time under extreme conditions. Furthermore, the amount of affinin released from HL-SMEDDS at pH 1 and 6.8 was higher than that of the ethanolic extract from *H. longipes* root. In addition, HL-SMEDDS administered intragastrically showed an antihypertensive effect at a dose of 150 mg of extract/kg of body weight, which was significantly greater than the effect induced by the crude ethanolic extract of *H. longipes* root. Administration of HL-SMEDDS significantly increased endothelial reactivity compared to captopril and the negative control.

These results indicate that HL-SMEDDS represents a novel alternative to improve the aqueous solubility and therefore, the oral bioavailability of the ethanolic extract of *H. longipes* root. Therefore, HL-SMEDDS constitutes the starting point to obtain a useful herbal medication for the treatment of arterial hypertension.

Keywords: Self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS); *Heliopsis longipes*; affinin; antihypertensive effect; medicinal plants.

1. INTRODUCCIÓN

La hipertensión generalmente se define por la presencia de una elevación crónica de la presión arterial sistémica por arriba de 120/80 mm Hg (Bergler-Klein, 2019). Esta enfermedad afecta a más de 1 200 millones de personas en todo el mundo y se ha convertido en el problema de salud pública más crítico y costoso (Hamrahian *et al.*, 2022; Rossier *et al.*, 2017). Las pautas internacionales para su tratamiento sugieren la utilización de una terapia triple y en pacientes que permanecen con valores altos, se debe agregar un antihipertensivo de cuarta línea. En los últimos años, a pesar del empleo de dicha terapia combinada, los pacientes continúan con valores elevados de presión, lo cual se conoce como hipertensión resistente (Burnier, 2019; Shalaeva & Messerli, 2023).

Encontrar soluciones a esta problemática resulta de gran importancia en la actualidad. Una medida que se ha utilizado para garantizar el apego de los pacientes al tratamiento es la obtención de medicamentos que combinen los fármacos en una sola tableta (Paulina *et al.*, 2018). Sin embargo, es evidente que es necesario buscar nuevos fármacos o alternativas farmacoterapéuticas para el tratamiento de esta afección. Una opción muy importante en la búsqueda de compuestos prototipo para el desarrollo de nuevos fármacos y medicamentos es la Medicina Tradicional, cuyos principales recursos son las plantas medicinales. Éstas son una fuente potencial muy valiosa de compuestos bioactivos, que podrían llegar a ser fármacos antihipertensivos más eficaces y seguros que los utilizados hasta el momento (Atanasov *et al.*, 2021; Ifeanyi *et al.*, 2019).

México ocupa un lugar esencial en el mundo en cuanto a diversidad biológica, lo cual se refleja en la multiplicidad de plantas de uso medicinal (Falcón-Brindis *et al.*, 2021; Mata, *et al.*, 2019). *Heliopsis longipes* es una especie botánica endémica de México que se emplea en la medicina tradicional mexicana para aliviar el dolor de muelas. Este efecto farmacológico se atribuye a las alcanidas presentes en las raíces de esta especie vegetal, principalmente a la afinina, también conocida como espilantol. Tanto los extractos preparados a partir de la raíz de *H. longipes*, como la afinina en su estado puro, han mostrado diferentes

actividades biológicas y farmacológicas (Althaus *et al.*, 2017; Barbosa *et al.*, 2016; Escobedo-Martínez *et al.*, 2017b; Hernández, Márquez, *et al.*, 2009; Rosa-Lugo *et al.*, 2017). Recientemente, nuestro grupo de trabajo demostró que el extracto de diclorometano de la raíz de *H. longipes* y la afinina inducen un efecto vasodilatador, dependiente de la concentración (Castro-Ruiz *et al.*, 2017). De tal manera, se consideró factible que las raíces de esta planta pudieran ser empleadas para el desarrollo de un medicamento herbolario útil para el tratamiento de la hipertensión arterial.

Para el desarrollo de un medicamento herbolario es necesario identificar los compuestos relacionados con la actividad biológica, alguno de los cuales puede seleccionarse como marcador químico bioactivo; el cual es empleado para el desarrollo del método analítico que será utilizado para las pruebas de control de calidad de los productos que se elaboren a partir del extracto vegetal (Doungsaard *et al.*, 2023; Lau *et al.*, 2019; Yaolei Li *et al.*, 2022; Rivera-Mondragón *et al.*, 2017). No obstante, en algunos casos, es posible utilizar como marcador químico, otro compuesto sintetizado por la planta de interés y que, debido a su mayor proporción en la especie vegetal, pueda ser cuantificado, aunque no presente actividad farmacológica. (Katakam *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2020).

En el proceso de desarrollo de un medicamento herbolario, en primer término, se obtiene un extracto cuantificado, el cual contiene la cantidad necesaria del marcador químico bioactivo que garantiza la actividad biológica deseada. Posteriormente, al extracto cuantificado se le adicionan excipientes con el fin de mejorar sus propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas y garantizar la estabilidad de los compuestos bioactivos. De esta forma se obtiene un extracto estandarizado, que sirve como base para el desarrollo del fitomedicamento o medicamento herbolario (EMA, 2018; Bai *et al.*, 2018).

En este contexto, el objetivo de esta investigación fue desarrollar, a partir de un extracto estandarizado de la raíz de *Heliopsis longipes*, una forma farmacéutica auto-microemulsificable de administración oral con efecto antihipertensivo.

2. ANTECEDENTES

2.1 Hipertensión Arterial

La hipertensión generalmente se define por la presencia de una elevación crónica de la presión arterial sistémica por encima de 120/80 mm Hg. La evidencia creciente indica que el riesgo cardiovascular (RCV) asociado con la elevación de la presión arterial sistémica (PAS) por encima de aproximadamente 115/75 mm Hg aumenta de forma logarítmica lineal. Por lo que, actualmente, se prefiere definir la hipertensión como un síndrome cardiovascular (SCV) progresivo que surge de etiologías complejas e interrelacionadas, en el cual se presenta una elevación sostenida de la PAS. La progresión y sostenimiento del aumento de la PAS están directamente asociados con anormalidades estructurales cardíacas y vasculares que dañan el corazón, los riñones, el cerebro, la vasculatura, y otros órganos; por lo que no se debe confundir la PAS elevada, una manifestación de la enfermedad, con la hipertensión (Giles *et al.*, 2009; Antza *et al.*, 2018).

En los últimos años se ha empleado el término “hipertensión resistente”, la cual se diagnostica cuando, a pesar del empleo de al menos tres fármacos de diferentes clases (incluido un diurético) en combinación correcta, el nivel de presión arterial no es menor de 140/90 mm Hg. También incluimos en esta definición aquellos pacientes a los que se les administra 4 fármacos o más. Se estima que la hipertensión resistente aparece en el 9-18 % de los pacientes hipertensos, y debido al mayor riesgo cardiovascular, este trastorno requiere un diagnóstico y tratamiento especial (Braam *et al.*, 2017; Doroszko *et al.*, 2016; Shalaeva & Messerli, 2023).

2.1.1 Prevalencia de la Hipertensión Arterial en el Mundo

La hipertensión arterial afecta aproximadamente a 1 200 millones de personas alrededor del mundo y constituye una situación alarmante para la salud pública, se estima que para el año 2025, 1 600 millones de la población adulta mundial tendrá hipertensión (Hamrahian *et al.*, 2022). Es una enfermedad que involucra factores ambientales y genéticos (Groha & Schunkert, 2015; OMS, 2023; Rossier

et al., 2017). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) es el principal factor de riesgo para morir de manera prematura a consecuencia de un evento cardiovascular. Afecta aproximadamente a 250 millones de personas en América y en la mayoría de los países, el control de esta enfermedad es deficiente. Por consecuencia, en dicho organismo se adquirió el compromiso de conseguir que en el 2019 al menos el 35 % de las personas con hipertensión en el mundo, tuvieran la presión arterial bajo control (OMS, 2013), así como reducir la prevalencia de la hipertensión en un 33% entre 2010 y 2030 (OMS, 2023).

En general, se ha estimado que el 33 % de la población adulta del mundo presenta hipertensión y que esta proporción aumentará para el 2025. Las tasas de prevalencia son más altas en los hombres de la mayoría de los países europeos y en los Estados Unidos de Norteamérica, mientras que en el caso de África Subsahariana, la India, Turquía y algunos países latinoamericanos incluyendo México, la prevalencia es mayor en las mujeres. Además, la incidencia aumenta progresivamente con la edad en ambos sexos y en todas las regiones investigadas. Es necesario notar que alrededor de dos tercios de las personas con hipertensión están en países en desarrollo; asociándose este hecho, entre otros factores, al mayor tamaño de las poblaciones en estas regiones, así como al cambio en estilo de vida y alimentación (Nguyen & Chow, 2021; Pistoia *et al.*, 2016).

En los Estados Unidos de Norteamérica, datos de la Encuesta Nacional de Examen de Salud y Nutrición de 2017 a 2018 indicaron que del 45 % de los adultos con hipertensión, sólo el 53 % la mantenía bajo control (NCHS, 2020), situación que es aún más alarmante en otros países. Según investigaciones realizadas en China, de 500 223 adultos de 35 a 74 años, el 32 % presentaban hipertensión, de los cuales sólo el 5 % logró el control de la presión arterial (Düsing *et al.*, 2017). Particularmente en China, una elevada PAS fue el principal factor de riesgo de mortalidad y representó 2.54 millones de muertes en 2017, de las cuales el 96 % se debieron a enfermedades cardiovasculares (N. Li *et al.*, 2020).

En América Latina, las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de mortalidad; siendo la hipertensión arterial el principal factor de riesgo que predispone para la aparición de otras enfermedades cardiovasculares. Se estima que el 40 % de la población adulta latinoamericana se ve afectada por la hipertensión arterial (Champagne, *et al.*, 2022). En una encuesta transversal realizada a 7 500 adultos de cuatro ciudades en Argentina, Chile y Uruguay, alrededor del 43 % tenía hipertensión y el 33 % tenía pre-hipertensión. En un estudio que se llevó a cabo en la Ciudad de México, se identificó un incremento en la prevalencia de hipertensión en la población de mediana edad (26 % entre 35 - 44 años) y en ancianos (59 % entre 75 - 84 años); siendo este aumento significativamente mayor en mujeres (Ruilopec *et al.*, 2017).

2.1.2 Hipertensión arterial en México.

Como ya se ha descrito previamente, la hipertensión arterial sistémica (HTA) es uno de los factores de riesgo cardiovasculares más prevalentes en las sociedades modernas. En México, la prevalencia de hipertensión aumentó del 27 % en 1993 al 32 % en 2012 y el impacto de esta la enfermedad es evidente, no sólo en la mortalidad sino también en la morbilidad y la calidad de vida (Arredondo *et al.*, 2017). Aproximadamente 1/3 de los mexicanos mayor de 20 años tiene esta condición. Además, su frecuencia es superior al 50% cuando el paciente presenta síndrome coronario (Borrayo-Sánchez, 2022).

En los últimos años, la HTA se ha mantenido entre las primeras nueve causas de muerte en México lo cual ha aumentado la tasa de mortalidad hasta un 30 %. Ubicando a la HTA como la enfermedad crónica responsable del 18 % de los decesos en el país y como el principal factor de riesgo de muertes prevenibles. En México, solo el 46 % de los hipertensos presentan valores de presión controlados, por ciento más bajo que el de otros países como Cuba (86 %), Estados Unidos de Norteamérica (65 %) y Chile (57 %). Estos países cuentan con médicos especializados en el manejo de la hipertensión arterial y se trabaja en mejorar el apego al tratamiento de estas enfermedades crónicas (Campos-Nonato *et al.*, 2018)

En América Latina, si cada persona con hipertensión conociera su diagnóstico y recibiera un tratamiento adecuado, con al menos un fármaco antihipertensivo, sería muy probable que la enfermedad cardiovascular ya no fuera la principal causa de muerte. En este sentido, con el fin de motivar a la población para medir su presión sanguínea y consultar al médico tan pronto como sus valores salgan del rango normal, sería muy conveniente la implementación de iniciativas y políticas en el ámbito de la salud pública, para la sensibilización sobre el seguimiento de la hipertensión, tal como se ha realizado en el caso de ciertos tipos de cáncer (Ruilopec *et al.*, 2017). Por otra parte, el tratamiento de la hipertensión debe ser afrontado desde una perspectiva integrada: clínica, económica, epidemiológica y organizacional (Alcocer *et al.*, 2019; Arredondo *et al.*, 2017). Además, se deben abordar nuevos enfoques en su tratamiento, entre los cuales juegan un papel muy importante las plantas medicinales (Tabassum & Ahmad, 2011; Disi *et al.*, 2016; Ifeanyi *et al.*, 2019).

2.1.3 Tratamientos actuales para la HTA

El tratamiento efectivo con medicamentos reductores de la presión arterial es uno de los pasos claves identificados por la Federación Mundial del Corazón, para reducir la prevalencia de HTA no controlada. Las pautas actuales recomiendan iniciar el tratamiento con inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina. Si la presión permanece alta, se puede aumentar la dosis o agregar un segundo fármaco. La monoterapia a menudo es insuficiente por lo que para muchos pacientes, el manejo adecuado de la presión arterial requiere una terapia combinada (Atkins *et al.*, 2017; Ott & Schmieder, 2022).

Las pautas internacionales sugieren la utilización de una terapia triple, también conocida como A + C + D, donde "A" es un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina o un bloqueador del receptor de angiotensina, "C" es un bloqueador de los canales de calcio y "D" un diurético tiazídico. En pacientes que permanezcan con valores altos de presión arterial, se debe agregar un antihipertensivo de cuarta línea (Wermelt & Schunkert, 2017; Paulina *et al.*, 2018). Las terapias combinadas son más efectivas que la monoterapia y mejor toleradas, aunque es necesario profundizar en la elección del tratamiento para

diferentes pacientes, teniendo en cuenta las comorbilidades, el sexo, la edad y raza (AHA, 2018; Rochlani *et al.*, 2017).

En la actualidad se han reportado varios problemas relacionados con el tratamiento de la hipertensión, tal es el caso del gran número de pacientes con resistencia a los fármacos antihipertensivos (Braam *et al.*, 2017), así como los efectos secundarios que a menudo se presentan (Albasri *et al.*, 2021). Por otra parte, la falta de adherencia al tratamiento es un problema adicional (Burnier & Egan, 2019), cuyo origen radica en que se tienen que administrar varios medicamentos diferentes de manera concomitante y en el alto costo que estos les representan a los pacientes (Eirin *et al.*, 2016; Hamdidouchea *et al.*, 2017; Rouzaud-laborde *et al.*, 2018).

Por lo anterior, es de vital importancia encontrar soluciones a los problemas antes mencionados, como por ejemplo, la obtención de fármacos combinados en una sola tableta (Paulina *et al.*, 2018) o el descubrimiento de compuestos prototipo novedosos útiles para el desarrollo de nuevos fármacos y medicamentos más seguros y eficaces.

2.2 Utilización de las plantas medicinales

Las plantas medicinales se han empleado, a través de los años, como punto de partida para desarrollar nuevos medicamentos, permitiendo el descubrimiento de compuestos bioactivos novedosos y a su vez la obtención de fitomedicamentos (Atanasov *et al.*, 2021; Howes *et al.*, 2020; Seidel, 2020). Además, las plantas utilizadas en los sistemas médicos tradicionales son más accesibles para la población, específicamente aquella de menores recursos y que cuenta con servicios médicos deficientes (Acosta-Recalde *et al.*, 2018).

Recientemente, numerosos efectos secundarios de los fármacos sintéticos han llevado al uso de plantas medicinales como una fuente confiable de nuevas terapias. Según la OMS, aproximadamente el 80 % de la población mundial utiliza medicamentos a base de plantas y en los países en desarrollo las tasas podrían llegar al 95 % (Ahmad Khan & Ahmad, 2019; M. Kumar *et al.*, 2021; OMS, 2022; Uritu *et al.*, 2018).

En las últimas décadas se ha observado un incremento exponencial en el uso de medicamentos a base de plantas en todo el mundo. Los países europeos, han experimentado un aumento de hasta un 5 % en el consumo de especias e hierbas, estimándose que aproximadamente el 50 % de la población utiliza preparados herbales. Se ha estimado que el 70 % de todos los médicos en Francia y Alemania recetan regularmente medicamentos herbolarios (Khan *et al.*, 2019). En Estados Unidos de Norteamérica la utilización de preparados a base de plantas se ha incrementado, del 3 % en 1990 al 12 % en 1997 y hasta el 30 % en 2008 (Batanero-Hernán *et al.*, 2017). En China, el uso de plantas tradicionales representa aproximadamente del 30-50 % del consumo total de medicamentos. En Nigeria, Zambia, Ghana y Mali el 60 % de la población emplea preparados a base de plantas como la primera línea de tratamiento en el hogar (Khan *et al.*, 2019).

Por otra parte, en Latinoamérica y el Caribe las plantas medicinales son parte importante de la cultura, costumbres, religiones y completan el sistema de salud de la mayoría de estos países. Sobre todo de la población indígena, que además las utilizan para sus rituales (Juárez-Pérez & Cabrera-Luna, 2019).

En México solo el 90 % de la población está cubierta por los servicios básicos de salud, siendo esta la cobertura más baja entre los miembros de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OECD, por sus siglas en inglés), en donde la mayoría de los países cuentan con una cobertura total. En México, a partir de 2017, aproximadamente el 52 % de la atención médica fue financiada por el gobierno, valor que se encuentra muy por debajo del promedio de la OECD (73 %). Además, México cuenta con la segunda mayor proporción de gastos de bolsillo de los hogares, que representaron un 41 % adicional del gasto en salud (OECD, 2019). Aunado a esto, las inversiones en los sistemas de salud son cada vez más limitadas, por lo que la asignación y distribución del recurso económico se debe realizar de manera eficiente. Un punto a tener en cuenta es el fortalecimiento de la medicina preventiva, que puede evitar o retrasar la aparición y desarrollo de enfermedades crónicas, así como el empleo de la medicina natural y tradicional de calidad, con seguridad y eficacia

comprobadas, para contribuir al acceso de todas las personas a la atención de salud (OMS, 2023).

Es así que en México, como en el resto del mundo, existe un interés creciente en el uso de la medicina natural, lo cual ha conducido a un incremento en las investigaciones y exploración de la biodiversidad vegetal de países como México, por parte de las empresas farmacéuticas (Kiani *et al.*, 2018; Piszczek *et al.*, 2019).

2.2.1 Utilización de las plantas medicinales en México.

México ocupa un lugar esencial en el mundo en cuanto a diversidad biológica, lo cual se refleja en el amplio número de plantas de uso medicinal. Su compleja fisiografía e historia geológica y climática han posibilitado la coexistencia de especies de origen tropical y boreal. Lo que ha facilitado, con el transcurso del tiempo, una transformación de diversos grupos taxonómicos en las zonas continentales, costeras y oceánicas de su territorio (Campos-Saladaña *et al.*, 2018; Falcón-Brindis *et al.*, 2021; Sarma *et al.*, 2021; Vidal & Brusca, 2020).

México cuenta con más de 4 000 especies vegetales que pueden ser empleadas para tratar problemas de salud de la población. Aproximadamente el 99% de estas plantas son silvestres, arvenses o ruderales, por lo que debe evitarse la depredación y pérdida por la sobreexplotación. Teniendo en cuenta un posible uso ampliado de la fitomedicina, garantizando la existencia de los recursos medicinales y un control de calidad para los mismos (Olmos-Cruz *et al.*, 2018).

Se estima que alrededor de 3 000 especies vegetales son empleadas con fines terapéuticos y solamente de un 5 % de ellas se conocen sus principios activos. El uso tan difundido de plantas medicinales en México se debe en gran medida a la considerable riqueza florística prevaleciente en este país (Juárez-Pérez & Cabrera-Luna, 2019). Por otro lado, México figura entre los 25 países con mayor diversidad cultural del mundo, ubicado en el sexto lugar gracias a que el 12% de la población pertenece a pueblos indígenas. Con base en esta circunstancia y considerando la estrecha relación de los pueblos indígenas con la biodiversidad,

México está catalogado como el cuarto país bioculturalmente más rico del mundo (Rios *et al.*, 2017; Vidal & Brusca, 2020).

Por lo anterior, las autoridades sanitarias mexicanas han mostrado interés en la investigación y salvaguarda del uso seguro de productos elaborados a base de plantas medicinales, así, la Secretaría de Salud, a través de la Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (CPFEUM) ha publicado la Farmacopea Herbolaria (FHEUM) en sus ediciones 2001, 2013 y 2022 (FHEUM, 2001, 2013, 2022). Sin embargo, si se reflexiona sobre el amplio acervo de plantas medicinales reconocidas por la Medicina Tradicional del país, resulta aún pequeño el grupo (138 monografías) contenido en la última edición publicada (FHEUM 3.0, 2022) de este instrumento legal de control de calidad de dichos insumos, en términos de seguridad y eficacia para materias primas y productos de uso humano. Situación semejante se observa en otros países y regiones del mundo como la Unión Europea, donde la población demanda la comercialización de productos herbales de amplio uso en la medicina tradicional china o ayurvédica, existiendo un registro autorizado de alrededor de 162 monografías de productos herbolarios (EUHM, 2020) y éstos se dividen en dos grandes grupos en función de los datos científicos recabados: los *productos medicinales herbolarios* que reúnen suficiente documentación de actividad terapéutica avalada con datos de estudios científicos y los *productos medicinales herbolarios tradicionales*, que documentan su actividad terapéutica por el uso tradicional, el cual no ha sido científicamente validado (EMA/HMPC, 2018).

Comparando el amplio arsenal de plantas conocidas en la herbolaria tradicional, no sólo en México, sino en el mundo (Box, 2019; Pandey *et al.*, 2020), resulta relativamente reducido el número de productos herbolarios que alcanzan su comercialización bajo la aprobación del organismo regulador sanitario correspondiente; lo cual pareciera paradójico en comparación con el número de artículos científicos y revistas que los publican, y que muestran resultados químicos, farmacológicos y toxicológicos sobre partes o extractos de plantas medicinales (Chinnadurai *et al.*, 2018; Amarasiri *et al.*, 2020; Baker, 2020; Hasanpour *et al.*, 2020; Tili & Sarikurkcu, 2020).

Una problemática muy relacionada con este tema es que los profesionales de la salud (médicos, químicos farmacéuticos, enfermeras, odontólogos, veterinarios); en México no reciben información sobre medicina tradicional durante su formación universitaria. Considerando que una gran proporción de la población utiliza la medicina herbal como complemento, sería necesario la incorporación de temas relacionados con el uso de plantas medicinales en las carreras profesionales relacionadas con la atención a la salud (Alonso-Castro *et al.*, 2017).

Actualmente, existe un interés creciente en abordar el estudio científico integral de las plantas utilizadas en la Medicina Tradicional de México, como lo demuestran las múltiples publicaciones que sobre este tema se encuentran en las principales bases de datos de bibliografía científica (Campos-Saladaña *et al.*, 2018; Mata *et al.*, 2019; Rios *et al.*, 2017). Sin embargo, es escaso o poco difundido el éxito o grado de avance sobre una consolidación de transferencias tecnológicas entre los resultados a nivel de laboratorio y la consecución del registro sanitario tanto de un fitofármaco, como de una forma farmacéutica (medicamento herbolario). Lo cual permitiría la dosificación en una presentación farmacéutica, ya sea de un extracto o directamente de las partes de la planta medicinal que contienen la o las sustancias con actividad farmacológica (CICB, 2018, 2019).

Los medicamentos herbolarios están constituidos por extractos vegetales, que la mayoría de las veces son mezclas de varios principios activos y los cuales ejercen su acción farmacológica en multisitios (pleiotrópica). Un ejemplo muy conocido y estudiado es el extracto estandarizado de *Ginkgo biloba*. El cual está constituido en su mayoría por componentes de tipo flavonoide, con efecto vasodilatador; antioxidante y antiinflamatorio. Adicionalmente, presenta componentes terpénicos que contribuyen a la neuroprotección y al efecto antiagregante plaquetario. De esta forma, el uso del *G. biloba* podría representar la suma de varios efectos farmacológicos tales como un nootrópico; un antagonista de canales de calcio voltaje dependientes tipo L; un antiagregante plaquetario y un antioxidante (Mehmood *et al.*, 2019).

Los productos naturales han contribuido de manera determinante en el proceso de descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos (Patil *et al.*, 2019). Estas moléculas, conocidas comúnmente como metabolitos secundarios, poseen características estructurales que les confieren buenas propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas (Newman & Cragg, 2016).

2.3 *Heliopsis longipes* S.F. Blake (Chilcuague)

Las plantas medicinales han sido y seguirán siendo una fuente muy valiosa e inagotable de nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de diferentes enfermedades, de tal manera que el estudio científico de su hábitat, su composición química, sus efectos farmacológicos, así como de su toxicidad, es indispensable para su conservación y para sustentar su uso medicinal y el desarrollo de nuevos fármacos y fitomedicamentos.

Heliopsis longipes es una planta endémica de la Sierra de Álvarez y la Sierra Gorda, donde coinciden los Estados de San Luis Potosí, Guanajuato y Querétaro. Pertenece a la familia Asteraceae y al género *Heliopsis*. En la Medicina Tradicional Mexicana se emplea para calmar dolores musculares y de muelas, así como antiparasitaria e insecticida (Aguilar-Guadarrama & Gutiérrez, 2007; Cilia-López *et al.*, 2010; Althaus *et al.*, 2017; Castro-Ruiz *et al.*, 2017). Es la especie con mayor importancia económica en su género, y dentro de sus nombres comunes se encuentran: “chilcuague”, “raíz de oro”, “pelitre” y “raíz azteca”.

2.3.1 Estudios farmacológicos realizados sobre extractos de *H. longipes*

Desde hace varios años se han estudiado las propiedades farmacológicas de las raíces del chilcuague, basándose en los conocimientos etnofarmacológicos. Dentro de esas propiedades podemos citar sus actividades fungistáticas y bacteriostáticas, las cuales fueron probadas contra *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotium cepivorum*, *Fusarium* sp., *Verticillium* sp., así como contra hongos fitopatógenos, entre otros; mostrando, en algunos casos, una inhibición del crecimiento del 100%. Esta actividad que se le atribuye a la afinina,

alcamida que como ya se señaló antes, se encuentra en mayor proporción en las raíces de la planta (Molina-Torres *et al.*, 2004).

Otra de las actividades que ha sido ampliamente demostrada para extractos preparados a partir de la raíz de *H. longipes* es su acción analgésica. En uno de los estudios, se encontró que una solución de 10 g/mL de extracto de diclorometano obtenido a partir de las raíces de la planta, mostró un significativo efecto analgésico, mediado por la liberación de GABA, (Rios *et al.*, 2007). En otro estudio, se encontró que un extracto etanólico de las raíces de chilcuague, administrado por vía intraperitoneal a una dosis de 10 mg/kg, indujo un efecto analgésico similar al del ketorolaco (6 mg/kg), al reducir significativamente en los ratones ($p < 0.001$) el número de estiramientos abdominales causados por el ácido acético al 3 % (Cilia-López *et al.*, 2010).

Además del efecto analgésico, se ha encontrado que extractos preparados a partir de la raíz de *H. longipes*, inducen un efecto antinociceptivo. Lo cual se demostró en un estudio donde se administró por vía intraperitoneal un extracto de acetona de *H. longipes*, el cual produjo un efecto antinociceptivo dependiente de la dosis cuando se evaluó en ratones sometidos a ácido acético y capsaicina (Déciga-Campos *et al.*, 2010). Otro estudio para evaluar dicha actividad se realizó en grupos de 6–8 ratones CD1⁺, utilizando las pruebas de retorcimiento y placa caliente. Resultando de igual forma un efecto dependiente de la dosis (Cariño-Cortés *et al.*, 2010).

Otros efectos farmacológicos que se han reportado para extractos de la raíz de *H. longipes* incluyen actividades: antiinflamatoria (Hernández, *et al.*, 2009), antiartrítica (Escobedo-Martínez *et al.*, 2017b), antimutagénica (Arriaga-Alba *et al.*, 2013) y larvicida (Hernández-Morales *et al.*, 2015). Recientemente, un estudio realizado con el extracto hexánico de las raíces de esta especie mostró efectos antiproliferativos significativos y un aumento en la tasa de apoptosis celular en diferentes líneas celulares de cáncer (HeLa, K-562, MCF-7 y HaCaT), por lo que los autores concluyen que esta especie y sus alcamidas tienen potencial para el desarrollo de nuevos agentes anticancerígenos (Willig *et al.*, 2019).

Con relación a este tema, nuestro grupo de trabajo encontró que los extractos etanólicos y de diclorometano de la raíz de *H. longipes*, relajaban significativamente la aorta aislada de rata. Resultados muy valiosos y que no habían sido reportado previamente (Castro-Ruiz *et al.*, 2017). Sin embargo, ya se había reportado previamente que extractos orgánicos (hexánico, clorofórmico, de acetato de etilo y metanólico) obtenidos a partir de las partes aéreas de *Spilanthes acmella* cuyo metabolito activo mayoritario es la afinina, inducían un efecto vasodilatador en anillos de aorta aislada de rata (Wongsawatkul *et al.*, 2008).

Cabe señalar que los estudios de seguridad son de vital importancia en toda investigación de nuevos agentes fitoterapéuticos, los cuales deben ser realizados desde etapas tempranas de la investigación. Para esta planta se reporta un estudio realizado para comprobar efectos mutagénicos y citotóxicos, los cuales fueron evaluados con un ensayo de micronúcleos en ratones CD1⁺. En el cual se concluyó que *H. longipes* no presenta efectos genotóxicos *in vivo* (Cariño-Cortés *et al.*, 2010).

2.3.2 Alcamidas, principales metabolitos encontrados en *H. longipes*

Las alcamidas (N-alquilamidas, alquenidas o alquenilamidas) representan una clase de productos naturales con considerable diversidad estructural y un amplio espectro de bioactividades (Althaus *et al.*, 2017). Son un conjunto de metabolitos lipídicos activos en el sistema nervioso central que producen efectos analgésico e inmunomodulador. Se consideran marcadores quimiotaxonómicos para las familias de plantas que las biosintetizan (Rosa-Lugo *et al.*, 2017). Recientemente, se reportó que algunas alcamidas podrían ser empleadas para tratar la tripanosomiasis, también conocida como enfermedad del sueño africana, la cual ha provocado grandes epidemias en diferentes años (Skaf *et al.*, 2018).

Se han aislado varias alcamidas de *H. longipes*, pero la afinina (Figura 1), también conocida como espilantol ((2E, 6Z, 8E) -N-isobutil-2,6,8-

decatrienamida), se identificó como la principal alcanamida en esta planta; relacionándosele con las diversas acciones farmacológicas inducidas por extractos preparados a partir de esta especie (Willig *et al.*, 2019).

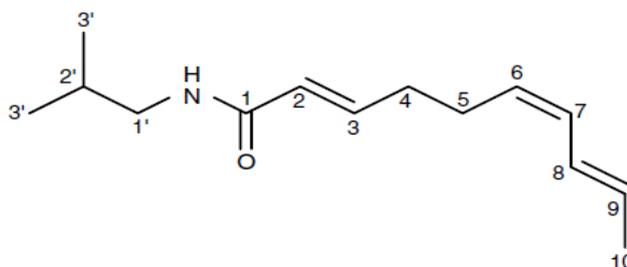


Figura 1. Estructura química de la afinina.

En cuanto a las propiedades antinociceptivas de la afinina, éstas se han relacionado con la liberación de GABA, así como con la activación de las vías opioides, serotoninérgicas y del óxido nítrico. De tal forma, el entumecimiento intenso, no punzante y sensación de hormigueo causada por afinina cuando se administra por vía oral, sugiere que este compuesto y las alcanamidas relacionadas a él, podrían ser útiles para el tratamiento del dolor (Rosa-Lugo *et al.*, 2017). Además, se han reportado evidencias de que esta alcanamida posee efectos antiinflamatorios (Thomsen *et al.*, 2018) y antimutagénicos (Arriaga-Alba *et al.*, 2013).

En otra investigación se reportó la evaluación de los efectos de la afinina, obtenida a partir de la planta *Acmella oleracea*, sobre la expresión de la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) y mediadores relacionados con la inflamación en células epiteliales de pulmón humano A549 estimuladas con interleucina 1 beta (IL-1 β). Se encontró que la afinina disminuyó la expresión de la prostaglandina E2 (PGE2), la ciclooxigenasa-2 (COX-2), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1). También disminuyó la expresión de ICAM-1 y suprimió la adhesión de monocitos a las células A549 estimuladas con IL-1 β . Los autores de dicha investigación concluyeron que la afinina podría ejercer sus efectos antiinflamatorios mediante una inhibición de la expresión de las citocinas proinflamatorias, COX-2, e ICAM-1, provocando la inhibición de las rutas de señalización del factor nuclear

potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-κB) y de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Huang *et al.*, 2018).

En otro estudio publicado por los autores de la investigación antes mencionada, se encontró que debido al efecto antiinflamatorio de la afinina, ésta podría ser empleada en la dermatitis atópica, enfermedad cutánea alérgica recurrente causada por enfermedades genéticas y factores medioambientales. Para ello, usaron 2,4-dinitroclorobenceno para inducir lesiones cutáneas en ratones, similares a las de la dermatitis atópica. El tratamiento tópico con afinina redujo los niveles de inmunoglobulina (Ig) E e IgG2a y suprimió la expresión de la COX-2 y la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), a través del bloqueo de la ruta de las MAPK. Además, los exámenes histopatológicos revelaron que la afinina redujo el grosor epidérmico y la acumulación de colágeno e inhibió los mastocitos y la infiltración de eosinófilos (Huang *et al.*, 2019).

En un estudio realizado con la afinina purificada a partir de *A. oleracea*, se evaluó su efecto en la mucositis intestinal inducida por 5-fluorouracilo en ratones. El 5-fluorouracilo es un fármaco antineoplásico administrado para el tratamiento de diversos tipos de cáncer y la mucositis es un efecto secundario común en pacientes con cáncer sometidos a tratamiento con radioterapia y/o quimioterapia. Actualmente se carece de un tratamiento adecuado y efectivo para tratar este efecto secundario indeseable. En dicha investigación se encontró que la administración diaria de afinina disminuyó significativamente la gravedad de la mucositis intestinal, reduciendo los cambios histopatológicos y aumentando la altura de las vellosidades en los animales tratados (De Freitas-Blanco *et al.*, 2019).

En otra investigación realizada con la planta *A. oleracea*, se emplearon macrófagos activados, y se midió el aumento de óxido nítrico (NO, por sus siglas en inglés) como marcador bioquímico de inflamación. Se encontró que la afinina, reduce la producción de NO en los macrófagos activados en respuesta al interferón-γ y al lipopolisacárido y brinda protección contra la muerte celular dependiente de NO. Además, esta alcamida redujo la expresión de ARNm, de la iNOS y como posible mecanismo subyacente, inhibió la activación de varios

factores de transcripción (NFκB, ATF4, FOXO1, IRF1, ETS y AP1). Por lo que en esta investigación se concluyó que estos eventos, probablemente contribuyen al efecto antiinflamatorio de la afinina observado tanto en la dermatitis como en la pancreatitis (Bakondi *et al.*, 2019).

Recientemente, nuestro grupo de investigación demostró por primera vez, que la afinina induce un significativo efecto vasodilatador en el modelo de aorta aislada de rata, cuyo mecanismo de acción involucra la vía de señalización de los neurotransmisores gaseosos y de la prostaciclina (Castro-Ruiz *et al.*, 2017). Así, con base en la actividad relajante del músculo liso arterial de la afinina, resultaría muy interesante la elaboración de un extracto estandarizado con base en afinina de la raíz de *H. longipes*, el cual contiene una alta proporción de esta alcaloide. Una vez obtenido el extracto estandarizado, sería posible formularlo como medicamento herbolario para el tratamiento de la hipertensión arterial.

2.4 Medicamentos Herbolarios

Como ya se mencionó previamente, en los últimos años, el interés de la población mundial por el consumo de las plantas medicinales se ha potencializado, lo cual ha propiciado que la industria farmacéutica las emplee para producir extractos estandarizados, medicamentos herbolarios, nutracéuticos y cosmeceúticos. De hecho, se espera que su uso se incremente más rápido que el de los medicamentos convencionales (Ahn, 2017; Mcchesney *et al.*, 2019; Vasisht *et al.* 2016).

Por lo anterior, y debido a que algunas especies de plantas medicinales pueden presentar toxicidad e inducir efectos adversos en el organismo, es fundamental que se propicie el estudio científico multidisciplinario de las plantas empleadas con fines medicinales, a fin de caracterizar su composición química, sus efectos farmacológicos y su toxicidad; de modo que su consumo sea eficaz y seguro. De tal manera que se favorezca el desarrollo de medicamentos herbolarios que representen una alternativa terapéutica para atender los principales problemas de salud que aquejan a la humanidad (Khan *et al.*, 2019).

De acuerdo con la OMS, los medicamentos herbolarios se describen como productos medicinales acabados y etiquetados, conteniendo ingredientes activos estandarizados; de modo que están formados por partes aéreas (hojas, flores, tallos y/o sus partes) o subterráneas (raíces, bulbos) o semillas de plantas u otro material vegetal, o combinaciones de éstos, en estado crudo o en forma de preparaciones vegetales (OMS, 2000).

En los medicamentos herbolarios se conjuntan los conocimientos ancestrales etnobotánico y etnomédico con el conocimiento farmacológico básico y clínico actual (M. Kumar *et al.*, 2021; Sulaiman *et al.*, 2020). De esta forma, se continúa con el uso de las plantas medicinales, pero con el respaldo de disciplinas como el análisis instrumental, la farmacocinética, la farmacodinamia, la biofarmacia y toda la tecnología farmacéutica actual; lográndose un medicamento con contenido vegetal (extracto o partes estandarizadas de la planta), pero de mayor seguridad que los productos ancestrales artesanales; lo que los hace confiables para su uso como medicamentos de venta libre (Morales & Morales, 2009).

2.4.1 Medicamentos herbolarios aprobados por la Administración Federal de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos de Norteamérica

La Administración Federal de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos de Norteamérica (FDA, por sus siglas en inglés) estableció un equipo de revisión para desarrollar pautas para la comercialización y regulación de productos botánicos como medicamentos de venta libre, para suscribirse al mismo nivel de rigurosidad que se espera de los medicamentos actualmente utilizados por la biomedicina. Para lo cual se publicó la "Guía para la Industria: Productos Farmacéuticos Botánicos" (FDA, 2016). Entre 2004 y 2013 la FDA recibió más de 400 solicitudes de nuevos ingredientes dietéticos (NDI) para nuevos productos botánicos y, si bien a la mayoría se les permitió ingresar a los ensayos clínicos de fase 2, sólo dos han recibido hasta ahora aprobación de la FDA: Veregen® (sinecatechins) en 2006 y Mytesi® (crofelemer) en 2012. Varios de

los productos restantes se encontraban hasta el 2020 en ensayos de fase 3 (Avigan *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2020).

En el periodo 2016-2018, la FDA aprobó 127 nuevos medicamentos, de ellos, 59 en 2018, siendo clasificados según la estructura química de la molécula activa (fármaco, biofármaco o biotecnológico). Entre dichos medicamentos aprobados se encuentran 36 productos biológicos y 91 químicos; siendo los anticuerpos monoclonales los predominantes en el campo biológico, ya que se aprobaron 28 durante el periodo antes mencionado y de ellos, 12 en el último año. Los productos químicos son las llamadas moléculas pequeñas, que continúan representando una proporción considerable de nuevos medicamentos. Sin embargo, con relación a los medicamentos basados en productos naturales y “TIDES” (oligonúcleo-tides y pép-tides), representan aproximadamente el 10% de los nuevos medicamentos. De hecho, en el mercado hay actualmente 14 medicamentos inspirados en productos naturales, y 13 TIDES (Shaer *et al.*, 2019).

Por lo anterior, es importante considerar que en el ámbito farmacéutico se manejan varios términos que no deben confundirse, los fármacos basados o inspirados en productos naturales, no son medicamentos herbolarios, son moléculas o principios activos que se han aislado (metabolitos) y purificado o sintetizado a partir de productos naturales (Thomford *et al.*, 2018). Por lo que, si son metabolitos que se encuentran aún en los extractos naturales, éstos podrían ser estandarizados con base en al menos uno de ellos utilizado como marcador químico, para de esa forma poder utilizar el extracto natural que contenga estos analitos sin necesidad de aislarse o sintetizarse y a su vez tener potencialmente mejores resultados por la sinergia que puede ejercer el conjunto de los metabolitos presentes en el extracto (Wagner, 2011).

2.4.2 Diferencias entre Medicamento Herbolario y Suplemento Nutricional

En 1994, en los Estados Unidos de Norteamérica (USA) fue aprobada el Acta de Educación en Salud para Suplementos Dietéticos (DSHEA, por sus siglas en

inglés), la cual define y con ello diferencia: "suplemento dietético o alimenticio" y "nuevo ingrediente dietético". El Acta estableció requisitos específicos y fueron reclasificadas las vitaminas y los minerales como suplementos dietéticos. La DSHEA define un suplemento dietético como "productos herbales, extractos de plantas, alimentos tradicionales, secos o concentrados de frutas, vitaminas o minerales; presentados en una forma farmacéutica y destinados a mejorar la ingesta dietética total, o complementar o sustituir un componente". También estipula que un suplemento dietético no está destinado a reemplazar una comida. La DSHEA permite a los fabricantes comercializar sus suplementos dietéticos sin tener que recibir la aprobación de la FDA. Esto significa que la empresa fabricante no necesita probar la eficacia de su producto y también que por sí misma es responsable de la seguridad del producto (DSHEA, 1994; FDA, 2019).

No obstante, la FDA puede tomar cualquier medida reglamentaria para eliminar del mercado los productos inseguros, incluidos los productos que contienen nuevos ingredientes dietéticos para los que no hay pruebas suficientes de seguridad, haciéndolo mediante una notificación de seguridad previa a la comercialización. Estas medidas contrastan con las aplicadas a los medicamentos convencionales, que no pueden comercializarse hasta que se demuestre que son efectivos y seguros (Avigan *et al.*, 2016; Mukherjee *et al.*, 2017).

Todo suplemento alimenticio y nutracéutico debe fabricarse según los buenos procedimientos de fabricación (BPM, por sus siglas en inglés) establecidos por la FDA, la cual en 2011 emitió pautas sobre suplementos dietéticos, de cómo cumplir con los requisitos reglamentarios para proporcionar una seguridad previa a su comercialización. Por lo tanto, en los demás países existe un requisito urgente de adhesión a las BPM para asegurar la calidad de los suplementos nutracéuticos y dietéticos (Mukherjee *et al.*, 2017).

En los últimos años se han retirado del mercado numerosos suplementos alimenticios, como es el caso del Lipokinetix® (mezcla de cafeína, yohimbina y ácido úsnico, entre otras), el cual fue indicado para potencializar la pérdida de

peso por imitación del ejercicio, apoyándose en un aumento de la tasa metabólica. La FDA recibió varios informes de eventos adversos de hepatitis aguda y/o insuficiencia hepática después de que los consumidores habían usado Lipokinetix®, el cual indujo lesiones en el hígado de individuos entre 20 y 32 años que no tenían antecedentes de lesión hepática. Otro caso que se reporta es el de OxyELITE® Pro, el cual contenía dietilpropiona, 1,3-dimetilamina (DMAA). El fabricante de este producto fue informado por la FDA de que éste ingrediente estaba relacionado con hepatotoxicidad y con anomalías cardiovasculares, como taquicardia e hipertensión, por lo que tuvo que ser retirado del mercado o reformulado sin la DMAA (Avigan *et al.*, 2016).

Por lo anterior, no se deben confundir los suplementos alimenticios con los medicamentos herbolarios, ya que estos últimos se registran con la misma rigurosidad que los medicamentos convencionales; asegurando su seguridad y eficacia en ensayos clínicos. De no ser así, no se estaría haciendo referencia a un medicamento herbolario sino a un preparado herbolario o un suplemento alimenticio.

2.4.3 Medicamentos Herbolarios en México

De acuerdo con el Marco Regulatorio de Medicina Herbolaria en México, se define como medicamento herbolario (MH) a: “aquellos productos elaborados a partir de materia vegetal o derivados cuyos ingredientes principales son porciones de plantas o extractos estandarizados, colorantes y jugos o resinas, aceites grasos o esenciales, en forma farmacéutica cuyo efecto terapéutico y seguridad ha sido confirmada en la literatura científica nacional e internacional” (Ley General de Salud Art. 224). También se incluye la formulación de excipientes y aditivos (Art.66 Fracción III del Reglamento de Productos Sanitarios). En esta definición se excluyen sustancias psicotrópicas o narcóticas sintéticas, mezclas con fármacos alopáticos, procaína, efedrina, yohimbina, hormonas animales o humanas y otras sustancias con actividad hormonal, así como otros productos que representen riesgo para la salud (Reglamento de Productos Sanitarios Art.66 a 68). También los ingredientes activos aislados y

químicamente definidos se excluyen (Gandhi *et al.* 2020; Secretaría de Salud 1999).

De acuerdo a una publicación de la Gaceta Médica de México, relacionada con un Simposio sobre la capacidad de regulación en salud en México (Santos-Burgoa *et al.*, 2018), los medicamentos y demás insumos sanitarios deben atender los patrones de morbilidad y mortalidad en el país. El Plan Nacional de Desarrollo 2019-2024 estableció como principal objetivo fortalecer el acceso efectivo y oportuno de la población mexicana a un mercado farmacéutico correctamente abastecido con productos seguros, eficaces y de calidad. En este sentido, la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) cumple con la función de contribuir a la protección de la salud de la población; habiéndose proyectado el fortalecimiento a corto plazo, de la regulación no sólo de los medicamentos, sino también de los remedios herbolarios y otros insumos para la salud, quedando para un mediano plazo la regulación de alimentos y suplementos alimenticios (Sánchez-Tépoz *et al.*, 2018).

De acuerdo a lo publicado por Gallaga Solórzano *et al.*, 2016 en la Revista COFEPRIS, la función reguladora y por ende, de vigilancia sanitaria de esta entidad del Estado, con relación a la calidad en términos de seguridad y eficacia de los remedios y medicamentos herbolarios, está contenido en la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM 3.0, 2022); de modo que no se podrá obtener el registro sanitario para la comercialización de alguno de ambos productos, si no se cumplen las especificaciones contenidas en las respectivas monografías, tanto para las sustancias activas o componentes de las plantas, así como de los aditivos utilizados en la elaboración de la forma farmacéutica, como las referidas al control de calidad del producto (Gallaga-Solórzano *et al.*, 2016).

Para la aprobación de un medicamento herbolario en México se debe presentar la información que se necesita para solicitar la autorización de comercialización ante la COFEPRIS:

1. Formato de autorizaciones, certificados y visitas, debidamente requisitados.

2. Comprobante de pago de derechos, en términos de la Ley Federal de Derechos

3. La información técnica y científica que demuestre:

La identidad y pureza de sus componentes de acuerdo con lo que establezcan las farmacopeas especiales, o en su defecto, las fuentes de información científica internacional

Descripción del envase primario y secundario

Método de identificación del principio o principios activos

4. La información técnica y científica que demuestre la estabilidad del producto terminado:

Certificado de identificación taxonómica de cada una de las plantas utilizadas o el documento en el que conste la información sobre la identidad de los componentes

5. Indicaciones terapéuticas

6. Proyecto de etiqueta

7. Instructivo para su uso

8. Descripción del proceso de fabricación del medicamento por registrar

9. Información para prescribir en sus versiones amplia y reducida

El registro de producto permite la comercialización por un plazo de 5 años con posibilidad de prórroga, siempre y cuando no haya modificaciones a cualquiera de los componentes o procesos involucrados. Para el caso de un remedio herbolario también se tiene que reunir una serie de requisitos documentales sobre composición, procesamiento y uso (que no debe ser sólo paliativo de algunos “síntomas participantes o aislados” de la enfermedad), otorgándose al cumplimiento de lo anterior, una clave alfanumérica con vigencia indeterminada (COFEPRIS, 2020; Gallaga-Solórzano *et al.*, 2016; Gandhi *et al.*, 2020).

En México hasta el 2021 se habían aprobado 252 MH en un periodo que comprendió de 2001-2021. Los listados por años se encuentran en la página oficial de la COFEPRIS y se resumen en la Figura 2 (COFEPRIS, 2021).

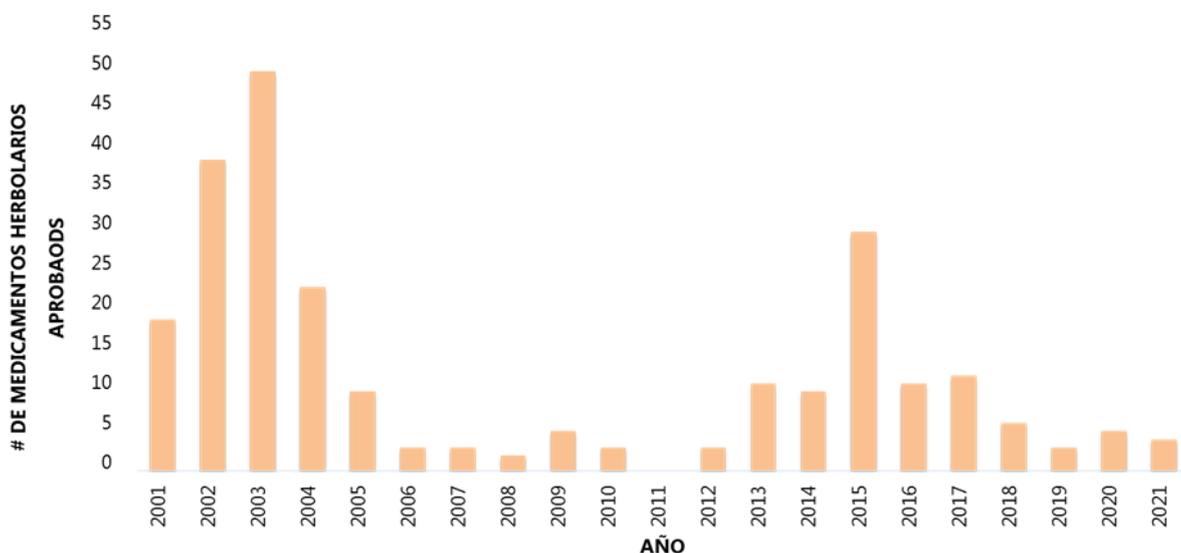


Figura 2. Medicamentos herbolarios aprobados en México periodo 2001-2021.

2.4.3.1 Regulaciones

La guía de desarrollo de medicamentos botánicos de la FDA describe planes de desarrollo apropiados para que los fármacos botánicos sean presentados como nuevas solicitudes de medicamentos (NDA, por sus siglas en ingles), y recomendaciones específicas sobre la solicitud con fines de investigación de un candidato a un nuevo fármaco (IND, por sus siglas en inglés). El término botánico significa productos que incluyen materiales vegetales, algas, hongos macroscópicos y combinaciones de los mismos. La guía de la FDA recomienda que la IND debe contener suficiente información para demostrar que el medicamento es seguro para probar en humanos y que el protocolo clínico está diseñado adecuadamente para su propósito (Bhatt, 2016; FDA, 2016)

Para asegurar la calidad, seguridad y eficacia de los medicamentos herbolarios y que puedan ser incorporados a los sistemas de salud, los métodos de control de calidad deben basarse en el conocimiento de la naturaleza química de los principales compuestos activos que están presentes en el material vegetal. Es importante además conocer la concentración de estos principios activos y su

estabilidad durante el periodo de almacenamiento. Para la comercialización de los medicamentos herbolarios o fitomedicamentos, en varios países se debate si la venta de éstos debe hacerse libremente considerándolos como suplementos alimenticios, o bien, si estos productos debieran someterse a las regulaciones aplicadas a los medicamentos convencionales (Villarreal *et al.*, 2014). Tal situación, como ya se ha venido mencionando, ha quedado claramente establecida en México.

Para regular los procesos involucrados en la fabricación de medicamentos (incluidos los medicamentos herbolarios), existen en México las Normas Oficiales Mexicanas (NOM).

El 7 de junio de 2016, la Secretaría de Salud de México publicó en el Diario Oficial de la Federación nuevas reglas propuestas, con respecto a las especificaciones relacionadas con la estabilidad y los requisitos de ensayos de estabilidad para los medicamentos, incluyendo a los medicamentos y remedios herbolarios comercializados en los Estados Unidos Mexicanos; todo lo cual está contenido en la NOM-073-SSA1-2015 (vigente), Estabilidad de fármacos y medicamentos, así como de remedios herbolarios (NOM-073-SSA1, 2015a). Las nuevas reglas deben vincularse con otras normas aplicables existentes, como la NOM-248-SSA1-2011 (vigente), Buenas prácticas de fabricación para establecimientos dedicados a la fabricación de remedios herbolarios (NOM-248-SSA1, 2011), así como la NOM-059-SSA1-2015 (vigente), Buenas prácticas de fabricación de medicamentos (NOM-059-SSA1, 2015) y la NOM-072-SSA1, 2012 (vigente), Etiquetado de medicamentos y de remedios herbolarios (NOM-072-SSA1, 2012). Las especificaciones para el material vegetal utilizado en los medicamentos herbolarios registrados también deben cumplir con los estándares de calidad establecidos en la FHEUM 3.0 (vigente) (FHEUM, 2022).

2.5 Estandarización de un extracto natural

La estandarización de extractos vegetales se refiere al establecimiento de la calidad reproducible, por medio de la comparación de un producto con sustancias de referencia establecidas y definiendo las cantidades mínimas de uno o varios componentes o de un grupo de éstos. Con ello, se busca garantizar

la potencia de las sustancias constituyentes del producto final. La estandarización se realiza considerando alguno de sus compuestos bioactivos como marcador químico. Cabe resaltar en este punto, la diferencia de este último con el marcador químico bioactivo; definiéndose como marcador químico: a la sustancia de la planta medicinal utilizada con fines de calidad, que puede ser o no la responsable de la actividad terapéutica (FHEUM, 2013; NOM-072-SSA1, 2012 vigente; NOM-073-SSA1, 2015 vigente).

Existen numerosas razones para estandarizar un extracto, citando por ejemplo la obtención de productos reproducibles y de calidad, así como el cumplimiento de los estándares básicos requeridos en el desarrollo, producción y comercialización de medicamentos, bajo los actuales conceptos de Calidad por Diseño (QbD, por sus siglas en inglés) (Dounsaard *et al.*, 2023). Se debe contar con un extracto estandarizado para comenzar con ensayos clínicos y así probar científicamente sus efectos. Además, como los extractos estandarizados tienen seguridad comprobada, podrían aumentar el nivel de confianza de los consumidores y por tanto la aceptación de los medicamentos herbolarios (Manzon *et al.*, 2020).

Existen dos tipos de extractos estandarizados: (i) extracto con un constituyente activo, donde un componente bioquímico específico está a una concentración que puede no encontrarse naturalmente en la planta, por ejemplo: 95% de curcuminoides en un extracto de cúrcuma, sería un producto estandarizado con sólo un 5% de los otros componentes de la cúrcuma con los que se combina la curcumina; (ii) extracto con marcador, en éste se establece que una cantidad especificada de un marcador químico está presente “naturalmente” en el producto terminado, sin afectar la concentración del resto de los metabolitos presentes en el extracto (Hariharan & Subburaju, 2012).

En la presente investigación se desarrollará un extracto estandarizado utilizando como marcador químico bioactivo a la afinina, el cual debe ser cuantificado para posteriormente continuar con el proceso de estandarización, formulando con aditivos que permitan su administración oral en ensayos preclínicos en un

modelo de ratas hipertensas, así como el desarrollo de una forma farmacéutica de administración oral para futuros estudios clínicos con humanos.

2.5.1 Extracto cuantificado

Para la cuantificación de un extracto se debe utilizar una técnica analítica validada que permita establecer en qué proporción se encuentra un determinado marcador químico. La Agencia Europea de Medicamentos (EMA, por sus siglas en inglés), al igual que la FEUM y la COFEPRIS en México, define los marcadores químicos como constituyentes químicamente definidos o grupos de constituyentes de un medicamento, preparado a base de plantas, que son de interés para fines de control de calidad, independientemente de si poseen alguna actividad terapéutica; aunque lo deseable es que dichos marcadores químicos sean igualmente componentes únicos que contribuyan a los efectos terapéuticos de una medicina herbolaria (S. Li *et al.*, 2008; Yaolei Li *et al.*, 2022; Rivera-Mondragón *et al.*, 2017).

El control de calidad enfocado en la autenticación, seguridad y eficacia de los medicamentos herbolarios ya patentados y en desarrollo, es sin duda una de las principales prioridades para la industria farmacéutica en la actualidad. Hoy en día, el sistema de control de calidad adoptado para los medicamentos herbolarios es principalmente orientado a marcadores químicos, refiriéndose con ello al uso correcto de las materias primas vegetales, así como a cuestiones de seguridad (Lau *et al.*, 2019). Los estudios de control de la calidad utilizando marcadores químicos también permiten identificar adulteraciones, así como la determinación del mejor momento de cosecha, confirmación de los sitios de recolección de la planta, evaluación de métodos de procesamiento de ésta o de sus partes o extractos, pruebas de estabilidad y diagnóstico de intoxicación (Bai *et al.*, 2018).

2.5.2 Extracto estandarizado

En los extractos estandarizados las sustancias se ajustan dentro de un rango aceptable que mantenga la actividad terapéutica conocida; la estandarización se logra agregando excipientes para ajustar la concentración de los compuestos

bioactivos de la planta. En el caso de México y la Unión Europea, el nombre y el contenido de los constituyentes con actividad terapéutica conocida deben ser declarados, indicando la cantidad equivalente de la sustancia o marcador químico (como un intervalo, si aplica) (EMA, 2018); lo mismo aplica para el registro sanitario en México, como se indica en el Formato de Registro sanitario de medicamentos herbolarios de fabricación nacional (COFEPRIS, 2020), en concordancia con la NOM-072-SSA1, 2012.

La forma de notificar el contenido en la etiqueta de un medicamento herbolario incluye el nombre del marcador y su cantidad debajo de la denominación de la forma farmacéutica en que se encuentre, declarándose en la fórmula “la forma fisicoquímica del ingrediente (extracto seco, extracto fluido, aceite esencial, polvo, etc.) la parte de la planta usada, el nombre científico, entre paréntesis el nombre común, la cantidad del principio activo y la equivalencia al marcador químico”. Los nombres científicos se imprimirán uno a continuación del otro separado con comas, si se trata de más de tres especies vegetales se deberá incluir la leyenda “mezcla de plantas” y puede omitirse la concentración de éstas (NOM-072-SSA1, 2012, vigente). Esta misma norma señala como importante, el que en la etiqueta aparezca la frase: “medicamento herbolario”.

2.5.3 Ensayos preclínicos

Los estudios preclínicos se refieren por lo general a las pruebas *in vitro* e *in vivo* realizadas con animales de laboratorio, con una molécula nueva que se pretende registrar como un medicamento (candidato a fármaco), procedimiento u otro tratamiento médico, antes de que se puedan realizar ensayos en humanos. Durante el desarrollo del estudio preclínico de candidatos a fármacos, deben evaluarse los efectos tóxicos y farmacológicos (Shegokar, 2020). La FDA requiere que las empresas patrocinadoras desarrollen un perfil farmacológico, determinen la toxicidad en al menos dos especies de animales y realicen estudios de toxicidad a corto plazo; debiéndose cumplir con varios requisitos preclínicos para diferentes tipos de animales de laboratorio (Anatol *et al.*, 2014).

La información recopilada en los estudios preclínicos se utiliza como evidencia y apoyo en las solicitudes de la FDA en USA y la COFEPRIS en México, para la

aprobación de nuevos medicamentos y procedimientos médicos. No obstante, se requiere de mayor número de datos sobre los niveles de dosificación y toxicidad del compuesto para determinar si está justificado y es razonablemente seguro proceder con los estudios clínicos que proporcionarían información acerca de la farmacocinética, la farmacodinamia y la toxicidad del candidato a fármaco que se está desarrollando (Osakwe, 2016).

La farmacodinamia establece el índice terapéutico de un fármaco, que describe la proporción de la dosis que causa toxicidad y la dosis que produce un efecto terapéutico. Los estudios farmacocinéticos determinan la cantidad del fármaco activo presente en el cuerpo, particularmente en el sitio objetivo. Con estos estudios se pueden describir los cinco procesos fundamentales por los que debe pasar el medicamento para ejercer su acción: Liberación, Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción (LADME), y su relación con las concentraciones plasmáticas durante el tiempo. Lo cual permite establecer el rango de dosis e intervalos de administración para las fases posteriores del ensayo clínico. Para determinar si un fármaco es seguro para administrar en humanos, se realizan los estudios de toxicidad preclínica (Honek, 2017; Rai & Rozario, 2023).

En el caso del extracto estandarizado, para obtener la información necesaria para su posterior registro sanitario ya como medicamento herbolario, se tendrían que realizar los ensayos preclínicos antes mencionados, para después proceder a realizar los ensayos clínicos con una forma farmacéutica de dosificación, a fin de obtener los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos que proporcionan información sobre el efecto y la seguridad del producto en sujetos sanos y en pacientes (COFEPRIS, 2014; Gallaga-Solórzano *et al.*, 2016).

Un aspecto importante de las aportaciones de los estudios preclínicos al conocimiento sobre las propiedades y la actividad esperadas del extracto estandarizado, es que en los ensayos *in vitro* se obtendrá información del efecto farmacológico del extracto contenido en la formulación propuesta, mientras que en los ensayos *in vivo* se pretende observar el efecto integral de la formulación, es decir, de la mezcla formada por los componentes activos del extracto herbal

en la forma física de estudio, junto con los aditivos que constituyen la formulación (solución, suspensión, emulsión, microemulsión, polvo, granulado). Esto último se explica porque se estará estudiando la contribución al efecto farmacológico, farmacocinético, biofarmacéutico y terapéutico final, de la solubilización o liberación de los componentes bioactivos desde la matriz extracto-mezcla de aditivos, que impactan en la biodisponibilidad (Dong *et al.*, 2019).

2.6 Preformulación y formulación del extracto estandarizado

Las estadísticas de aprobación de medicamentos, por parte de la FDA, indican que alrededor del 90% fallan en los ensayos clínicos de fase II y III, posiblemente debido a la ineficacia del fármaco (55%), problemas de toxicidad (30%), razones comerciales (5%), obstáculos operativos (5%) y errores desconocidos (5%). Por lo tanto, para minimizar estos problemas durante las últimas etapas del desarrollo y registro de las formulaciones, es necesario realizar estudios de preformulación antes de la etapa de desarrollo (Acharya *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2022).

Al considerarse el extracto estandarizado un símil de un fármaco para registro sanitario nuevo, uno de los puntos de partida para el desarrollo de la fórmula de un medicamento herbolario y que se requiere realizar para plantear la fórmula que permitirá la dosificación del extracto estandarizado en los animales del estudio preclínico, involucra la realización de estudios de preformulación. Estos estudios tienen como finalidad la obtención de una forma farmacéutica adecuada para su administración durante los estudios clínicos y que puede constituir la forma farmacéutica final para su aprobación por los organismos reguladores (Górniak *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2020).

Una vez que una molécula ha sido seleccionada como potencial candidata para el desarrollo de un nuevo fármaco, durante el proceso de desarrollo se debe evaluar su farmacocinética, su toxicidad y su eficacia en modelos animales a fin de que pueda ser aprobada para ser evaluada en estudios clínicos (Shanley, 2018; Sun *et al.*, 2022). Para esto, se suele preparar una formulación simple en la que se suspende el fármaco en hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), con o sin la ayuda de un tensoactivo como el Polioxietilen sorbitan monolaurato o Sorbitán

80 (Tween®80). De manera semejante, las cápsulas de gelatina dura o suave suelen ser el primer recurso de dosificación para un estudio clínico rápido de Fase I, colocando el fármaco en estado puro.

Uno de los principales retos para formular nuevos fármacos es su solubilidad, ya que alrededor del 80% de los candidatos a fármacos son escasamente solubles en agua, viéndose comprometida su biodisponibilidad oral si no se disuelven completamente en el tracto gastrointestinal (Miao *et al.*, 2022). Esto puede resultar en una absorción incompleta o variable, un mayor efecto del pH y los alimentos en la absorción del fármaco, y con ello una farmacocinética deficiente (Bhalani *et al.*, 2022). Es por ello que la aplicación de tecnologías de solubilización más avanzadas, como las que representan los sistemas de liberación de fármacos autoemulsificables, automicroemulsificables y otros basados en lípidos: micro y nanopartículas lipídicas sólidas (SLN, solid lipid nanoparticles y SLC, solid lipid nanocarriers), los sistemas liotrópicos líquido cristalinos, liposomas y fitosomas; así como las técnicas de dispersiones lioisólidas y sólidas amorfas, entre otras, es cada vez más prominente durante el desarrollo temprano (Acharya *et al.*, 2011; Quirino-Barreda *et al.*, 2017; Shanley, 2018).

El riesgo de error en el desarrollo de un medicamento con una molécula nueva “difícil de formular”, no sólo está relacionado con sus propiedades farmacológicas y farmacocinéticas o su toxicidad, sino también con su capacidad de fabricación, ya que la formulación desde las etapas tempranas de estudio debe considerar también su posible escalamiento, tanto para la elaboración de lotes piloto a emplear en los estudios clínicos de biodisponibilidad con pacientes, como en una futura producción industrial a mayor escala. De modo que la formulación y el proceso de producción no modifiquen significativamente el comportamiento fisicoquímico de la formulación (Bandopadhyay *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2022).

Es así que la preformulación para un candidato a fármaco como podría ser la afinina y/o un extracto estandarizado de *H. longipes*, implica la recopilación de una serie de datos relativos a sus propiedades farmacológicas, físicas,

fisicoquímicas, así como estudios de estabilidad física y química frente a factores como temperatura, humedad, oxígeno, luz y otros.

2.6.1 Farmacia Molecular y preformulación del extracto cuantificado de *H. longipes*

El diseño, producción, control y monitoreo de los medicamentos (incluyendo los herbolarios) en la actualidad responde a:

1. Procesos altamente automatizados, con materiales y productos estrictamente controlados, así como una regulación más específica con relación a la propiedad industrial.
2. Normas oficiales de control sobre materia prima, producto, procesos y seguimiento farmacoterapéutico.
3. Un trabajo interdisciplinario, con mayor vinculación a la física, la fisicoquímica, la química supramolecular, la ingeniería de cristales, la fisiología y la biología molecular, entre otras disciplinas apoyadas en el análisis instrumental; que en conjunto forman un campo farmacéutico específico que en 1976 fue acuñado como Farmacia Molecular (Molecular Galenic Pharmaceutics) por H. Hüttenrauch (1988) (Quirino-Barreda, 2013).

La Farmacia Molecular representa al conjunto interdisciplinario de ciencias farmacéuticas dirigidas a obtener y evaluar la actividad de distintos productos de uso profiláctico, diagnóstico o terapéutico, para lo cual se realizan una gama de acciones como son:

- La caracterización física y fisicoquímica del principio activo y de los posibles aditivos con los que éste se formularía de acuerdo con la vía de administración y forma de dosificación.
- El diseño, fabricación y evaluación de las formas de dosificación, así como la liberación de los principios activos de los agentes terapéuticos convencionales y los basados en la biotecnología.
- La identificación de los obstáculos a la liberación sistémica o en el órgano o célula diana del agente profiláctico o terapéutico.

- La determinación de la capacidad del agente farmacológico para llegar al sitio donde ejercerá el efecto biológico.
- La determinación de la evolución en el tiempo de la actividad farmacológica (Quirino-Barreda, 2013).

La caracterización física y fisicoquímica de los fármacos con potencial actividad farmacológica, así como de los aditivos o excipientes que constituyen los medicamentos y nutracéuticos, constituye una actividad fundamental de la etapa de preformulación de los medicamentos, así como premisa elemental de la Farmacia Molecular (Quirino-Barreda *et al.*, 2004; Quirino-Barreda *et al.*, 2018).

Lo anterior coincide, además, con las actuales exigencias industriales y sanitarias legales (Guidance for Industry Q8(R2), ICH 2009; NOM-059-SSA1-2015, vigente) regidas por la Calidad Farmacéutica por Diseño y que resultan primordiales para conseguir su finalidad farmacoterapéutica, profiláctica o de diagnóstico (Tabuena-Navarro, 2014; Siew, 2017).

En este contexto, la Farmacia Molecular se ha venido desarrollando como un campo especializado de las Ciencias Farmacéuticas que estudia el estado de agregación molecular de fármacos, excipientes y las “n” posibilidades de interacción fármaco-excipiente en la forma farmacéutica, para poder modificar las características fisicoquímicas, de estabilidad y tecnológicas de los principios activos. Con el fin de mejorar las propiedades tanto intrínsecas, como de formulación, al igual que su biodisponibilidad una vez administrados al organismo (Hüttenrauch, 1988).

Es un procedimiento común que fármacos y excipientes, independientemente de su origen: síntesis química, biotecnología o extracción de minerales, vegetales y animales; se integren en una fórmula o matriz que adopta físicamente la forma farmacéutica que permitirá la administración de la sustancia activa con fines farmacéuticos, nutracéuticos o cosmeceúticos; llegando así al mercado después de varios años de experimentación (Alshamrani *et al.*, 2022; Banerjee & Pillai, 2019).

Para formular un producto farmacéutico, a partir de una materia prima compleja (extractos herbolarios), una vez seleccionado el marcador químico (afinina) para su estandarización, es necesario conocer las propiedades físicas y fisicoquímicas relevantes para lograr una composición estable. Esto con el fin de garantizar la reproducibilidad de parámetros de calidad durante su periodo de vida útil y asegurar su eficacia y seguridad. Entre estos parámetros se encuentran la solubilidad y el coeficiente de reparto (log P), el cual es un indicador de la permeabilidad membranal de los principios activos. Ambos parámetros representan factores clave del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS, por sus siglas en inglés) (Dr Chris Moreton, 2021).

En el caso de la afinina, se ha reportado que posee una baja solubilidad acuosa (18.63 g/L) (Boonen *et al.*, 2010), pero una alta permeabilidad en las mucosas oral e intestinal, la piel y la barrera hematoencefálica (De Spiegeleer *et al.*, 2013; Veryser *et al.*, 2016, 2014; Yang *et al.*, 2019). En un estudio previo se encontró que el extracto etanólico de la raíz de *H. longipes* posee un coeficiente de permeabilidad (Kp) promedio para la piel y la mucosa oral de $5.28 \pm 0.6 \times 10^{-3}$ cm/h. Por otra parte, la afinina disuelta en una mezcla de propilenglicol (PG)-H₂O al 10 %, presentó un Kp de $10.89 \pm 0.42 \times 10^{-3}$ cm/h. Lo cual se puede asociar a una baja masa molecular (221.3 Da) y un valor de log P entre 3.2 (Yang *et al.*, 2019) y 3.4 (Boonen *et al.*, 2010), parámetro igualmente bajo, el cual favorece su biodisponibilidad de esta molécula. De hecho, la afinina y otras alcaloides, muestran una rápida absorción después de su administración oral, alcanzando concentraciones plasmáticas máximas (C_{max}) en lapsos de tiempo entre 10 y 40 min y una vida media plasmática de 1.5 a 5.0 horas (Boonen *et al.*, 2010; Guiotto *et al.*, 2008; Woelkart *et al.*, 2008).

2.6.2 Sistema de Clasificación Biofarmacéutica

El Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS, por sus siglas en inglés) fue desarrollado por Amidon en 1995 (Amidon, 1995), el cual identifica a la solubilidad del fármaco en el medio gastrointestinal, y su permeabilidad a través del epitelio intestinal, como los dos parámetros claves en la absorción intestinal. De acuerdo con el BCS, las moléculas de clase I son las que tienen una alta

solubilidad y alta permeabilidad; compuestos de clase II son las que tienen baja solubilidad y alta permeabilidad; compuestos de la clase III tienen una alta solubilidad, pero baja permeabilidad; y compuestos de la clase IV son aquellos en los que se tiene baja solubilidad y baja permeabilidad (Samineni *et al.*, 2022; Truzzi *et al.*, 2021; Wolk *et al.*, 2014).

En la actualidad se reconoce que más del 80% de las moléculas nuevas que son candidatos farmacoterapéuticos, son poco solubles en medios acuosos y muchas pertenecen a las clases II y IV del BCS (Bhalani *et al.*, 2022; Siew, 2017). Así, al considerar que la vía oral es de primera elección para la mayoría de los tratamientos terapéuticos, y que es además idónea para iniciar los estudios preclínicos y clínicos (Alqahtani *et al.*, Kazi *et al.*, Alsenaidy, & Ahmad, 2021; Miao *et al.*, 2022); se puede afirmar que lograr un incremento en la solubilidad del principio activo y que ésta se refleje en los resultados esperados en dichos estudios, no sólo de biodisponibilidad, sino también en una farmacocinética reproducible de la molécula a través del tracto gastrointestinal; constituye un verdadero reto para el equipo de diseño y desarrollo de medicamentos (Williams *et al.*, 2013; Jain *et al.*, 2015; Quirino-Barreda *et al.*, 2018).

Por lo anterior, la industria farmacéutica está modificando la manera en que se elaboran las muestras de las moléculas de Clase II y IV del BCS que se administrarán en los ensayos preclínicos y clínicos; previendo también abatir costos de investigación y tiempo para su comercialización. En esta línea de acción, se está procediendo a la elaboración y administración de fórmulas más complejas, que consideren las variables críticas, tanto del fármaco como del producto final, asumiendo así la generación del denominado espacio de diseño en apego a las Guías ICH: Q8(R2), Q9 y Q11 (Aponte *et al.*, 2015).

Situación similar aplica para la elaboración de las muestras administradas a los pacientes de la fase clínica I; cambiando el uso de cápsulas conteniendo únicamente a la molécula activa y/o algún tensoactivo o diluyente y/o deslizante, por formulaciones que contemplan el uso de los más recientes excipientes polifuncionales, y particularmente el control de fenómenos y/o procesos físicos que modifican la solubilidad, la difusión-liberación, así como la estabilidad física

y química del principio activo y por tanto, su biodisponibilidad. Ejemplos de lo anterior es la identificación y control del estado físico de agregación molecular de la materia prima (Quirino-Barreda *et al.*, 2004; Raw *et al.*, 2004; Elder *et al.*, 2016; Moraes *et al.*, 2017) particularmente del estado sólido (dominio del polimorfismo, amorfización, solvatomorfismo, co-cristalización, entre otros), así como del estado líquido-cristalino (Mulet *et al.*, 2013; Jain *et al.*, 2015; Quirino-Barreda *et al.*, 2018).

En el ámbito físico-tecnológico y biofarmacéutico, ha resultado primordial el control sobre el tamaño de las partículas hacia la escala micro y nanométrica, tanto en la obtención de la materia prima como de los sistemas que constituyen el medicamento; utilizando para ello distintos métodos y técnicas, entre las que se pueden mencionar: técnicas de cristalización y disolución, de formación de dispersiones sólidas, de micro y nanoemulsiones, así como del uso de excipientes lipídicos y coloides naturales para la formación de diversos sistemas micro y nanoestructurados lipídicos e hidrocoidales (Kesisoglou *et al.*, 2007; Kumar & Singh, 2013; Savla *et al.*, 2017).

De tal forma, asimilando los principios de la Farmacia Molecular, así como el conocimiento de la Medicina Tradicional Mexicana, se pueden generar propuestas innovadoras de medicamentos herbolarios con el fin de dar respuestas farmacoterapéuticas eficaces y seguras a los distintos problemas de salud presentes en México, como es el caso de la hipertensión arterial. Pudiéndose obtener, a partir de un extracto cuantificado de *H. longipes*, un extracto estandarizado consistente en un sistema farmacéutico micro o nanoestructurado, en el que la carga y liberación del biomarcador (afinina) en el sistema, responda de manera reproducible a determinada cinética de liberación del principio activo. Sumando a ello la ventaja que suelen presentar las dimensiones nanométricas y el biomimetismo del sistema desarrollado, para un mayor control sobre el sitio y la velocidad de absorción gastrointestinal (Faustino-Vega & Quirino-Barreda, 2015; Elkassas & Arafa, 2017; Sheikhpour *et al.*, 2017).

2.6.3 Formulaciones de base lipídica y microemulsiones

Una estrategia que ha resultado ser muy eficiente para la formulación de fármacos de la clase II, es la formulación basada en lípidos (LBF, por sus siglas en inglés), por lo que su campo de investigación y sus aplicaciones se han incrementado en la segunda década del siglo XXI (Bhalani *et al.*, 2022; Kalepu & Nekkanti, 2015). Si conseguimos mantener a un fármaco de clase II solubilizado en la luz del intestino, se puede lograr un perfil de absorción similar al de un fármaco de clase I (Dahlgren *et al.*, 2020; Williams *et al.*, 2013).

Las formulaciones de base lipídica incluyen lípidos o aceites, tensoactivos, cotensoactivos y codisolventes de origen lipídico y se clasifican en 4 grupos (I, II, IIIA, IIIB y IV), con base al grado en que se dispersan en agua, así como por su digestibilidad (Pouton, 2000; Pouton & Porter, 2008; Kollipara & Gandhi, 2014).

Las formulaciones tipo I son completamente oleosas (sin tensoactivos), constituidas por aceites o lípidos (mono, di o triglicéridos) que requieren ser digeridos; siendo en sí, soluciones oleosas. Las formulaciones tipo II se forman principalmente con excipientes hidrofóbicos, con una proporción de 40-80 % de aceites y 20-60% de tensoactivos no iónicos insolubles en agua, y generan sistemas autoemulsificables para la administración de fármacos (self-emulsifying drug delivery systems, SEDDS). Los SEDDS son soluciones isotrópicas claras y transparentes y llegan a utilizarse como vehículos para la administración *in vivo* de emulsiones (Pouton & Porter, 2008).

Las formulaciones lipídicas tipo III generan sistemas automicroemulsificables para la administración de fármacos (self-microemulsifying drug delivery systems, SMEDDS), formándose dos subtipos: el IIIA, que contiene entre 40-80 % de aceites, 20-40 % tensoactivos insolubles en agua y de 0-40 % de codisolventes solubles en agua; no requiriendo digestión para la absorción del fármaco. Por otra parte, el subtipo IIIB contiene un bajo contenido de aceites (menor al 20 %), así como algunos tensoactivos solubles en agua y Codisolventes. Las formulaciones tipo IV contienen excipientes lipídicos miscibles o solubles en

agua y representan la mayor parte de las formulaciones hidrofílicas (Pouton & Porter, 2008).

Los SMEDDS son mezclas isotrópicas de aceite, tensoactivo, cotensoactivo y fármaco (en el caso de los extractos naturales, el aceite puede ser el propio extracto) que puede formar microemulsiones finas de aceite en agua al entrar en contacto con los fluidos gastrointestinales. Las gotas de microemulsión dispersas en el tracto gastrointestinal proporcionan una gran superficie y promueven la liberación rápida del fármaco, lo que es beneficioso para mejorar la absorción y la biodisponibilidad del fármaco (L. Wang *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2021). Siendo esta la principal ventaja de los sistemas autoemulsificables comparados con las soluciones lipídicas simples (Shrestha *et al.*, 2014).

Si bien las microemulsiones y las soluciones coloidales utilizan tensoactivos para incrementar la solubilidad aparente de fármacos poco solubles y ambas poseen “gotículas” (las primeras de aceite con tensoactivo y las segundas, micelas de tensoactivo) en la escala nanométrica; no deben confundirse. Además, las microemulsiones poseen una mayor capacidad de solubilización y mayor estabilidad termodinámica que las soluciones micelares, requiriendo un mínimo aumento en el tamaño de gota para ello (Bedia *et al.*, 2017).

2.6.3.1 Caracterización de los SEDDS Y SMEEDS

1. Prueba visual de autoemulsificación:

Esta es una prueba observacional visual para evaluar las propiedades de autoemulsificación reportadas por Talegaonkar y colaboradores (Talegaonkar *et al.*, 2010), las cuales fueron modificadas y adaptadas en la presente investigación. Para esta prueba se coloca una cantidad fija de la formulación en un vaso de precipitados con 250 mL de agua, y se mantiene la temperatura constante a 37 ± 0.5 °C con agitación ligera. Posteriormente se observa la tendencia a formarse la emulsión espontáneamente (Bakhle & Avari, 2015). Tomado en cuenta la apariencia (translucida o blanquecina), la dispersabilidad, y el tiempo transcurrido para la formación de la emulsión, los SEDDS se

categorizan en "Grado A", "Grado B" "Grado C" y "Grado D" de acuerdo con la Tabla 1.

Tabla 1. Grado de autoemulsificación (Modificado de Talegaonkar, 2010)

GRADO	OBSERVACIÓN
A	Formación rápida (≤ 1 minuto) nanoemulsión de apariencia translúcida o levemente azulada
B	Microemulsión translúcida de formación rápida o levemente azulada
C	Emulsión blanca azulada de formación ≥ 1 minuto
D	Emulsión turbia y blanquecina que tiene un tiempo de dispersión ≥ 1 minuto
E	Formulación que muestra un tiempo de dispersión ≥ 2 minutos con glóbulos de aceite visibles

2. Propiedades organolépticas

Las propiedades organolépticas (color, olor y sabor) son de vital importancia sobre todo para las formulaciones de administración oral. Si registran cambios en estas pueden indicar inestabilidad química (Boscolo *et al.*, 2020; Talegaonkar *et al.*, 2010).

3. Tamaño de partícula y morfología

La determinación del tamaño de partículas y la morfología de los SEDDS Y SMEEDS son clave para su caracterización, se emplean técnicas como la dispersión dinámica de la luz (DLS, por sus siglas en inglés), dispersión de neutrones de ángulo pequeño (SANS, por sus siglas en inglés) y dispersión de rayos X de ángulo bajo (SAXS, por sus siglas en inglés). Además se puede utilizar la microscopía electrónica de transmisión y la microscopía electrónico de barrido con modo STEM (Abruzzo *et al.*, 2022; Fatouros *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2020).

4. Potencial Zeta

El potencial Zeta (ζ) es una medida de la magnitud de la repulsión o atracción electrostática o de carga entre las partículas (mide la velocidad de

desplazamiento de las partículas inmersas en un campo eléctrico). Este constituye uno de los parámetros utilizados para monitorear la estabilidad de las dispersiones coloidales, ya que nos aporta detalles sobre posibles agregaciones o floculaciones. Por lo que puede ser empleado para mejorar las formulaciones y es importante en los estudios de preformulación (Abruzzo et al., 2022).

3. JUSTIFICACIÓN

La hipertensión arterial es una de las enfermedades con mayor incidencia en la sociedad actual; estando directamente asociados su progresión y sostenimiento con anomalías estructurales cardíacas y vasculares que dañan el corazón, los riñones, el cerebro, la vasculatura, y otros órganos. El tratamiento para este padecimiento generalmente consiste en una terapia combinada de tres fármacos, que, para el caso de algunos pacientes con hipertensión resistente, la administración llega a ser incluso de cuatro. Por lo anterior, actualmente la hipertensión constituye uno de los problemas de salud pública más críticos y costosos en México. Una de las alternativas para atender este problema de salud es el empleo de plantas medicinales, que pueden ser utilizadas para el desarrollo de medicamentos herbolarios eficaces, seguros y accesibles para la población.

México ocupa un lugar privilegiado a nivel mundial, en lo referente a su diversidad biológica y riqueza cultural, lo cual se refleja en los numerosos recursos con que cuenta la Medicina Tradicional Mexicana, principalmente, en el amplio número de plantas medicinales que hay en este país. *H. longipes* es una planta endémica de la región central de México, y se usa tradicionalmente como analgésico, fundamentalmente para el dolor dental. Dicha actividad se le atribuye a las alcaloides sintetizadas por la planta, siendo la afinina la alcaloide mayoritario presente en esta especie. Estudios realizados por nuestro grupo de trabajo revelaron que el extracto de diclorometano de la raíz de *H. longipes* y la afinina presentaban un significativo efecto vasodilatador.

Considerando que la conjunción de los principios de la Farmacia Molecular con los conocimientos proporcionados por la Medicina Tradicional Mexicana, posibilitan la propuesta de formas farmacéuticas innovadoras de medicamentos herbolarios con el fin de dar respuestas farmacoterapéuticas eficaces y seguras a distintos problemas de salud presentes en México, en el caso del presente trabajo se desarrolló, a partir de un extracto estandarizado de la raíz de *Heliopsis longipes*, una forma farmacéutica autoemulsificable de administración oral con efecto antihipertensivo, la cual permite el control de fenómenos y/o procesos

físicos que modifican la solubilidad, la difusión-liberación, así como la estabilidad física y química del principio activo y por tanto, su biodisponibilidad.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Es posible obtener, a partir de un extracto etanólico de la raíz de *Heliopsis longipes* estandarizado con base en afinina, una microemulsión de administración oral con efecto antihipertensivo y que posea estabilidad termodinámica y control de la liberación de afinina?

5. HIPÓTESIS

El extracto etanólico de la raíz de *Heliopsis longipes*, estandarizado con base en afinina, posee propiedades de solubilidad que posibilitan su combinación con tensoactivos y aditivos oleosos a fin de obtener un sistema automicroemulsificable con estabilidad termodinámica (evaluada mediante el tamaño de partícula y el potencial zeta) y una cinética de liberación de afinina que permiten proponerlo como una forma farmacéutica novedosa con efecto antihipertensivo.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Desarrollar, a partir de un extracto estandarizado de la raíz de *Heliopsis longipes*, una forma farmacéutica autoemulsificable de administración oral con efecto antihipertensivo.

6.2. Objetivos específicos

1. Validar el método analítico que se utilizará para determinar la concentración de la afinina en el extracto etanólico preparado a partir de la raíz de *H. longipes*, así como en las pruebas de capacidad de carga, liberación y estabilidad de la afinina contenida en el sistema autoemulsificable a desarrollar.
2. Obtener un extracto etanólico cuantificado con base en afinina a partir de la raíz de *H. longipes*, y determinar la miscibilidad acuosa a 25° y 37°C, el índice de refracción, las propiedades organolépticas y la presencia de microorganismos, de acuerdo con las especificaciones de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos.
3. Desarrollar, a partir del extracto etanólico cuantificado de *H. longipes*, un extracto estandarizado en forma de sistema auto-microemulsificable que represente una forma farmacéutica de administración oral para la realización de ensayos preclínicos; utilizando para ello diagramas de fase pseudoternarios con aditivos lipídicos.
4. Caracterizar el sistema automicroemulsificable desarrollado, en tamaño y morfología de las gotas, potencial zeta, propiedades organolépticas, pH, índice de refracción y turbidez.
5. Comprobar la estabilidad física y química del sistema automicroemulsificable desarrollado a diferentes valores de pH.
6. Determinar la estabilidad acelerada del sistema automicroemulsificable desarrollado.

7. Analizar la cinética de liberación de afinina a partir del sistema automicroemulsificable desarrollado, utilizando diferentes valores de pH que simulen el paso a través del tracto gastrointestinal.
8. Determinar el efecto antihipertensivo de la formulación óptima del sistema automicroemulsificable desarrollado, en un modelo preclínico murino *in vivo*.
9. Analizar la reactividad endotelial en aortas aisladas de ratas hipertensas a las que se les administró el sistema desarrollado y captopril como control positivo.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Reactivos y disolventes

Los reactivos y disolventes que se utilizaron en la presente investigación se obtuvieron de JT Baker (Phillisburg, NJ, USA), los excipientes lipídicos de Gattefossé Francia, que se emplearon en la formulación, fueron donados por Químicos Lyontec, S. de R. L. de C.V. (México) y para las evaluaciones farmacológicas los reactivos se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Las cápsulas de gelatina dura vacías fueron donadas por Capsugel® de México S. de R. L. de C.V. La lista de reactivos y disolventes se presenta en el anexo 1.

7.2 Animales de experimentación

Se utilizaron 42 ratas macho Wistar (250-300 g), proporcionadas por el bioterio del Instituto de Neurobiología (UNAM), Campus Juriquilla, Querétaro, México. Los animales experimentales se colocaron en jaulas de policarbonato con medidas 54.5 cm (largo) x 39.5 cm (ancho) x 20.0 cm (alto), con tapa de reja metálica con separaciones de 1.5 cm entre cada una. Se empleó una cama sanitaria suave de aserrín con comprimidos sanitarios, la cual se cambió tres veces a la semana. Se mantuvieron en un ciclo de 12 h de luz y oscuridad, con libre acceso a alimento y agua (dieta isocalórica, alimento estándar y agua purificada). Así como, parámetros de temperatura (22 °C), humedad (30 %), ruido (< 85 dB) y ventilación controlados.

Los protocolos experimentales se llevaron a cabo siguiendo los lineamientos indicados en la Norma Oficial Mexicana 062 (NOM-062-ZOO-1999, vigente) para la reproducción, cuidado y uso de animales de laboratorio (Diario Oficial de la Federación, 2001). Adicionalmente, se siguieron los lineamientos del International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS). El comité de bioética de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro evaluó y aprobó el protocolo de investigación.

Los residuos peligrosos biológicos infecciosos fueron debidamente etiquetados y almacenados de acuerdo con las especificaciones de la Norma Oficial

Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, vigente, por un periodo no mayor a 30 días y se contrató un servicio especial dedicado al tratamiento y procesamiento de estos residuos.

7.3 Material vegetal

Las raíces de *H. longipes* se colectaron en Peñamiller, Querétaro, Qro., México. Su identificación se realizó en el Herbario Jerzy Rzedowski (QMEX), Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México. Las muestras se compararon con las respectivas muestras de herbario que tienen los números de voucher *H. longipes* J.E. Castro R.1. y R.2.

7.4 Secado y molienda de la raíz de *H. longipes*

Las raíces frescas de *H. longipes* se secaron al aire, en un cuarto oscuro con buena ventilación. Una vez secas, las raíces se molieron en un molino de cuchillas (Thomas Wiley 4 Lab Mill, Thomas Scientific, USA) hasta obtener un tamaño de partícula de 0.5 mm.

7.5 Preparación del extracto etanólico de la raíz de *H. longipes*

Para la preparación del extracto se tomaron 100 g del material vegetal seco y molido y se sometieron a un proceso de extracción por maceración durante una semana. Se utilizó etanol absoluto en una proporción 1:10 (material vegetal molido:disolvente). El procedimiento se realizó por triplicado empleando nuevo disolvente. Posteriormente, se filtró y el disolvente se removió con un rotoevaporador (Heidolph VV 2000, Germany).

7.6 Validación del método analítico para la detección y cuantificación de afinina en el extracto

La validación del método analítico utilizado para cuantificar afinina en el extracto, así como determinar la capacidad de carga, liberación y estabilidad de la afinina contenida en el sistema autoemulsificable, se llevó a cabo con base en los criterios establecidos por la Guía de Validación de Métodos Analíticos editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México, A. C. Las fórmulas empleadas en todos los casos se recogen en el Anexo 2. (CNQFB, 2012).

7.6.1 Validación del sistema de análisis

7.6.1.1 Precisión

Para evaluar la precisión del sistema se analizaron 6 réplicas de una misma solución de afinina (45 µg/mL). Posteriormente se obtuvieron las áreas de los picos, el promedio (\bar{y}), la desviación estándar (S) y fue calculado el coeficiente de variación (CV).

Criterios de aceptación:

CV \leq 1.5% para métodos físico-químicos

CV \leq 3% para métodos biológicos

7.6.1.2 Adecuabilidad

Este parámetro se utiliza para verificar el funcionamiento del sistema con base en criterios preestablecidos. Se inyectó por quintuplicado la solución de adecuabilidad, la cual se preparó pesando 2 mg del extracto y colocándola en la estufa a 40 °C durante 7 días, pasado ese tiempo se preparó una solución a una concentración de 45 µg/ml (punto intermedio de la curva de calibración). Con el área bajo la curva de las 5 inyecciones se calculó el CV y para cada inyección se determinó el factor capacidad (K'), la resolución (R), factor de coleo (T), número de platos teóricos (N).

Criterios de aceptación:

CV \leq 2% para respuesta analítica.

Para cada inyección, se recomienda: K' $>$ 2; R $>$ 2; T $<$ 2; N $>$ 2000

7.6.1.3 Linealidad

Para evaluar la linealidad del sistema se construyó una curva de calibración con 6 concentraciones diferentes del estándar (afinina), 15, 30, 45, 60, 75, 90 µg/mL, de la cual se realizaron 6 réplicas realizando diluciones independientes para cada curva. Posteriormente se promediaron las 6 réplicas y se construyó el

gráfico de regresión lineal a partir del cual se determinó la ordenada al origen (b_0), la pendiente de la recta (b_1), el coeficiente de correlación (r), el coeficiente de determinación (r^2) y el intervalo de confianza para la pendiente (IC (β_1)).

Criterios de aceptación:

$$r^2 \geq 0.98$$

IC (β_1) no debe incluir el cero

7.6.2 Validación del método de análisis

7.6.2.1 Exactitud y repetibilidad

Se prepararon 6 muestras adicionadas del analito, dentro de la curva de calibración 15, 20, 25, 30, 45 y 50 $\mu\text{g/mL}$. Para ello a una solución del extracto se le adicionaron las 6 concentraciones del analito (afinina) antes mencionadas y se obtuvieron: el área bajo la curva del extracto y 6 áreas de los puntos con el analito adicionado; luego se calculó la diferencia de áreas para saber cuánto analito se recuperó (al área bajo la curva del extracto más el analito se le restó el área bajo la curva del extracto solo). Se construyó un gráfico de cantidad adicionada vs cantidad recuperada, se calculó el porcentaje de recobro y de este se determinó el CV y el IC(μ).

Criterio de aceptación:

IC (μ) debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo: 98-102% método cromatográfico

CV del porcentaje de recobro < 2% en método cromatográfico

7.6.2.2 Linealidad

Para evaluar la linealidad del método, se prepararon 3 concentraciones diferentes del analito que se añadieron a una solución del extracto (se le determinó el área bajo la curva a dicha solución del extracto). Se seleccionaron 3 niveles, uno superior, medio e inferior: 15, 30 y 45 $\mu\text{g/mL}$; cada nivel se evaluó por triplicado. Posteriormente, al área bajo la curva del extracto más el analito se le restó el área bajo la curva del extracto solo y se construyó un gráfico de

cantidad adicionada vs cantidad recuperada. Seguidamente se calculó r^2 , IC (β_1), IC (β_0), el porcentaje de recobro y de éste se determinó CV y el IC (μ).

Criterio de aceptación:

Cantidad adicionada vs cantidad recuperada

$r^2 > 0.98$

IC (β_1) debe incluir la unidad

IC (β_0) debe incluir el cero

CV_{y/x} del porcentaje de recobro < 2% en método es cromatográfico

IC (μ) debe incluir el 100% o el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo: 98-102% método cromatográfico

CV del porcentaje de recobro < 2% en método cromatográfico

7.6.2.3 Precisión intermedia

Con una muestra del analito (60 $\mu\text{g/mL}$) se realizaron 3 inyecciones por dos analistas diferentes en dos días distintos. Teniendo en total 12 resultados, de los cuales se determinó su CV.

Criterios de aceptación:

CV \leq 2% para métodos cromatográficos

7.6.2.4 Estabilidad analítica de la muestra

Para evaluar la estabilidad de la muestra, se registraron las áreas bajo la curva obtenidas de la muestra (extracto etanólico 2 mg/mL), que fue sometida a diferentes condiciones de almacenamiento, las cuales se enlistan a continuación:

- ❖ Con luz a temperatura ambiente
- ❖ Sin luz a temperatura ambiente
- ❖ pH alcalino (NaOH) a temperatura ambiente
- ❖ pH ácido (HCl) a temperatura ambiente
- ❖ En la estufa a 40 °C

Las mediciones se realizaron por triplicado para cada condición de almacenaje y fueron comparadas con una solución de referencia recientemente preparada. Las evaluaciones se realizaron en el tiempo 0, 24 horas, 48 horas y 7 días después de su almacenamiento.

Criterios de aceptación:

$|di| \leq 2\%$ para métodos cromatográficos

7.6.2.5 Límite de detección (LD)

El LD se calculó con base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión. Para ello se prepararon 3 concentraciones diferentes de la sustancia de interés (afinina), por medio de dilución (15, 30, 45 $\mu\text{g/mL}$). Con las áreas bajo la curva se calculó: b_1 , r^2 , $S_{y/x}$, IC (β_1) y con estos datos se calculó el límite de detección.

Criterios de aceptación:

$r^2 \geq 0.98$

IC (β_1), no debe incluir el cero.

7.6.2.6 Límite de cuantificación (LC)

El LC se calculó con base en la curva de calibración en la desviación estándar de regresión. Para ello se prepararon 3 concentraciones diferentes del estándar de analito (15, 30 y 45 $\mu\text{g/mL}$). Estas se evaluaron por triplicado y de cada punto, se registraron las áreas bajo la curva para luego calcular b_1 , r^2 , $S_{y/x}$, IC (β_1) y con estos datos se calculó el límite de cuantificación.

Criterios de aceptación:

$r^2 \geq 0.98$

IC (β_1), no debe incluir el cero.

7.7 Cuantificación de afinina en el extracto etanólico de la raíz de *H. longipes*

La cuantificación de la afinina se llevó a cabo en un HPLC Waters® 600E, con detector de arreglo de diodos (Waters® 2998), con una columna ZORBAX® ECLIPSE XDB-C8 (4.5 x 150 mm, tamaño de partícula de 5 µm y tamaño de poro de 120 Å); se empleó un sistema isocrático, con una fase móvil de acetonitrilo:ácido acético al 1% en agua, en proporción 1:1, con un flujo de 1 mL/min. El volumen de inyección fue de 20 µL y el tiempo del análisis de 9 minutos.

Para la determinación del contenido de afinina se obtuvo una curva de calibración utilizando un estándar de afinina en un intervalo de 15 a 90 µg/mL (15, 30, 45, 60 y 90 µg/mL).

Para la preparación de la muestra se tomaron 2 mg del extracto etanólico, se solubilizaron en 1 mL de etanol absoluto grado HPLC, se sonicó durante 15 minutos y se filtró a través de membranas de nylon de tamaño de poro 0.45 µm. Posteriormente se tomó una alícuota de 100 µL y se completó a 1 mL con fase móvil. La muestra se inyectó por triplicado.

7.8 Caracterización del extracto etanólico de la raíz de *H. longipes*

7.8.1 Propiedades organolépticas

Se describieron las propiedades organolépticas como color, olor y sabor del extracto etanólico obtenido de las raíz de *H. longipes*.

7.8.1.1 Determinación espectrofotométrica del color

Los indicadores espectrofotométricos de color del extracto etanólico de la raíz de *H. longipes* se determinaron como criterio de control de calidad utilizando un espectrofotómetro portátil (Konica Minolta® CM-600d, Japón), iluminante D65, ángulo de visión de 10°, y se utilizó el espacio de color CIE L*a*b*. Este método es ampliamente utilizado en la caracterización del color de objetos, porque correlaciona valores numéricos de color con la percepción visual humana. Se obtuvieron los valores de L*(luminosidad, 0=negro, 100=blanco), Hue h° y

C*(croma o saturación). Las muestras se analizaron por triplicado y se calculó el error estándar de la media (SEM, por sus siglas en inglés).

7.8.2 Miscibilidad acuosa a dos temperaturas: 25° y 37°C

7.8.2.1 Prueba preliminar

Miscibilidad es la propiedad que tienen dos sustancias de mezclarse completamente (independientemente de las proporciones de cada componente) y formar una solución homogénea. Para la realización de esta prueba, aproximadamente 0.1 g de la muestra (extracto etanólico) contenida en un frasco de medición de 10 mL, se mezcló con volúmenes crecientes de agua a temperatura ambiente. Después de cada adición de agua, la mezcla se agitó durante 10 minutos y se comprobó visualmente la presencia o ausencia de partes no disueltas de la muestra (OECD, 1995).

Después de la adición de 10 mL de agua, la muestra de extracto etanólico o partes de ella permanecieron sin disolver, por lo que el experimento se continuó en un frasco medidor de 100 mL. La solubilidad expresada en forma aproximada se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Solubilidad aproximada en agua*

mL de agua por 0.1 g soluble	0.1	0.5	1	2	10	100	>100
Solubilidad aproximada en g/L	>1000	1000 a 200	100 a 200	100 a 50	50 a 10	10 a 1	<1

* OECD, 1995b

De acuerdo con la guía de la OECD, si el resultado es una baja solubilidad, puede ser necesario un tiempo prolongado para disolver una sustancia y debe dejarse en disolución al menos 24 horas. Si después de 24 horas la sustancia sigue sin disolverse, se debe dejar más tiempo, hasta 96 horas (OECD, 1995).

7.8.2.2 Método del matraz

Con este método se estimó la cantidad de sustancia problema (afinina contenida en el extracto etanólico de la raíz de *H. longipes*) necesaria para saturar el volumen de agua estimado con la prueba preliminar. Para realizar esta prueba se tomaron 50 mg del extracto y se agregaron a 100 mL de agua destilada en un recipiente con tapa. Posteriormente, se mantuvieron en agitación y temperatura controlada durante 24 horas. A continuación, se tomó y filtró, con membrana de 0.45 μm , 1 mL de la muestra y se determinó la concentración de afinina por HPLC; después de 48 h, se repitió el procedimiento. Este ensayo se realizó por triplicado para cada temperatura de análisis (25°C y 37°C). De acuerdo con el método, si las concentraciones medidas no difieren más del 15 %, la prueba es satisfactoria. Si los resultados de los recipientes 1, 2 y 3 muestran una tendencia de valores crecientes, toda la prueba debe ser repetida utilizando tiempos de equilibrado más largos (OECD, 1995).

7.8.3 Análisis microbiológicos

Para el análisis microbiológico se enviaron 5 g del extracto etanólico obtenido de la raíz de *H. longipes* a la Unidad de Servicios Clínicos y Diagnóstico Molecular de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro. Se realizaron las pruebas consideradas en la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM 3.0): bacterias aerobias mesófilas, hongos, levaduras, *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. Los resultados se analizaron de acuerdo a los límites establecidos en la farmacopea mexicana para material vegetal o productos que contengan extractos con o sin aditivos y materiales para uso interno (FHEUM, 2022).

Las determinaciones se realizaron de acuerdo a las Normas Oficiales Mexicanas (NOM), NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios, Método para el conteo de bacterias aerobias en placas (NOM-092-SSA1-1994, 1995), NOM-111-SSA1-1994, Bienes y servicios, Método para el conteo de mohos y levaduras en alimentos (NOM-111-SSA1-1994, 1995), NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios, Métodos de ensayo microbiológicos, Determinación de

microorganismos indicadores, Determinación de microorganismos patógenos (NOM-210-SSA1-2014, 2015).

7.8.4 Índice de refracción

El índice de refracción (IR) del extracto etanólico de la raíz de *H. longipes* se determinó disolviendo 400 mg de extracto en 1 mL de etanol absoluto y posteriormente se midió con un refractómetro digital (HI96801, instrumentos HANNA®) a 25°C; la calibración se realizó con agua destilada, la muestra se midió por triplicado y se calculó el SEM (Laothaweerungsawat *et al.*, 2020).

7.9 Obtención de un sistema microemulsificable lipídico óptimo utilizando diagramas de fase pseudoternarios

Se realizaron análisis de solubilidad acuosa y en diferentes excipientes, del extracto etanólico de la raíz de *H. longipes*. Se propusieron cuatro sistemas diferentes compuestos por tres excipientes (Tabla 3), siguiendo los resultados obtenidos por Morales Florido (Morales Florido, 2018). Posteriormente, se prepararon diez formulaciones para cada sistema (Tabla 4) para construir diagramas de fase pseudoternarios. Se evaluó la capacidad de cada sistema para disolver el extracto observando la ausencia de sedimento, turbidez u opalescencia.

Tabla 3. Propuestas de sistemas lipídicos.

Sistema	Excipiente 1	Excipiente 2	Excipiente 3
A	Transcutol® HP	Labrasol®	Labrafil®
B	Transcutol® HP	Tween® 80	Labrafil®
C	Transcutol® HP	Propilenglicol(PG)	Tween® 80
D	Transcutol® HP	Tween® 80/PG (1:1)	Labrasol®

Tabla 4. Composición de los sistemas lipídicos A, B, C y D.

Formulación	Excipiente 2	Excipiente 3	Excipiente 4
1	0.80	0.10	0.10
2	0.65	0.25	0.10
3	0.65	0.10	0.25
4	0.50	0.35	0.15
5	0.50	0.25	0.25
6	0.50	0.15	0.35
7	0.25	0.50	0.25
8	0.25	0.25	0.50
9	0.10	0.80	0.10
10	0.10	0.10	0.80

A continuación, se añadió agua a cada una de las formulaciones propuestas y se observaron visualmente los sistemas resultantes. La presencia de un líquido transparente como resultado del mezclado, era indicativo de una microemulsión.

7.9.1 Selección del sistema autoemulsificable óptimo

Para la obtención del sistema autoemulsificable (SEDDS) óptimo que contiene el extracto etanólico de la raíz de *H. longipes* (HL-SMEDDS), se realizó un diseño simplex reticular aumentado, utilizando el sistema que cumplió con las propiedades físicas óptimas en cuanto a apariencia, tamaño de partícula y capacidad solubilizante del extracto.

7.10 Caracterización del sistema microemulsificable lipídico óptimo

7.10.1 Propiedades organolépticas

Se describieron las propiedades organolépticas de la formulación desarrollada, como color, olor y sabor; cambios en estas propiedades pueden indicar inestabilidad. La determinación de color se realizó siguiendo la metodología descrita en la sección 7.8.1.1

7.10.2 Determinación del tamaño de partícula y el índice de polidispersidad

El tamaño medio de la gota y el correspondiente índice de polidispersidad (IPD) se determinaron a 25 °C mediante dispersión dinámica de la luz usando un Litesizer® 500 (Anton Paar® Instruments, México). Las muestras se analizaron por triplicado, los datos se reportaron usando el software DTS® (nano) y los resultados se reportaron como la media y SEM de al menos diez mediciones en cada muestra.

7.10.3 Determinación del potencial zeta

Para la medición del potencial Z a 25 °C se utilizó un Zetameter Zetaprobe® 300 (Malvern® Panalytical, Ltd., México). Las muestras se analizaron por triplicado. Los resultados se expresaron como media y SEM de al menos diez mediciones de la muestra.

7.10.4 Determinación de la morfología

La morfología de los sistemas microemulsificables obtenidos se observó utilizando un Microscopio Electrónico de Barrido (Hitachi®, modelo SU8230, emisión de campo de cátodo frío), con modo STEM y voltaje de aceleración de 30 kV y W.D 8 mm. La muestra se preparó en una rejilla de cobre para TEM. Se diluyó el sistema (50 µL, 7 mg/mL) en agua (dilución 1:20) y se colocó una gota de muestra en la rejilla de cobre.

7.10.5 Determinación de la transmitancia

La transmitancia se determinó utilizando un espectrofotómetro UV/VIS (Modelo: VE-5100UV, Empresa Científica Vela Quin S.A. de C.V.), las mediciones se realizaron por triplicado a 650 nm y se calculó el SEM.

7.10.6 Determinación del índice de refracción

El índice de refracción se determinó usando un refractómetro digital (HANNA® HI96801, Instruments) a 25°C. La calibración a cero se realizó con agua destilada. La muestra se midió por triplicado y se calculó el SEM.

7.10.7 Determinación del pH

El pH se determinó utilizando un medidor de pH (Navi® pH meter F-51, HORIBA®, Ltd., Kyoto, Japón). El electrodo del medidor de pH se sumergió en la muestra y se registró el pH después de alcanzar el equilibrio. Las muestras se analizaron por triplicado y se calculó el SEM.

7.11 Estabilidad física y química a diferentes valores de pH

Para determinar la estabilidad física del HL-SMEDDS se prepararon dos medios que simularían el paso de este por el Tracto Gastrointestinal (TGI). Para ello se obtuvo una solución de HCl 0.1 N, partiendo de 8.5 mL de ácido clorhídrico fumante al 37 % y se completó el volumen a 1 L con agua desionizada, por último se ajustó el pH a 1. Para la obtención del medio intestinal simulado se disolvieron 6.8 g de fosfato monobásico de potasio en 250 mL de agua desionizada, luego se le añadieron 77 mL de hidróxido de sodio 0.2 N y se completó el volumen con agua desionizada hasta 1 L. Posteriormente se ajustó el pH a 6.8 con hidróxido de sodio.

Para realizar el ensayo se tomaron 3 mL del HL-SMEDDS y se vertieron en 30 mL de la solución, se agitaron a 200 rpm, manteniendo una temperatura de 25 °C constante. Las muestras se tomaron a los tiempos 0, 0.5, 1, 2, y 4 horas, se filtraron y se cuantificó el contenido de afinina por HPLC. Paralelamente se midió el tamaño de partículas en cada uno de los tiempos usando un Litesizer 500® (Anton Paar Instruments, Austria) (Morales Florido, 2018).

7.12 Estudios de estabilidad acelerada del HL-SMEDDS

Al considerarse el extracto estandarizado un similar de un fármaco para registro sanitario nuevo, para este ensayo se seleccionaron las condiciones establecidas en la NOM-073-SSA1-2015 (vigente) Estabilidad de fármacos y medicamentos,

así como de remedios herbolarios, para un fármaco nuevo (NOM-073-SSA1, 2015). El estudio se desarrolló por 6 meses a una temperatura de $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ / $75\% \pm 5\%$ humedad relativa (HR). Las mediciones se realizaron a los 0, 3 y 6 meses. Los parámetros que se evaluaron fueron: Color, olor, pH, pérdida de peso, identidad inicial y final (NOM-073-SSA1, 2015).

7.13 Evaluación de la cinética de liberación

Para este estudio se tomaron 3 mL del HL-SMEDDS y 3 mL de extracto etanólico solubilizado en carboximetilcelulosa al 1% y se vertieron dentro de bolsas hechas con membrana de diálisis de celulosa SpectraPor® de 12 a 14 kDa, las cuales fueron selladas por ambos lados y amarradas al vástago de un disolutor (Hanson Research® SR8 Plus, Dissolution test station), el cual se mantuvo a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, con una agitación de 50 rpm (Morales Florido, 2018).

A los vasos del disolutor se les añadieron 500 mL de medio ácido o intestinal simulado, luego de montado el sistema se tomaron muestras de 3 mL sin reposición de medio a los tiempos 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 1, 2, 3, 4 y 8 horas, las cuales fueron cuantificadas por HPLC, con el método establecido anteriormente para la cuantificación de afinina.

7.14 Determinación del efecto antihipertensivo del HL-SMEDDS

Para la determinación del efecto antihipertensivo del HL-SMEDDS se administró, a ratas Wistar macho adultas (250–300 g), N-nitro-L-arginina metiléster (L-NAME) en dosis de 30 mg/kg de peso corporal/día, durante cuatro semanas. Lo anterior, para la inducción de la hipertensión arterial. Con relación a los tratamientos antihipertensivos empleados, en todos los casos se administraron en los últimos 4 días del estudio. La administración se realizó vía intragástrica utilizando una sonda. Los animales empleados se dividieron en 4 grupos, con 6 animales en cada uno (n = 6):

1. El control negativo recibió L-NAME y agua.
2. El control positivo recibió L-NAME y captopril (100 mg/kg de peso corporal/día). El captopril se diluyó en agua para su administración.

3. El grupo tratado recibió L-NAME y extracto etanólico de la raíz de *H. longipes* (150 mg/kg de peso corporal/día). El extracto etanólico se diluyó en solución acuosa de carboximetilcelulosa (CMC) al 1 %.
4. El grupo tratado recibió L-NAME y el HL-SMEDDS (150 mg/kg de peso corporal/día).

Para la medición de la presión arterial sistólica se utilizó el método de manguito de cola con un escáner calefactor LE 5650/6 (Panlab®, Barcelona, España) acoplado al detector automático de presión arterial LE 5007 (Letica®, Barcelona, España). Se realizaron determinaciones semanalmente y se utilizó el valor medio de al menos cinco lecturas consecutivas para los cálculos (Belmokhtar *et al.*, 2009; Luna-Vázquez *et al.*, 2013).

7.15 Efecto de la administración oral a largo plazo del HL-SMEDDS sobre la reactividad vascular: experimentos *ex vivo*

Al final del experimento descrito en el subíndice 7.14, se aislaron las aortas torácicas de los grupos control y del grupo tratado con el HL-SMEDDS, para determinar el efecto del tratamiento sobre la reactividad vascular usando el ensayo de aorta aislada de rata. Después del equilibrio, los anillos aórticos se contrajeron con 1 μ M de fenilefrina. Cuando se alcanzó la contracción constante, se probó la respuesta a concentraciones crecientes de carbacol (CCh) (10^{-9} a 10^{-4} M). La relajación se expresó como porcentaje de la contracción máxima inducida por fenilefrina (Luna-Vázquez *et al.*, 2013).

7.16 Prueba preliminar con cápsulas cargadas con el HL-SMEDDS

Para llevar a cabo esta prueba, se cargaron 2 cápsulas de gelatina dura con el HL-SMEDDS y se mantuvieron durante 45 días a temperatura ambiente, posteriormente se comprobó su estado físico. Además, se observó visualmente si existía la presencia de turbidez, precipitados o separación de fases del HL-SMEDDS cargado en las cápsulas y se determinó su color, IR y tamaño de gota.

7.17 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se expresaron como valores medios \pm SEM de $n = 6$ experimentos. Los datos fueron analizados mediante una prueba de ANOVA de

una vía para comparar los tratamientos y las diferencias entre los grupos fueron evaluadas mediante la prueba de Tukey. Las diferencias entre las medias se consideraron significativas cuando $p < 0.05$. El análisis de los datos y las curvas dosis-respuesta se realizaron con el programa GraphPrism® 9.0.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Validación del método analítico

Los resultados de la validación del sistema y del método analítico indicaron que, tanto el sistema analítico como el método de cuantificación de afinina, cumplieron los criterios establecidos en la Guía de Validación de Métodos Analíticos (CNQFB, 2012). (Tabla 5).

Tabla 5. Parámetros evaluados para la validación del método analítico por HPLC utilizado en la cuantificación de afinina.

Parámetro	Resultados	Criterios de aceptación*
Precisión del sistema	CV = 1.2 %	CV ≤ 1.5%
Adecuabilidad del sistema	CV = 0.8 %; K = 4.5; R = 3.2; T = 0.9; N = 6529	CV ≤ 2%, K' > 2 ; R > 2 ; T < 2; N > 2000 (cada inyección)
Linealidad del sistema	r ² = 0.99 IC(β ₁) = 128382-141873	r ² ≥ 0.98, IC(β ₁), no debe incluir el cero
Exactitud y repetibilidad del método	CV = 1.3 % IC(μ) = 99.7-103.6 % Promedio de recobro = 101.7 %	CV del porcentaje de recobro < 2% IC(μ) debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo: 98-102%
Linealidad del método	r ² = 0.99, IC(β ₁) = 0.7-1.2 % IC(β ₀) = -5.7-10.9 %, CV _{y/x} = 1.4 %	r ² > 0.98, IC(β ₁) debe incluir la unidad, IC(β ₀) debe incluir el cero, CV _{y/x} del porcentaje de recobro < 2%
Precisión intermedia del método	CV = 1.2 %	CV ≤ 2%
Límites de detección y cuantificación	LD= 1.8, LC= 5.3 IC(β ₁) = 177366-91883, r ² = 0.99	r ² > 0.98 IC(β ₁) no debe incluir la unidad

* CNQFB, 2012

La validación del método analítico es un elemento fundamental en los sistemas de calidad ya que proporciona evidencia de que los laboratorios de ensayo cumplen con los requisitos para una determinada determinación analítica, lo que garantiza la calidad, confiabilidad, reproducibilidad y seguridad de los resultados (Raposo & Ibelli-Bianco, 2020).

8.2 Cuantificación de afinina

El método previamente validado se utilizó para la cuantificación de afinina en el extracto etanólico de la raíz de *H. longipes*. Se obtuvo una curva de calibración utilizando 6 concentraciones del estándar de afinina, con $r^2 > 0.98$, que se muestra en la Figura 3.

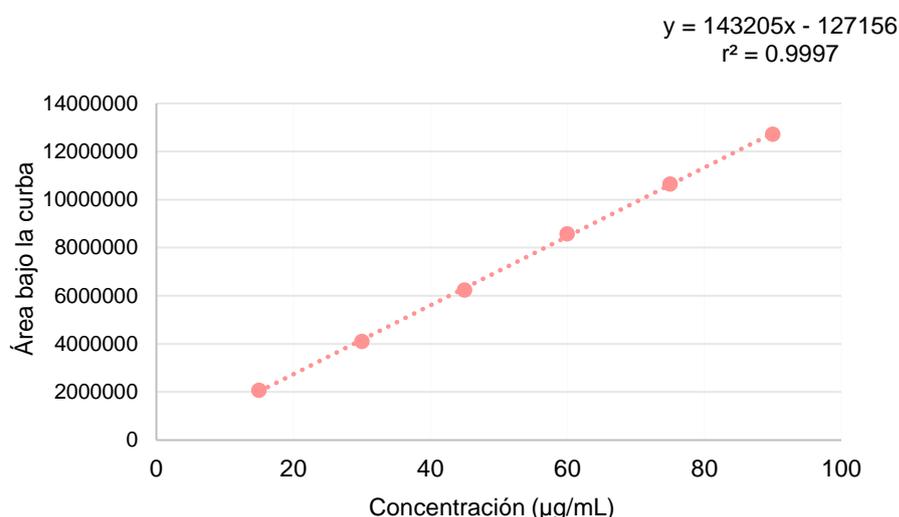


Figura 3 Curva de calibración obtenida para la cuantificación de afinina en el extracto etanólico de la raíz de *H. longipes*.

Un extracto cuantificado en base a un marcador químico es necesario para el desarrollo de un medicamento herbolario ya que permite expresar la cantidad de principio activo responsable del efecto terapéutico (OMS, 2000). El lote de extracto etanólico de la raíz de *H. longipes* utilizado en este estudio tenía un contenido de afinina promedio de $342 \pm 0.3 \mu\text{g}/\text{mg}$ de extracto. Cabe mencionar que este resultado puede variar dependiendo del material vegetal utilizado para la obtención del extracto, debido a diversos factores, como la época y zona de cosecha, así como el estado de crecimiento y madurez de la planta (Yanqun *et al.*, 2020; Mahajan *et al.*, 2020).

8.3 Caracterización del extracto etanólico cuantificado

El extracto etanólico de la raíz de *H. longipes* exhibió un índice de refracción de 1.409 ± 0.002 y un olor aromático. El color del extracto, evaluado mediante el espacio de color CIE L*a*b, tuvo valores de $L^* = 25.31$ (baja luminosidad), Hue $h^\circ = 37.06^\circ$ (área de color rojo anaranjado) y croma $C^* = 4.20$ (baja intensidad o saturación). Además, su consistencia era viscosa, su sabor intenso y desagradable, y producía una sensación de hormigueo que duraba varios minutos.

En cuanto a la prueba de miscibilidad, encontramos que el sistema alcanzó el equilibrio a las 48 horas, ya que la concentración de afinina no varió más del 15%, en ninguna de las dos temperaturas de prueba, de acuerdo a lo establecido en la guía de la OECD (OECD, 1995), (Tabla 6).

Tabla 6. Miscibilidad acuosa del extracto etanólico obtenido de la raíz de *H. longipes*.

Temperatura	μg de afinina/mg de extracto, 24 h	μg de afinina/mg de extracto, 48 h	%
25 °C	82.9 ± 1	76.5 ± 3	5.9
37 °C	77.0 ± 2	80.6 ± 2	3.7

Se solubilizaron en agua aproximadamente $80 \mu\text{g}$ de afinina/mg de extracto, lo que representa un 23% de afinina disuelta, considerando los resultados obtenidos al cuantificar este compuesto en el extracto ($342 \mu\text{g}$ de afinina/mg de extracto). La baja solubilidad acuosa de la afinina, nuestro marcador químico, evidenció la necesidad de aplicar nuevas técnicas de solubilización.

En cuanto a la calidad microbiológica, los productos farmacéuticos se pueden dividir en estériles y no estériles. Los medicamentos no estériles deben cumplir los criterios de pureza microbiológica incluidos en las monografías de la farmacopea. La evaluación de la contaminación microbiana es relevante ya que la presencia de microorganismos puede reducir el efecto terapéutico y puede causar infecciones en los consumidores. Las principales fuentes de contaminación microbiana son el agua de riego, las heces humanas, el aire de

ventilación entrante, la maquinaria y otros equipos de producción. Las plantas medicinales utilizadas como materia prima suelen tener una gran cantidad de bacterias aerobias, anaerobias y hongos filamentosos del suelo. Los microorganismos más comunes que se encuentran en los productos farmacéuticos son: *Klebsiella* spp, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp y *Pseudomonas aeruginosa*, entre otros (Eissa, 2017; FHEUM, 2022; Myemba, Bwire, & Sangeda, 2022). Por ello, en este trabajo se realizó un análisis microbiológico del extracto etanólico de la raíz de *H. longipes*. Los resultados obtenidos estuvieron dentro de los límites establecidos en el FHEUM 3.0 para material vegetal o productos que contengan extractos con o sin aditivos y materiales para uso interno (Tabla 7).

Tabla 7. Resultados del análisis microbiológico del extracto etanólico obtenido de la raíz de *H. longipes*.

Microorganismos	Extracto etanólico cuantificado de la raíz de <i>H. longipes</i>	Criterios de Aceptación **	
		Material vegetal o productos que contienen extractos con o sin aditivos	Materiales de uso interno
Bacterias aerobias	<10 UFC/g	Máximo 5x1 ⁵ UFC/g	Máximo 1 ⁵ UFC/g
Hongos	<10 UFC/g	Máximo 5x1 ⁴ UFC/g	Máximo 1 ³ UFC/g
Levaduras	<10 UFC/g	Máximo 5x1 ⁴ UFC/g	Máximo 1 ³ UFC/g
<i>Escherichia coli</i>	<3 NMP/g *	Ninguna	Ninguna
<i>Salmonella</i> (1 g)	Ninguna	Ninguna	Ninguna

* MPN: Most probable Number ** FHEUM 3.0, 2022

8.4 Obtención del sistema auto-microemulsificable

Los cuatro sistemas (A, B, C, D) descritos en la sección de metodología se prepararon utilizando las mezclas de excipientes que se muestran en la Tabla 4. Los excipientes se mezclaron perfectamente en todas las formulaciones y no se observó turbidez. Sin embargo, al agregar agua, A y B formaron emulsiones de color blanco lechoso. Por lo que se continuó trabajando con C y D, que

presentaban características de microemulsiones (soluciones transparentes). Esta posibilidad se confirmó al medir el tamaño de sus gotas, que estaba entre 50 y 200 nm.

Durante el desarrollo de nuevas formulaciones para administración oral, una de las principales limitaciones de las formas líquidas es la viscosidad, debido a la dificultad cuando pasan a través de la cánula intragástrica. El sistema C poseía una alta viscosidad, debido a su proporción de Tween® 80, por lo que decidimos seguir trabajando con el sistema D, que era una microemulsión de baja viscosidad. La optimización de este sistema se realizó mediante un diseño simplex reticular aumentado (Figura 4), seleccionando 10 nuevas formulaciones (Tabla 8) cuyo tamaño de gota, en ausencia de extracto, estuvo entre 50 y 200 nm, corroborando así que el sistema D daba lugar a una microemulsión al mezclarse con agua.

Tabla 8. Formulaciones preparadas con los excipientes del sistema D obtenidos a partir de un diseño simplex reticular aumentado.

Formulación D	Transcutol®	Tween® 80/PG(1:1)	Labrasol®	Tamaño de gota (nm)
1	0.60	0.10	0.30	69 ± 2.5
2	0.57	0.12	0.31	78 ± 4.4
3*	0.55	0.10	0.35	82 ± 2.6
4	0.55	0.15	0.30	94 ± 8.0
5	0.54	0.13	0.33	73 ± 4.5
6	0.52	0.12	0.36	76 ± 13.1
7	0.52	0.16	0.32	85 ± 7.8
8	0.50	0.10	0.40	78 ± 4.7
9	0.50	0.15	0.35	97 ± 5.6
10	0.50	0.20	0.30	94 ± 9.0

*HL-SMEDDS: formulación óptima

Posteriormente, a cada una de las 10 formulaciones se les adicionó 30 mg del extracto etanólico de la raíz de *H. longipes* cuantificado, considerando que en estudios previos nuestro grupo de investigación observó que esta cantidad del extracto etanólico de la raíz de *H. longipes*, contiene la cantidad de marcador químico que permite obtener una dosis de 150 mg de afinina/kg de peso corporal en ratas. Es importante mencionar que esta dosis de afinina provoca efectos farmacológicos significativos cuando se administra por vía intragástrica. El tamaño de partícula se determinó mediante la adición de 700 μ L de agua, simulando el volumen de lo que sucedería en el estómago de la rata, considerando que los fluidos gastrointestinales son acuosos, habiendo presentado dentro de todas las proporciones de los tres componentes que consideró el diseño, valores de tamaño de gota por debajo de 100 nm (con tamaño de gota < 100 nm pero a la vez > 50 nm) (Figura 5).

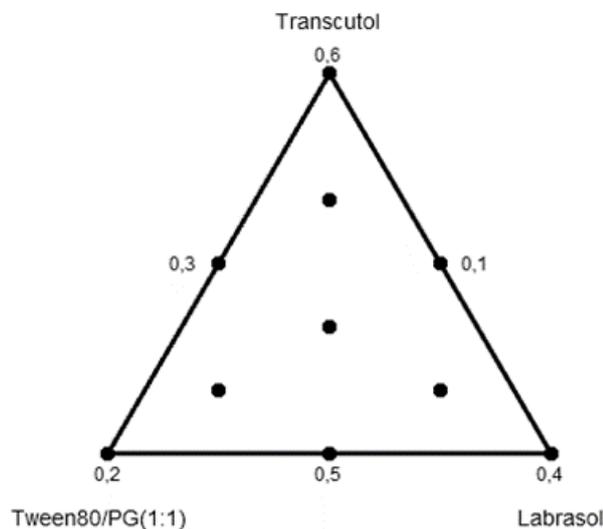


Figura 4. Diseño simplex reticular aumentado.

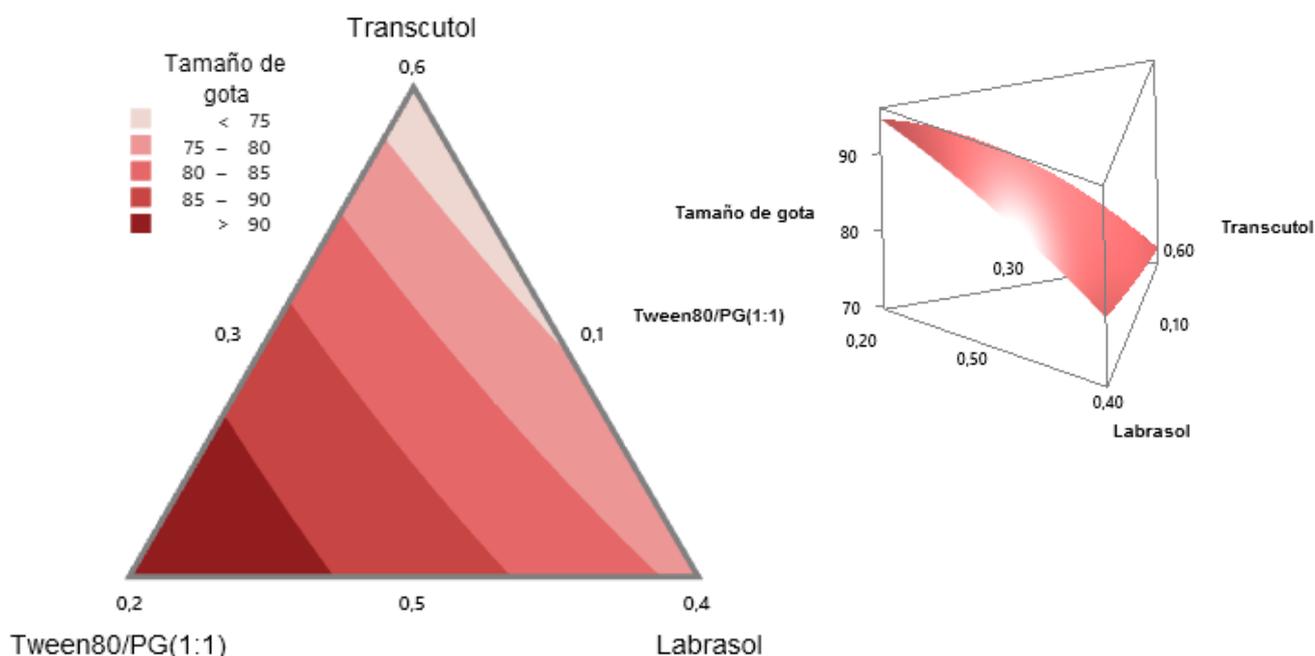


Figura 5. Gráficos de contorno y superficie de las diez formulaciones del sistema D cargadas con el extracto de la raíz de *H. longipes*.

La Figura 5 muestra los gráficos de superficie de respuesta y de contorno en dos y tres dimensiones correspondientes a las 10 formulaciones del sistema D cargadas con 30 mg del extracto etanólico de la raíz de *H. longipes*. Estos gráficos permiten visualizar la relación entre el tamaño de las gotas y las proporciones de los excipientes utilizados; dicho de otra manera, muestran el efecto de la mezcla de las proporciones utilizadas de cada uno de los 3 componentes sobre el tamaño de gota de la dispersión coloidal obtenida. En el caso de este sistema lipídico, se observó que a medida que aumenta el porcentaje de Transcutol® y Labrasol®, disminuye el tamaño de gota, de tal forma que el uso de Transcutol® y Labrasol®, en porcentajes intermedios, y una pequeña proporción de Tween® 80/PG permite obtener gotas de menor tamaño. (Penúltima región o área superior derecha del triángulo o diagrama pseudoternario de la Figura 5 y área inferior derecha del gráfico de superficie de respuesta de la misma figura).

De las composiciones elaboradas que se encuentran en la región citada, se seleccionó como óptima la formulación compuesta por Transcutol®: 55%,

Tween®80/PG: 10%, Labrasol®: 35% y 30 mg de extracto etanólico de la raíz de *H. longipes* (HL-SMEDDS); habiéndose considerado como criterios fundamentales: su baja viscosidad, la solubilidad (no saturación) del extracto en el sistema y su tamaño promedio de gota menor a 100 nm ($82 \pm 2,6$ nm). Lo cual está asociado a la factibilidad de su administración por sonda gastroesofágica, su menor potencial de precipitación en medio ácido y el reducido tamaño de gota que favorece una mayor biodisponibilidad. Cabe mencionar que de acuerdo con las proporciones antes mencionadas de los componentes, el sistema HL-SMEDDS obtenido corresponde a un sistema IIB de la clasificación LBF de Pouton (Pouton, 2006).

8.5 Caracterización del sistema automicroemulsificable (HL-SMEDDS)

El parámetro de color del sistema HL-SMEDDS obtenido utilizando el espacio de color CIE L^*a^*b , proporcionó valores de $L^* = 34.66$ (baja luminosidad), Hue $h^\circ = 65^\circ$ (área de color amarillo-rojo) y un croma $C^* = 19.11$ (baja intensidad o saturación); lo cual permite tener valores de referencia útiles para estandarizar su obtención. En cuanto a otras propiedades organolépticas, el HL-SMEDDS retuvo el sabor original del extracto y la sensación bucal de hormigueo con un ligero sabor adicional a aceite. Su olor fue una mezcla del característico del extracto y de los excipientes.

El tamaño de gota del HL-SMEDDS fue de 82 ± 0.88 nm con un valor bajo de PDI de 0.25 ± 0.57 y un potencial zeta de -1.27 ± 0.018 . Estos valores están en el intervalo descrito para los SMEDDS (Feeney *et al.*, 2016; L. Wang *et al.*, 2020). En cuanto a la morfología, la observación por STEM del HL-SMEDDS (Figura 6) muestra la presencia de gotas esféricas sin agregación. Además, el tamaño de gota del HL-SMEDDS obtenido de las imágenes STEM fue de aproximadamente 80 nm, valor similar al obtenido por el método de dispersión dinámica de la luz.

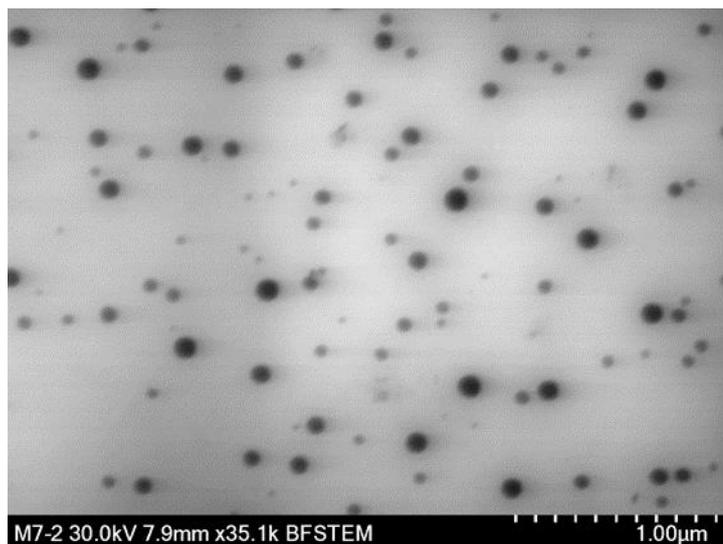


Figura 6. Imagen STEM del HL-SMEDDS, después de diluir 20 veces con agua destilada (dilución 1:20).

El índice de refracción del HL-SMEDDS fue de 1.441 ± 0.0002 , y al agregar agua (700 μL) para formar la microemulsión, el índice de refracción fue de 1.403 ± 0.002 . El pH del HL-SMEDDS fue de 6.9 ± 0.02 y su transmitancia fue de 80 ± 0.25 %. Todos estos parámetros y sus valores resultan útiles como referencia para establecer especificaciones de calidad para la obtención sistematizada de futuros lotes del HL-SMEDDS.

8.6 Estabilidad a diferentes valores de pH

La caracterización de la estabilidad química y física de SMEDDS y SNEDDS es importante, especialmente cuando se administran por vía oral (Dokania & Joshi, 2015; L. Wang *et al.*, 2020). Por lo tanto, fue relevante verificar la estabilidad del sistema HL-SMEDDS en diferentes condiciones de pHs, en particular aquellos que permiten estimar lo que le puede ocurrir en su paso por el tracto gastrointestinal. De tal forma, se determinó tanto la estabilidad química del principio activo (afinina) como el tamaño de gota al entrar en contacto con medios acuosos a dos valores de pH (Chaudhari & Akamanchi, 2019).

Para llevar a cabo las determinaciones de estabilidad, el HL-SMEDDS se diluyó en fluidos que simulaban el tránsito gástrico (solución de HCl de pH 1) e intestinales (solución de NaOH de pH 6.8) y se tomaron muestras de su mezcla en ambas soluciones en diferentes momentos. Como se muestra en la Figura

7A, el pH no tuvo un efecto significativo sobre la concentración de afinina (principio activo y marcador químico) a lo largo del tiempo, lo que demuestra la estabilidad química de este compuesto a las dos condiciones de pH.

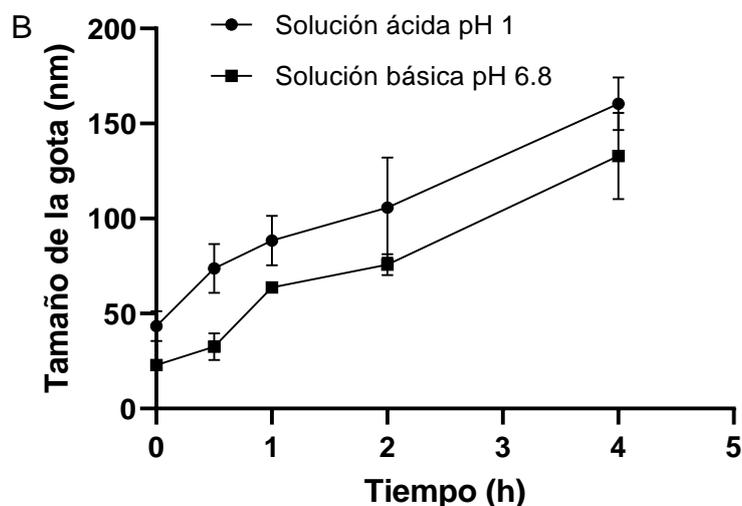
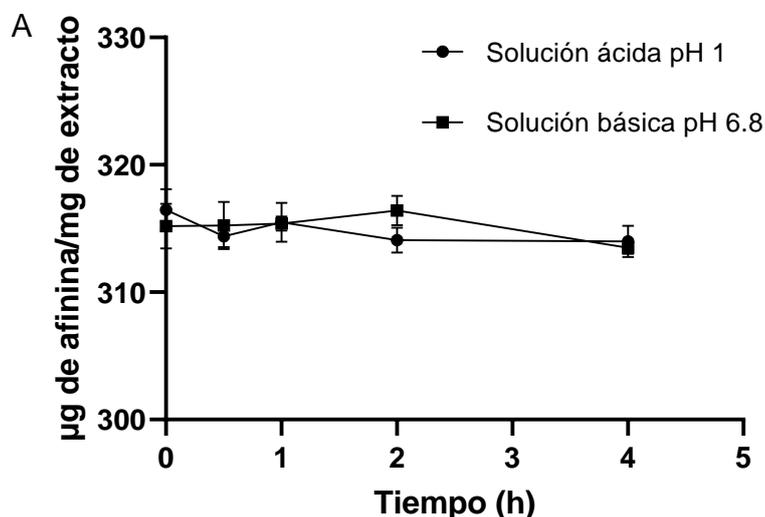


Figura 7. (A) Concentración de afinina en el extracto etanólico de la raíz de *H. longipes* (B) Tamaño de gota del HL-SMEDDS. Ambos (A y B), en dos soluciones a diferentes valores de pH a lo largo del tiempo, a temperatura constante de 25°C y agitación a 200 rpm. Dato expresados como media \pm SEM (n = 3).

Como se muestra en la Figura 7B, los valores de tamaño de gota del HL-SMEDDS aumentaron a medida que pasaba el tiempo en ambos medios gastrointestinales simulados. Este comportamiento de inestabilidad física podría

atribuirse al fenómeno de maduración de Ostwald, que se explica mejor a través de la ecuación de Laplace, donde la presión interna de las gotas diminutas difiere de la presión del líquido circundante en una magnitud que es directamente proporcional a la (mayor) tensión interfacial de la gota e inversamente proporcional a su (menor) radio. En consecuencia, cuando dos gotas de aceite de diferente tamaño entran en contacto en emulsiones, micro o nanoemulsiones, las gotas más grandes "devoran" a las gotas más pequeñas (el fluido se mueve de mayor a menor presión) (Liu & Hu, 2019; Park *et al.*, 2020).

Es importante mencionar que de acuerdo con estos resultados, el tamaño de gota del sistema lipídico no superó los 160 nm durante las 4 horas que duró la prueba de estabilidad. Esto significa que durante este período de tiempo, el sistema permaneció como una microemulsión.

En un estudio publicado con anterioridad al presente, los autores determinaron los parámetros farmacocinéticos de la afinina en ratas y su vida media calculada fue de 1.13 horas. Además, se encontró que 4 horas después de la administración oral de este compuesto, más del 70% de la dosis administrada había sido eliminada del suero, y luego de 6 horas no se encontró concentración de afinina (Veryser *et al.*, 2016). Por tanto, es muy probable que la mayor absorción de afinina se produzca en un periodo de tiempo inferior a 4 horas, periodo de tiempo en el que el sistema HL-SMEDS permanece como una microemulsión en los dos fluidos (pH 1 y 6.8). Por lo tanto, el hecho de que el tamaño de gota del HL-SMEDDS aumente en una escala de tamaño menor a 200 nm en función del tiempo (durante 4 horas), no afectará la biodisponibilidad del activo principal (afinina) contenido en el extracto etanólico de la raíz de *H. longipes*, estandarizado como el HL-SMEDDS.

El aumento en el tamaño de gota del HL-SMEDDS en función del tiempo podría estar relacionado con el valor del potencial zeta -1.27 ± 0.018 del sistema.

8.7 Estudio de estabilidad acelerada

Los estudios de estabilidad acelerada se diseñan bajo condiciones extremas de almacenamiento para aumentar la tasa de degradación química, biológica o los

cambios físicos del fármaco, medicamento o remedio herbolario, según el caso evaluado. De acuerdo con la NOM-073-SSA1, 2015 vigente en México, los estudios de estabilidad de fármacos, medicamentos y remedios herbolarios representan la evidencia científica que respalda su período de vida útil. En México, la Zona Climática reconocida para realizar estos estudios de estabilidad es la Zona Climática II (subtropical, con posible alta humedad), según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud indicada en el punto 12.23 de esta Norma (NOM-073-SSA1, 2015a).

Por lo anterior en este trabajo para los ensayos de estabilidad se mantuvo la temperatura de exposición de la muestra del HL-SMEDDS a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y una humedad relativa de $75\% \pm 5\%$. Los resultados obtenidos de este análisis (Tabla 9) mostraron que las tres réplicas del HL-SMEDDS se mantuvieron estables durante todo el tiempo que duró la prueba. La concentración de afinina no varió, y la pérdida de peso no superó el 5%, a pesar de que el HL-SMEDDS no se encontraba en el envase final, como sugiere la NOM. Ni el color ni el olor del HL-SMEDDS cambiaron y el pH permaneció estable. Específicamente, el color del HL-SMEDDS tuvo valores de $L^* = 37.39$ (baja luminosidad), Hue $h^{\circ} = 74.19^{\circ}$ (área de color amarillo-rojo) y croma $C^* = 23.75$ (baja intensidad o saturación). Evidentemente, es necesario realizar estudios de estabilidad a largo plazo del HL-SMEDDS, considerando su forma de dosificación y envase final, con el objeto de determinar su fecha de caducidad.

Tabla 9. Medidas de estabilidad del HL-SMEDDS.

Tiempo (meses)	Color	Olor	pH	Pérdida de peso (%)	Cuantificación (μg afinina/mg de extracto)
0	Área de color amarillo-rojo	Aromático	6.9 ± 1	-	254.3 ± 2
3	Área de color amarillo-rojo	Aromático	7.0 ± 2	0	255.5 ± 2
6	Área de color amarillo-rojo	Aromático	6.9 ± 0	2.1	254.6 ± 3

8.8 Cinética de liberación de afinina

En la Figura 8 se muestra el perfil de liberación de la afinina contenida en el HL-SMEDDS y en el extracto etanólico de la raíz de *H. longipes* en medios acuosos con diferentes valores de pHs. Cada curva corresponde a ensayos en los que las muestras se expusieron, de forma independiente, a los dos pHs de prueba. Como se puede observar, la tasa de liberación de afinina a partir del HL-SMEDDS, en ambos medios, fue mayor que la del extracto etanólico.

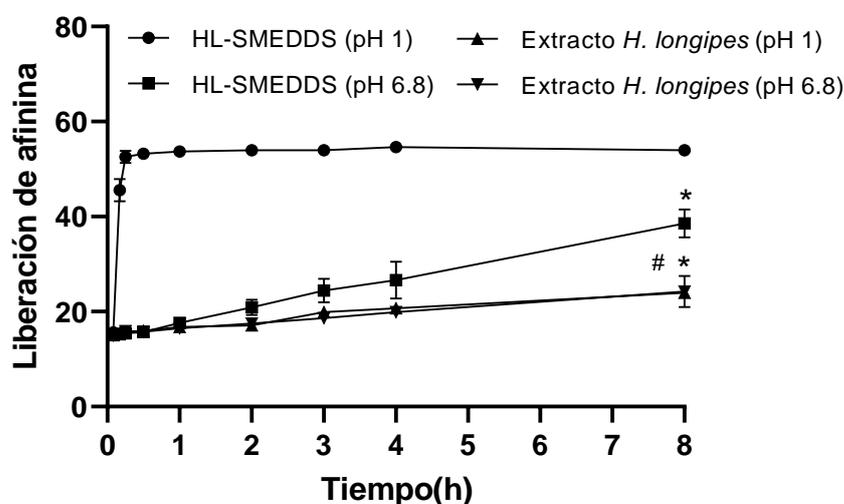


Figura 8. Perfil de liberación de afinina desde el HL-SMEDDS y el extracto etanólico de la raíz de *H. longipes* en dos soluciones de diferente valor de pH a lo largo del tiempo. La temperatura de 37°C y agitación a 50 rpm se mantuvieron constantes. Los datos se expresaron como media \pm SEM (n = 3), * p < 0.05 vs HL-SMEDDS (pH 1), # p < 0.05 HL-SMEDDS (pH 6.8) vs extracto de *H. longipes* (pH 1 y 6.8).

Tal y como se muestra en la Figura 8, en el medio de pH 1, la tasa de disolución acumulada de afinina contenida en el HL-SMEDDS alcanzó más del 50 % en aproximadamente 15 min. Por el contrario, la tasa de disolución de la afinina contenida en el extracto etanólico sólo alcanzó el 16 % en el mismo periodo de tiempo. Con respecto a la disolución de la afinina en la solución básica (pH 6.8), después de 8 horas se liberó aproximadamente el 40 % de la afinina contenida en el HL-SMEDDS. Sin embargo, en el caso del extracto etanólico sólo se alcanzó un valor acumulado de afinina disuelta de alrededor del 20 %; evidenciándose que para ambos medios (pH 1 y 6.8), la disolución acumulada

de la afinina contenida en el extracto fue la mitad de la obtenida para el HL-SMEDDS.

De lo anterior se deduce que la mayor velocidad de liberación de afinina desde el HL-SMEDDS puede atribuirse al aumento del área de superficie específica de las gotas lipídicas conteniendo la afinina disuelta en forma de microemulsión, es decir, con la formación de la nanogota se aumenta el área de contacto con los medios de disolución, mejorando así las tasas de disolución y la solubilidad de la afinina (Zhu *et al.*, 2021).

8.9 Determinación del efecto antihipertensivo del HL-SMEDDS

Para determinar el efecto antihipertensivo de las muestras en estudio, se administró una dosis de 150 mg/Kg de peso, tanto del HL-SMEDDS como del extracto etanólico de la raíz de *H. longipes*. Como se puede observar en la Figura 9, en las 3 primeras semanas hubo un aumento de la presión arterial en las ratas de los 4 grupos, la cual disminuyó luego de administrado el tratamiento en los últimos 4 días del ensayo, obteniendo un diferencia significativa entre el control negativo y los grupos tratados, y a su vez una diferencia significativa entre el HL-SMEDDS y el grupo del extracto etanólico.

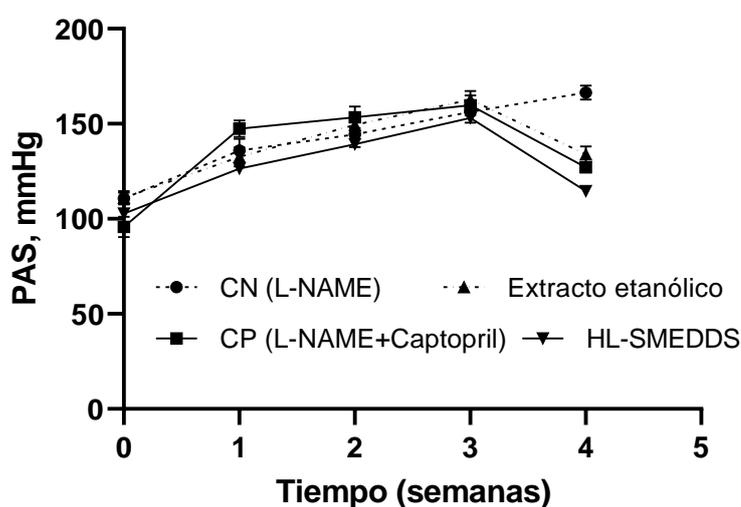


Figura 9. Efecto de la administración del extracto etanólico de *H. longipes* y el HL-SMEDDS (150 mg/Kg/día) por 4 días, sobre la presión arterial sistólica (PAS) de ratas hipertensas inducida con L-NAME (30 mg/Kg/día). Los valores se muestran como la media \pm SEM (n= 6 ratas para cada grupo). * p < 0.05 vs control negativo, # p < 0.05 EE vs HL-SMEDDS.

Los resultados indican que el HL-SMEDDS, disminuyó significativamente los valores de presión arterial, lo cual puede relacionarse con el aumento de la solubilidad del extracto y de la afinina, asegurando la administración íntegra de la dosis. Pudiendo ser esta una de las causas de la diferencia significativa de los valores de presión arterial entre el sistema HL-SMEDDS y el extracto crudo, ya que este último se solubilizó en carboximetilcelulosa al 1%, que es uno de los vehículos más utilizados para este tipo de ensayos pero ineficiente para solubilizar compuestos liposolubles como es el caso (Rahman *et al.*, 2021; Singh *et al.*, 2012).

Por otro lado, cabe recordar que cuando son administrados los SMEDDS y entran en contacto con los fluidos gastrointestinales, se forman microemulsiones; es decir, sistema coloidales micelares que protegen a los compuestos activos e impiden su precipitación, logrando así mejorar la absorción de los mismos, lo cual se refleja en un aumento de la biodisponibilidad, que se deriva en un incremento del efecto farmacológico (Visetvichaporn *et al.*, 2020; L. Wang *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2021), que se pudo evidenciar con el HL-SMEDDS desarrollado en este proyecto.

Siendo esta la principal ventaja de los SMEDDS, que se logra gracias a la utilización de excipientes polifuncionales. Además las microemulsiones son elaboradas con facilidad y son de bajo costo (Laothaweerungsawat *et al.*, 2020). Se utilizan para formular compuestos que puedan presentar baja solubilidad acuosa, baja permeabilidad, alto peso molecular, efecto de primer paso presistémico, degradación enzimática, irritación gástrica y para mejorar la estabilidad del fármaco (Aswar *et al.*, 2020). De hecho en la actualidad se ha prestado más atención a estos sistemas como portadores de fármacos debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad, estabilidad y permeabilidad mejorada (L. Wang *et al.*, 2020). Por lo que podemos decir que esta formación es útil para solubilizar y potenciar el efecto farmacológico del extracto obtenido de la raíz de *H. longipes*.

8.10 Efecto de la administración oral a largo plazo del HL-SMEDDS sobre la reactividad vascular: experimentos *ex vivo*.

Para determinar el efecto de la administración oral a largo plazo del HL-SMEDDS sobre la reactividad vascular, se aislaron aortas de ratas hipertensas (inducidas por L-NAME) y se utilizó carbachol como agente vasodilatador. Como se observa en la Figura 10, el porcentaje de relajación para el control negativo (L-NAME) y para el control positivo (Captopril) se redujo significativamente a la mitad. Sin embargo, las aortas tratadas con el HL-SMEDDS mostraron una vasodilatación que alcanzó el 100%. Estos hallazgos sugieren que el HL-SMEDDS aumentó la reactividad endotelial al proteger el endotelio.

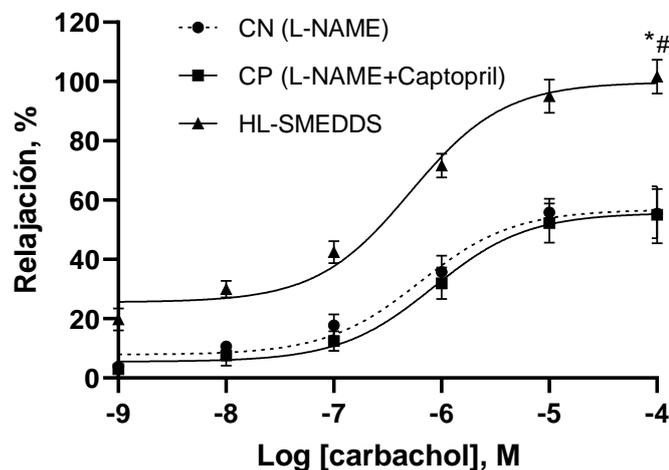


Figura 10. Efecto de la administración del HL-SMEDDS (150 mg/Kg/día), sobre la reactividad vascular después de 4 días de tratamiento. Las curvas concentración-respuesta se presentan como porcentaje de relajación de los anillos aórticos de rata precontraídos por fenilefrina (1 μ M) en función de la concentración de carbachol. Los valores se muestran como la media \pm SEM (n = 5 ratas para cada grupo). * p < 0.05 vs CN, # p < 0.05 vs CP.

Según varios autores, la disfunción endotelial se relaciona con una disminución de la biodisponibilidad del NO (Chen *et al.*, 2018; Cyr *et al.*, 2020; Fernandes *et al.*, 2023; Silva *et al.*, 2022; Sun *et al.*, 2020), lo cual produce vasoconstricción y un estado proinflamatorio y protrombótico, causando un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular. Por otro lado, la inflamación sistémica provoca estrés oxidativo dentro de la pared vascular generando radicales libres, los cuales reaccionan con el NO libre, disminuyendo así su biodisponibilidad y por

lo tanto aumentando la disfunción endotelial (Fernandes *et al.*, 2023; H. J. Sun *et al.*, 2020). En las células endoteliales activadas, las expresiones de citoquinas proinflamatorias, quimioquinas, enzimas y las moléculas de adhesión están sustancialmente reguladas al alza (Baghai *et al.*, 2018). Por lo que se podría decir que la inflamación de las células endoteliales juega un papel importante en la patogenia del endotelio.

Teniendo en cuenta que previamente se ha reportado que *H. longipes* y la afinina tienen efecto antiinflamatorio (Escobedo-Martínez *et al.*, 2017; Hernández, *et al.*, 2009; Hernández, Márquez, *et al.*, 2009), la mejora de la función endotelial causado por el HL-SMEDDS, podría atribuirse a la reducción de la inflamación.

8.11 Prueba preliminar con cápsulas cargadas con el HL-SMEDDS

Como se mencionó anteriormente, el HL-SMEDDS retuvo el sabor original del extracto (desagradable) y la sensación de hormigueo con un ligero sabor a aceite, por lo que se planteó como una alternativa a esta problemática su encapsulación. Esto porque las cápsulas de gelatina facilitan la administración del sistema HL-SMEDDS obtenido para futuros ensayos clínicos y constituyen una forma de dosificación ampliamente aceptada por los pacientes potenciales. De tal forma se cargaron dos cápsulas de gelatina dura con el HL-SMEDDS. Las cápsulas se mantuvieron durante 45 días a temperatura ambiente ($\pm 20^{\circ}\text{C}$) y luego se analizaron para determinar si se mantenía la integridad física (forma, transparencia y consistencia) de la cápsula de gelatina y si el HL-SMEDDS cargado en las cápsulas presentaba alguna variación en el color, el índice de refracción y el tamaño de las gotas. Después de 45 días, las cápsulas estaban intactas y el sistema lipídico no mostraba turbidez ni ningún otro signo de inestabilidad. El color del HL-SMEDDS tuvo valores de $L^* = 31.47$ (baja luminosidad), Hue $h^{\circ} = 72^{\circ}$ (área de color amarillo-bajo-rojo) y croma $C^* = 31.47$ (baja intensidad o saturación), el índice de refracción fue de 1.442 y el tamaño de gota fue de 78 nm; valores que corresponden a los obtenidos durante la caracterización inicial del sistema HL-SMEDDS.

CONCLUSIONES

1. En este estudio se utilizaron diagramas de fase pseudoternarios para desarrollar un sistema automicroemulsificable a partir de un extracto etanólico de la raíz de *H. longipes* (HL-SMEDDS). Se seleccionó como óptima la formulación compuesta por Transcutol®: 55% (solubilizante), Tween®80/PG: 10% (surfactante/cosolvente), Labrasol®: 35% (surfactante) y 30 mg de extracto etanólico de la raíz de *H. longipes*, teniendo en cuenta su viscosidad, la solubilidad del extracto y el tamaño de gota.
2. El HL-SMEDDS forma una dispersión automicroemulsificable al entrar en contacto con el agua con gotas en su mayoría esféricas y de tamaños menores a 100 nm.
3. Las pruebas de estabilidad física y química del HL-SMEDDS (4 horas; 25 °C; pH 1 y 6.8) mostraron que la concentración del marcador químico (afinina) se mantuvo estable y el tamaño de las gotas aumentó en función del tiempo cuando el HL-SMEDDS entró en contacto con el agua, lo que pudiera atribuirse al fenómeno de maduración de Ostwald.
4. Las pruebas de estabilidad acelerada (40°C; 75% HR) indicaron que la concentración de afinina contenida en el HL-SMEDDS se mantuvo estable.
5. La liberación *in vitro* de afinina a partir del HL-SMEDDS en medios acuosos de pH 1 y 6.8, utilizados para simular condiciones gástricas e intestinales, fue mayor que la del extracto etanólico de la raíz de *H. longipes*.
6. El HL-SMEDDS mostró efecto antihipertensivo a una dosis de 150 mg/Kg de peso, el cual fue significativamente mayor que el del extracto etanólico de la raíz de *H. longipes* y aumentó significativamente la reactividad endotelial en comparación con el captopril y el control negativo.
7. Se encontró que la mezcla de excipientes utilizada para la obtención del HL-SMEDDS aumenta significativamente la solubilidad del extracto

etanólico de la raíz de *H. longipes*, lo cual incrementa la liberación del marcador químico (afinina). El mayor efecto antihipertensivo presentado por el HL-SMEDDS, en comparación con el extracto etanólico de la raíz de *H. longipes*, sugiere que el sistema automicroemulsificable desarrollado aumenta la absorción y biodisponibilidad de los compuestos bioactivos contenidos en este extracto.

8. Los resultados derivados de la presente investigación indican que el HL-SMEDDS constituye un excelente punto de partida para el desarrollo de un medicamento herbolario útil para el tratamiento de la hipertensión arterial.

REFERENCIAS

- Abruzzo, A., Parolin, C., Bigucci, F., Rossi, M., Vitali, B., & Cappadone, C. (2022). Development and Characterization of Azithromycin-Loaded Microemulsions: A Promising Tool for the Treatment of Bacterial Skin Infections. *Antibiotics*, 11(8), 1040. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11081040>
- Acharya, N. S., Parihar, G. V., & Acharya, S. R. (2011). Phytosomes: New approach for delivering herbal drug with improved bioavailability. *Pharma Science Monitor an International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2(1), 144–160.
- Acharya, P. C., Shetty, S., Fernandes, C., Soares, D., Maheshwari, R., & Tekade, R. K. (2018). Preformulation in Drug Research and Pharmaceutical Product Development. In *Dosage Form Design Considerations: Volume I* (pp. 1–55). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814423-7.00001-0>
- Acosta-Recalde, P., Vera, G. Z., Morinigo, M., Maidana, G. M., & Samaniego, L. (2018). Uso de plantas medicinales y fitoterápicos en pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2. *Memorias Del Instituto de Investigaciones En Ciencias de La Salud*, 16(2), 6–11. [https://doi.org/10.18004/mem.iics/1812-9528/2018.016\(02\)06-011](https://doi.org/10.18004/mem.iics/1812-9528/2018.016(02)06-011)
- AHA. (2018). High Blood Pressure: ACC/AHA Releases Updated Guideline. *American Family Physician*, 97(6), 413–415.
- Ahmad Khan, M. S., & Ahmad, I. (2019). Herbal Medicine: Current Trends and Future Prospects. In *New Look to Phytomedicine* (pp. 3–13). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814619-4.00001-X>
- Ahn, K. (2017). The worldwide trend of using botanical drugs and strategies for developing global drugs. *BMB Reports*, 50(3), 111–116. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2017.50.3.221>
- Al Shaer, D., Al Musaimi, O., Albericio, F., & de la Torre, B. G. (2019). 2018 FDA Tides Harvest. *Pharmaceuticals*, 12(2), 1–6.

<https://doi.org/10.3390/ph12020052>

Albasri, A., Hattle, M., Koshiaris, C., Dunnigan, A., Paxton, B., Fox, S. E., ... Sheppard, J. P. (2021). Association between antihypertensive treatment and adverse events: systematic review and meta-analysis. *BMJ*, 372, n189. <https://doi.org/10.1136/bmj.n189>

Alcocer, L., Álvarez-López, H., Borrayo-Sánchez, G., Cardona-Muñoz, E., & Chávez-Mendoza, A. (2019). Hypertension as a persistent public health problem. A position paper from Alliance for a Healthy Heart, Mexico. *Annals of Clinical Hypertension*, 3(1), 009–030. <https://doi.org/10.29328/journal.ach.1001015>

Alonso-castro, A. J., Domínguez, F., Maldonado-miranda, J. J., Castillo-pérez, J., Carranza-álvarez, C., Solano, E., ... Orozco-castellanos, M. (2017). Use of medicinal plants by health professionals in Mexico. 198(October 2016), 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.12.038>

Alqahtani, M. S., Kazi, M., Alsenaidy, M. A., & Ahmad, M. Z. (2021). Advances in Oral Drug Delivery. *Frontiers in Pharmacology*, 12(February). <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.618411>

Alshamrani, M., Khan, M. K., Khan, B. A., Salawi, A., & Almoshari, Y. (2022). Technologies for Solubility, Dissolution and Permeation Enhancement of Natural Compounds. *Pharmaceuticals*, 15(6), 1–26. <https://doi.org/10.3390/ph15060653>

Althaus, J. B., Malyszek, C., Kaiser, M., Brun, R., & Schmidt, T. J. (2017). Alkamides from *Anacyclus pyrethrum* L. And Their in Vitro Antiprotozoal Activity. *Molecules*, 22(5), 1–9. <https://doi.org/10.3390/molecules22050796>

Amarasiri, S. S., Attanayake, A. P., Arawwawala, L. D. A. M., Jayatilaka, K. A. P. W., & Mudduwa, L. K. B. (2020). Protective effects of three selected standardized medicinal plant extracts used in Sri Lankan traditional medicine in adriamycin induced nephrotoxic Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 259(December 2019), 112933. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112933>

- Anatol, R., Arcidiacono, J., Bailey, A. M., Durfor, C. N., Fink, D. W., Holobaugh, P., ... Witten, C. (2014). The Regulatory Process from Concept to Market. In *Principles of Tissue Engineering* (Fourth Ed). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398358-9.00086-0>
- Antza, C., Doundoulakis, I., Stabouli, S., & Kotsis, V. (2018). Comparison Among Recommendations for the Management of Arterial Hypertension Issued by Last US, Canadian, British and European Guidelines. *High Blood Pressure and Cardiovascular Prevention*, *25*(1), 9–16. <https://doi.org/10.1007/s40292-017-0236-x>
- Aponte, O. F., Díaz, B. M., & Huertasc, C. E. (2015). La calidad desde el diseño: principios y oportunidades para la industria farmacéutica. *Estudios Generales*, *31*(45), 68–78.
- Arredondo, A., Duarte, M. B., & Cuadra, S. M. (2017). Epidemiological and financial indicators of hypertension in older adults in Mexico: challenges for health planning and management in Latin America. *International Journal of Health Planning and Management*, *32*(2), e121–e136. <https://doi.org/10.1002/hpm.2362>
- Arriaga-Alba, M., Rios, M. Y., & Déciga-Campos, M. (2013). Antimutagenic properties of affinin isolated from *Heliopsis longipes* extract. *Pharmaceutical Biology*, *51*(8), 1035–1039. <https://doi.org/10.3109/13880209.2013.775161>
- Aswar, M., Bhalekar, M., Trimukhe, A., & Aswar, U. (2020). Self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) of curcumin attenuates depression in olfactory bulbectomized rats. *Heliyon*, *6*(8), e04482. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04482>
- Atanasov, A. G., Zotchev, S. B., Dirsch, V. M., Orhan, I. E., Banach, M., Rollinger, J. M., ... Supuran, C. T. (2021). Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, *20*(3), 200–216. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-00114-z>
- Atkins, E. R., Hons, B., Lung, T., Redfern, J., & Hons, B. P. (2017). Combination Pills for Treatment of High Blood Pressure : Cost-effectiveness in The Asia

- Pacific Region. *Heart, Lung and Circulation*, 26(4), 313–315. <https://doi.org/10.1016/j.hlc.2017.02.001>
- Avigan, M. I., Mozersky, R. P., & Seeff, L. B. (2016). Scientific and regulatory perspectives in herbal and dietary supplement associated hepatotoxicity in the United States. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(3), 1–30. <https://doi.org/10.3390/ijms17030331>
- Baghai, T. C., Varallo-Bedarida, G., Born, C., Häfner, S., Schüle, C., Eser, D., ... Rupprecht, R. (2018). Classical risk factors and inflammatory biomarkers: One of the missing biological links between cardiovascular disease and major depressive disorder. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6). <https://doi.org/10.3390/ijms19061740>
- Bai, G., Zhang, T., Hou, Y., Ding, G., Jiang, M., & Luo, G. (2018). From quality markers to data mining and intelligence assessment: A smart quality-evaluation strategy for traditional Chinese medicine based on quality markers. *Phytomedicine*, 44, 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.01.017>
- Baker, D. A. (2020). Plants against *Helicobacter pylori* to combat resistance: An ethnopharmacological review. *Biotechnology Reports*, 26, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00470>
- Bakhle, S. S., & Avari, J. G. (2015). Development and characterization of solid self-emulsifying drug delivery system of cilnidipine. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 63(6), 408–417. <https://doi.org/10.1248/cpb.c14-00326>
- Bakondi, E., Singh, S. B., Hajnádý, Z., Nagy-Pénzes, M., Regdon, Z., Kovács, K., ... Virág, L. (2019). Spilanthol inhibits inflammatory transcription factors and iNOS expression in macrophages and exerts anti-inflammatory effects in dermatitis and pancreatitis. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(17), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms20174308>
- Bandopadhyay, S., Bandyopadhyay, N., Deb, P. K., Singh, C., & Tekade, R. K. (2018). Preformulation Studies of Drug Substances, Protein, and Peptides:

Role in Drug Discovery and Pharmaceutical Product Development. Role in Drug Discovery and Pharmaceutical Product Development. In *Dosage Form Design Considerations: Volume I*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814423-7.00012-5>

Banerjee, S., & Pillai, J. (2019). Solid lipid matrix mediated nanoarchitectonics for improved oral bioavailability of drugs. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 15(6), 499–515. <https://doi.org/10.1080/17425255.2019.1621289>

Barbosa, A. F., de Carvalho, M. G., Smith, R. E., & Sabaa-Srur, A. U. O. (2016). Spilanthal: Occurrence, extraction, chemistry and biological activities. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 26(1), 128–133. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.07.024>

Batanero Hernán, M., Guinea López, M., García Jiménez, E., & Rodríguez Chamorro, M. (2017). Análisis del consumo simultáneo de medicamentos y plantas medicinales en población española mayor de 65 años. *Pharmaceutical Care España*, 19(2), 69–79.

Bedia, J., Lemus, J., Calvo, L., Rodriguez, J. J., & Gilarranz, M. A. (2017). Effect of the operating conditions on the colloidal and microemulsion synthesis of Pt in aqueous phase. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 1, 1–30. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.04.046>

Belmokhtar, M., Bouanani, N. E., Ziyat, A., Mekhfi, H., Bnouham, M., Aziz, M., ... Legssyer, A. (2009). Antihypertensive and endothelium-dependent vasodilator effects of aqueous extract of *Cistus ladaniferus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 389(1), 145–149. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.08.113>

Bergler-Klein, J. (2019). What's new in the ESC 2018 guidelines for arterial hypertension: The ten most important messages. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 131(7–8), 180–185. <https://doi.org/10.1007/s00508-018-1435-8>

Bhalani, D. V, Nutan, B., & Kumar, A. (2022). *Bioavailability Enhancement*

Techniques for Poorly Aqueous Soluble Drugs and Therapeutics.

- Bhatt, A. (2016). Phytopharmaceuticals: A new drug class regulated in India. *Perspectives in Clinical Research*, 7(2), 59. <https://doi.org/10.4103/2229-3485.179435>
- Boonen, J., Baert, B., Roche, N., Burvenich, C., & De Spiegeleer, B. (2010). Transdermal behaviour of the N-alkylamide spilanthol (affinin) from *Spilanthes acmella* (Compositae) extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 127(1), 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.09.046>
- Borrayo-Sánchez, G. (2022). El sistema de salud mexicano y la hipertensión arterial. *Cardiovascular and Metabolic Science*, 33(S3), 259–265. <https://doi.org/10.35366/105194>
- Boscolo, O., Perra, F., Salvo, L., Buontempo, F., & Lucangioli, S. (2020). Formulation and Stability Study of Omeprazole Oral Liquid Suspension for Pediatric Patients. *Hospital Pharmacy*, 55(5), 314–322. <https://doi.org/10.1177/0018578719844704>
- Box, E. O. (2019). Form and character diversity of potential world vegetation. *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 254(April), 203–221. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2019.03.001>
- Braam, B., Taler, S. J., Rahman, M., Fillaus, J. A., Greco, B. A., Forman, J. P., ... Hedayati, S. S. (2017). Recognition and management of resistant hypertension. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 12(3), 524–535. <https://doi.org/10.2215/CJN.06180616>
- Burnier, M. (2019). Treatment of hypertension in the elderly in 2017/2018 - what's new? *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 20(15), 1869–1877. <https://doi.org/10.1080/14656566.2019.1638911>
- Burnier, M., & Egan, B. M. (2019). Adherence in Hypertension: A Review of Prevalence, Risk Factors, Impact, and Management. *Circulation Research*, 124(7), 1124–1140. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.313220>
- Campos-Nonato, I., Hernández-Barrera, L., Pedroza-Tobías, A., Medina, C., &

- Barquera, S. (2018). Hipertensión arterial en adultos mexicanos: prevalencia, diagnóstico y tipo de tratamiento. *Ensanut MC 2016. Salud Pública de México*, 60(3, may-jun), 233. <https://doi.org/10.21149/8813>
- Campos-Saladaña, R., Solís-Vásquez, O., Velázquez-Nucamendi, A., Cruz-Magdaleno, L., Cruz-Oliva, D., Vázquez-Gómez, M., & Rodríguez-Larramendi, L. (2018). Saber etnobotánico , riqueza y valor de uso de plantas medicinales en Monterrey , Villa Corzo , Chiapas (México). *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 17(4), 350–362. Retrieved from https://blacpma.usach.cl/sites/blacpma/files/articulo_3_-_1440_-_350_-_362.pdf
- Cariño-Cortés, R., Gayosso-De-Lucio, J. A., Ortiz, M. I., Sánchez-Gutiérrez, M., García-Reyna, P. B., Cilia-López, V. G., ... Ponce-Monter, H. (2010). Antinociceptive, genotoxic and histopathological study of *Heliopsis longipes* S.F. Blake in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 130(2), 216–221. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.04.037>
- Castro-Ruiz, J. E., Rojas-Molina, A., Luna-Vázquez, F. J., Rivero-Cruz, F., García-Gasca, T., & Ibarra-Alvarado, C. (2017). Affinin (Spilanthol), isolated from *heliopsis longipes*, induces vasodilation via activation of gasotransmitters and prostacyclin signaling pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms18010218>
- Champagne, B. M., Antonio Ochoa, E., Khanchandani, H. S., & Schoj, V. (2022). Civil society's role in improving hypertension control in Latin America. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 46, 1. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2022.165>
- Chaudhari, K. S., & Akamanchi, K. G. (2019). Novel bicephalous heterolipid based self-microemulsifying drug delivery system for solubility and bioavailability enhancement of efavirenz. *International Journal of Pharmaceutics*, 560(January), 205–218. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.01.065>

- Chen, J. yi, Ye, Z. xin, Wang, X. fen, Chang, J., Yang, M. wen, Zhong, H. hua, ... Yang, S. long. (2018). Nitric oxide bioavailability dysfunction involves in atherosclerosis. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 97(October 2017), 423–428. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.122>
- Chinnadurai, G. S., Krishnan, S., & Perumal, P. (2018). Studies on detection and analysis of proteases in leaf extract of medicinally important plants. *Phytomedicine*, 40(March 2017), 176–188. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.01.011>
- CICB. (2018). EDICIN 2018 del Cuadro Básico de Medicamentos Herbolarios. *Diario Oficial de La Federación*.
- CICB. (2019). PRIMERA Actualización de la Edición 2018 del Cuadro Básico de Medicamentos Herbolarios. *Diario Oficial de La Federación*.
- Cilia-López, V. G., Juárez-Flores, B. I., Aguirre-Rivera, J. R., & Reyes-Agüero, J. A. (2010). Analgesic activity of *Heliopsis longipes* and its effect on the nervous system. *Pharmaceutical Biology*, 48(2), 195–200. <https://doi.org/10.3109/13880200903078495>
- CNQFB. (2012). *Guía de Validación de Métodos Analíticos*. 1–43. Retrieved from <http://doi.wiley.com/10.1002/pca.1215>
- COFEPRIS. (2014). Reglamento de Insumos para la Salud. *Diario Oficial de La Federación*, pp. 1–44. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- COFEPRIS. (2020). Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios _ Gobierno _ gob. Retrieved from <https://www.gob.mx/cofepris>
- COFEPRIS. (2021). *Listados de Registros Sanitarios de Medicamentos*. Retrieved from <https://www.gob.mx/cofepris/documentos/registros-sanitarios-medicamentos>
- Cyr, A. R., Huckaby, L. V., Shiva, S. S., & Zuckerbraun, B. S. (2020). Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction. *Critical Care Clinics*, 36(2), 307–321. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2019.12.009>

- Dahlgren, D., Sjögren, E., & Lennernäs, H. (2020). Intestinal absorption of BCS class II drugs administered as nanoparticles: A review based on in vivo data from intestinal perfusion models. *ADMET and DMPK*, 8(4), 375–390. <https://doi.org/10.5599/ADMET.881>
- De Freitas-Blanco, V. S., Monteiro, K. M., De Oliveira, P. R., De Oliveira, E. C. S., De Oliveira Braga, L. E., De Carvalho, J. E., & Rodrigues, R. A. F. (2019). Spilanthol, the Principal Alkylamide from *Acmella oleracea*, Attenuates 5-Fluorouracil-Induced Intestinal Mucositis in Mice. *Planta Medica*, 85(3), 203–209. <https://doi.org/10.1055/a-0715-2002>
- De Spiegeleer, B., Boonen, J., Malysheva, S. V., Mavungu, J. D. Di, De Saeger, S., Roche, N., ... Veryser, L. (2013). Skin penetration enhancing properties of the plant N-alkylamide spilanthol. *Journal of Ethnopharmacology*, 148(1), 117–125. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.03.076>
- Déciga-Campos, M., Rios, M. Y., & Aguilar-Guadarrama, A. B. (2010). Antinociceptive effect of *heliopsis longipes* extract and affinin in mice. *Planta Medica*, 76(7), 665–670. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1240658>
- Disi, S. S. Al, Anwar, M. A., & Eid, A. H. (2016). Anti-hypertensive Herbs and their Mechanisms of Action : Part I. *Frontiers in Pharmacology* |, 6(January), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00323>
- Dokania, S., & Joshi, A. K. (2015). Self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS)-challenges and road ahead. *Drug Delivery*, 22(6), 675–690. <https://doi.org/10.3109/10717544.2014.896058>
- Dong, W., Zhao, S., Wen, S., Dong, C., & Chen, Q. (2019). A preclinical randomized controlled study of ischemia treated with Ginkgo biloba extracts : Are complex components bene fi cial for treating acute stroke ? *Current Research in Translational Medicine*, 1(2019), 7. <https://doi.org/10.1016/j.retram.2020.07.002>
- Doroszkó, A., Janus, A., Szahidewicz-Krupska, E., Mazur, G., & Derkacz, A. (2016). Resistant Hypertension. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 25(1), 173–183. <https://doi.org/10.17219/acem/58998>

- Doungsaard, P., Chansakaow, S., Poomanee, W., Sirithunyalug, B., Chaichit, S., & Leelapornpisid, P. (2023). Selection of bioactive chemical markers for anti-aging skin assessment of *Dimocarpus longan* Lour. leaf extract. *Arabian Journal of Chemistry*, 16(8), 104954. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2023.104954>
- Dr Chris Moreton. (2021). Poor solubility- Where Do We Stand 25 Years after the “Rule of Five”? *American Pharmaceutical Review*. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12040365.9>.
- DSHEA. (1994). Dietary Supplement Health & Education Act (DSHEA). *The Science Behind the Supplements*.
- Düsing, R., Waeber, B., Destro, M., Santos Maia, C., & Brunel, P. (2017). Triple-combination therapy in the treatment of hypertension: A review of the evidence. *Journal of Human Hypertension*, 31(8), 501–510. <https://doi.org/10.1038/jhh.2017.5>
- Eirin, A., Textor, S., & Lerman, L. (2016). Emerging concepts for patients with treatment-resistant hypertension. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 26(8), 700–706. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2016.05.004>
- Eissa, M. E. (2017). Quantitative microbial risk assessment of pharmaceutical products. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 71(3), 245–251. <https://doi.org/10.5731/pdajpst.2016.007047>
- Elder, D. P., Kuentz, M., & Holm, R. (2016). Pharmaceutical excipients - Quality, regulatory and biopharmaceutical considerations. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 87, 88–99. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.12.018>
- Elkassas, D., & Arafa, A. (2017). The innovative applications of therapeutic nanostructures in dentistry. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 13(4), 1543–1562. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.01.018>
- EMA, & HMPC. (2018). *Guideline on Quality of Herbal Medicinal Products1/ Traditional Herbal Medicinal Products* (Vol. 44, pp. 1–11). Vol. 44, pp. 1–11.

- Escobedo-Martínez, C., Guzmán-Gutiérrez, S. L., Hernández-Méndez, M. de L. M., Cassani, J., Trujillo-Valdivia, A., Orozco-Castellanos, L. M., & Enríquez, R. G. (2017a). Heliopsis longipes: Anti-arthritic activity evaluated in a Freund's adjuvant-induced model in rodents. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 27(2), 214–219. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.09.003>
- Escobedo-Martínez, C., Guzmán-Gutiérrez, S. L., Hernández-Méndez, M. de L. M., Cassani, J., Trujillo-Valdivia, A., Orozco-Castellanos, L. M., & Enríquez, R. G. (2017b). Heliopsis longipes: Anti-arthritic activity evaluated in a Freund's adjuvant-induced model in rodents. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 27(2), 214–219. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.09.003>
- EUH. (2020). European Medicines Agency. <https://doi.org/10.32388/yokp53>
- Falcón-Brindis, A., León-Cortés, J. L., & Montañez-Reyna, M. (2021). How effective are conservation areas to preserve biodiversity in Mexico? *Perspectives in Ecology and Conservation*, 19(4), 399–410. <https://doi.org/10.1016/j.pecon.2021.07.007>
- Fatouros, D. G., Deen, G. R., Arleth, L., Bergenstahl, B., Nielsen, F. S., Pedersen, J. S., & Mullertz, A. (2007). Structural Development of Self Nano Emulsifying Drug Delivery Systems (SNEDDS) During In Vitro Lipid Digestion Monitored by Small-angle X-ray Scattering. *Pharmaceutical Research*, 24(10), 1844–1853. <https://doi.org/10.1007/s11095-007-9304-6>
- Faustino-Vega, A., & Quirino-Barreda, C. T. (2015). Nanomedicina y biomimetismo. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria En Nanociencias y Nanotecnología*, 7(12), 19–31. <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2014.12.49708>
- FDA. (2016). Botanical Drug Development - Guidance for industry. *U.S. Department of Health and Human Services.*, (December), 1–30. Retrieved from <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/UCM458484.pdf>
- FDA. (2019). *Dietary Supplements*.
- Feeney, O. M., Crum, M. F., McEvoy, C. L., Trevaskis, N. L., Williams, H. D.,

- Pouton, C. W., ... Porter, C. J. H. (2016). 50 years of oral lipid-based formulations: Provenance, progress and future perspectives. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 101, 167–194. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.04.007>
- Fernandes, D., Khambata, R. S., Massimo, G., Ruivo, E., Gee, L. C., Foster, J., ... Ahluwalia, A. (2023). Local delivery of nitric oxide prevents endothelial dysfunction in periodontitis. *Pharmacological Research*, 188(May 2022), 106616. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2022.106616>
- FHEUM. (2001). *Farmacopea herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos* (p. 51). p. 51.
- FHEUM. (2013). *Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos*.
- FHEUM. (2022). *Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos 3.0*. In *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos* (3 ra). Retrieved from <https://www.farmacopea.org.mx/index.php?m=1&sb=3&f=0>
- Gallaga-Solórzano, J. C., Cerón Sánchez, A., & Espinosa Jaime, S. P. (2016). Uso de Productos Herbolarios en México. *Revista COFEPRIS Protección y Salud*, 1, 50805200.
- Gandhi, S., Tiwari, A., Vyas, A., & Joshi, M. (2020). *Regulatory Framework Of Herbal Medicine In*. 7(11), 4612–4621.
- Giles, T. D., Materson, B. J., Cohn, J. N., & Kostis, J. B. (2009). Definition and Classification of Hypertension: An Update. *The Journal of Clinical Hypertension*, 11(11), 611–614. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7176.2009.00179.x>
- Górniak, A., Złocińska, A., Trojan, M., Pęczak, A., & Karolewicz, B. (2022). Preformulation Studies of Ezetimibe-Simvastatin Solid Dispersions in the Development of Fixed-Dose Combinations. *Pharmaceutics*, 14(5). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14050912>
- Groha, P., & Schunkert, H. (2015). Management der arteriellen Hypertonie. *Herz*, Vol. 40, pp. 929–942. <https://doi.org/10.1007/s00059-015-4349-5>

- Guiotto, P., Woelkart, K., Grabnar, I., Voinovich, D., Perissutti, B., Invernizzi, S., ... Bauer, R. (2008). Pharmacokinetics and immunomodulatory effects of phytotherapeutic lozenges (bonbons) with *Echinacea purpurea* extract. *Phytomedicine*, 15(8), 547–554. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.05.003>
- Hamdidouchea, I., Julliena, V., Boutouyriea, P., Billauda, E., Azizib, M., & Laurenta, S. (2017). Routine urinary detection of antihypertensive drugs for systematic evaluation of adherence to treatment in hypertensive patients. *Journal of Hypertension*, 35(9), 1891–1898. <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000001402>
- Hamrahian, S. M., Maarouf, O. H., & Fülöp, T. (2022). A Critical Review of Medication Adherence in Hypertension: Barriers and Facilitators Clinicians Should Consider. *Patient Preference and Adherence*, 16(October), 2749–2757. <https://doi.org/10.2147/PPA.S368784>
- Hariharan, P., & Subburaju, T. (2012). Medicinal Plants And Its Standardization – A Global And Industrial Overview. *Global Journal of Medicinal Plant Research*, 1(1), 10–13.
- Hasanpour, M., Iranshahy, M., & Iranshahi, M. (2020). The application of metabolomics in investigating anti-diabetic activity of medicinal plants. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 128(March), 110263. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110263>
- Hernández-Morales, A., Arvizu-Gómez, J. L., Carranza-Álvarez, C., Gómez-Luna, B. E., Alvarado-Sánchez, B., Ramírez-Chávez, E., & Molina-Torres, J. (2015). Larvicidal activity of affinin and its derived amides from *Heliopsis longipes* A. Gray Blake against *Anopheles albimanus* and *Aedes aegypti*. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 18(2), 227–231. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2014.09.004>
- Hernández, I., Lemus, Y., Prieto, S., Molina-Torres, J., & Garrido, G. (2009). Anti-inflammatory effect of an ethanolic root extract of *Heliopsis longipes* in vitro. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*,

8(3), 160–164.

- Hernández, I., Márquez, L., Martínez, I., Dieguez, R., Delporte, C., Prieto, S., ... Garrido, G. (2009). Anti-inflammatory effects of ethanolic extract and alkaloids-derived from *Heliopsis longipes* roots. *Journal of Ethnopharmacology*, 124(3), 649–652. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.04.060>
- Honek, J. (2017). Preclinical research in drug Correspondence to: *Medical Writing*, 26(4), 5–8.
- Howes, M. J. R., Quave, C. L., Collemare, J., Tatsis, E. C., Twilley, D., Lulekal, E., ... Nic Lughadha, E. (2020). Molecules from nature: Reconciling biodiversity conservation and global healthcare imperatives for sustainable use of medicinal plants and fungi. *Plants People Planet*, 2(5), 463–481. <https://doi.org/10.1002/ppp3.10138>
- HTA *mexico*. (n.d.). Retrieved from http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/076-GCP__HipertArterial1NA/HIPERTENSION_RR_CENETEC.pdf
- Huang, W. C., Wu, L. Y., Hu, S., & Wu, S. J. (2018). Spilanthol Inhibits COX-2 and ICAM-1 Expression via Suppression of NF- κ B and MAPK Signaling in Interleukin-1 β -Stimulated Human Lung Epithelial Cells. *Inflammation*, 41(5), 1934–1944. <https://doi.org/10.1007/s10753-018-0837-0>
- Huang, W., Huang, C., Hu, S., & Peng, H. (2019). Topical Spilanthol Inhibits MAPK Signaling and Ameliorates Allergic Inflammation in DNCB-Induced Atopic Dermatitis in Mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 1–13. <https://doi.org/10.3390/ijms20102490>
- Ifeanyi, C., Matsabisa, M. G., Auwal, M., Erukainure, O. L., Chabalala, M. H., & Islam, S. (2019). Medicinal plants with concomitant anti-diabetic and anti-hypertensive effects as potential sources of dual acting therapies against diabetes and hypertension: A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 235(February), 329–360. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.02.024>

- Jain, S., Patel, N., & Lin, S. (2015). Solubility and dissolution enhancement strategies: Current understanding and recent trends. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 41(6), 875–887. <https://doi.org/10.3109/03639045.2014.971027>
- Juárez-Pérez, J. ., & Cabrera-Luna, J. . (2019). Plantas Para Afecciones Respiratorias Comercializadas En Tres Mercados De La Ciudad De Santiago De Querétaro. *Polibotánica*, 0(46), 167–178. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.47.12>
- Kalepu, S., & Nekkanti, V. (2015). Insoluble drug delivery strategies: Review of recent advances and business prospects. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5(5), 442–453. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2015.07.003>
- Katakam, S., Sharma, P., Anandjiwala, S., Sharma, S., & Shrivastava, N. (2019). Investigation on apposite chemical marker for quality control of Tephrosia purpurea (L.) Pers. by means of HPTLC-chemometric analysis. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1110–1111(February), 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.02.006>
- Kesisoglou, F., Panmai, S., & Wu, Y. (2007). Nanosizing - Oral formulation development and biopharmaceutical evaluation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(7), 631–644. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.05.003>
- Khan, M. S. A., Ahmad, I., & Chattopadhyay, D. (2019). New Look to Phytomedicine Advancements in Herbal Products as Novel Drug Leads. In *New Look to Phytomedicine* (1st ed.). <https://doi.org/10.1016/C2017-0-01165-5>
- Kiani, S., van Ruth, S. M., Minaei, S., & Varnamkhastid, M. G. (2018). Hyperspectral imaging, a non-destructive technique in medicinal and aromatic plant products industry: Current status and potential future applications. *Computers and Electronics in Agriculture*, 152(July 2017), 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2018.06.025>
- Kollipara, S., & Gandhi, R. K. (2014). Pharmacokinetic aspects and in vitro–in

vivo correlation potential for lipid-based formulations. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 4(5), 333–349. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2014.09.001>

Kumar, M., Rawat, S., Nagar, B., Kumar, A., Pala, N. A., Bhat, J. A., ... Kunwar, R. (2021). Implementation of the Use of Ethnomedicinal Plants for Curing Diseases in the Indian Himalayas and Its Role in Sustainability of Livelihoods and Socioeconomic Development. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(4), 1509. <https://doi.org/10.3390/ijerph18041509>

Kumar, P., & Singh, C. (2013). A Study on Solubility Enhancement Methods for Poorly Water Soluble Drugs. *American Journal of Pharmacological Sciences*, 1(4), 67–73. <https://doi.org/10.12691/ajps-1-4-5>

Laothaweerungsawat, N., Neimkhum, W., Anuchapreeda, S., Sirithunyalug, J., & Chaiyana, W. (2020). Transdermal delivery enhancement of carvacrol from *Origanum vulgare* L. essential oil by microemulsion. *International Journal of Pharmaceutics*, 579(October 2019), 119052. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119052>

Lau, C. B. S., Yue, G. G. L., Lau, K. M., Chan, Y. Y., Shaw, P. C., Kwok, H. F., & Wong, L. S. (2019). Method establishment for upgrading chemical markers in pharmacopoeia to bioactive markers for biological standardization of traditional Chinese medicine. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 9(3), 179–183. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2018.09.003>

Li, N., Chen, G., Liu, F., Mao, S., Liu, Y., Liu, S., & Mao, Z. (2020). Associations between long-term exposure to air pollution and blood pressure and effect modifications by behavioral factors. *Environmental Research*, 182(October 2019), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.109109>

Li, S., Han, Q., Qiao, C., Song, J., Cheng, C. L., & Xu, H. (2008). Chemical markers for the quality control of herbal medicines: An overview. *Chinese Medicine*, 3, 1–16. <https://doi.org/10.1186/1749-8546-3-7>

Li, Yanqun, Kong, D., Fu, Y., Sussman, M. R., & Wu, H. (2020). The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in

medicinal plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 148(December 2019), 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.01.006>

Li, Yaolei, Ju, S., Lin, Z., Wu, H., Wang, Y., Jin, H., ... Zhang, B. (2022). Bioactive-Chemical Quality Markers Revealed: An Integrated Strategy for Quality Control of Chicory. *Frontiers in Nutrition*, 9(July), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.934176>

Liu, B., & Hu, X. (2019). Hollow Micro- and Nanomaterials: Synthesis and Applications. In *Advanced Nanomaterials for Pollutant Sensing and Environmental Catalysis*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814796-2.00001-0>

Luna-Vázquez, F. J., Ibarra-Alvarado, C., Rojas-Molina, A., Rojas-Molina, J. I., Yahia, E. M., Rivera-Pastrana, D. M., ... Zavala-Sánchez, M. Á. (2013). Nutraceutical value of black cherry *Prunus serotina* Ehrh. Fruits: Antioxidant and antihypertensive properties. *Molecules*, 18(12), 14597–14612. <https://doi.org/10.3390/molecules181214597>

Mahajan, M., Kuiry, R., & Pal, P. K. (2020). Understanding the consequence of environmental stress for accumulation of secondary metabolites in medicinal and aromatic plants. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 18(April), 100255. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2020.100255>

Manzon, D., Claeys-Bruno, M., Declomesnil, S., Carite, C., & Sergent, M. (2020). Quality by Design: Comparison of Design Space construction methods in the case of Design of Experiments. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 200(October 2019), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2020.104002>

Mata, R., Figueroa, M., Navarrete, A., & Rivero-Cruz, I. (2019). Chemistry and Biology of Selected Mexican Medicinal Plants. In *Progress in the chemistry of organic natural products* (Vol. 108). https://doi.org/10.1007/978-3-030-01099-7_1

Mcchesney, J., Jinhui, D., & Harrington, P. (2019). The Development of Botanical Drugs – A Review. *Pharmaceutical Regulatory Affairs*, 8(2), 1–9.

- Mehmood, Z., Khan, M. S., Qais, F. A., Samreen, & Ahmad, I. (2019). Herb and Modern Drug Interactions. In *New Look to Phytomedicine* (pp. 503–520). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814619-4.00019-7>
- Miao, Y., Zhao, S., Zuo, J., Sun, J., & Wang, J. (2022). Reduced the Food Effect and Enhanced the Oral Bioavailability of Ivacaftor by Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System (SNEDDS) Using a New Oil Phase. *Drug Design, Development and Therapy*, 16(May), 1531–1546. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S356967>
- Molina-Torres, J., Salazar-Cabrera, C. J., Armenta-Salinas, C., & Ramírez-Chávez, E. (2004). Fungistatic and Bacteriostatic Activities of Alkamides from *Heliopsis longipes* Roots: Affinin and Reduced Amides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15), 4700–4704. <https://doi.org/10.1021/jf034374y>
- Moraes, J. D. D., Bertolino, S. R. A., Cuffini, S. L., Ducart, D. F., Bretzke, P. E., & Leonardi, G. R. (2017). Clay minerals: Properties and applications to dermocosmetic products and perspectives of natural raw materials for therapeutic purposes—A review. *International Journal of Pharmaceutics*, 534(1–2), 213–219. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.10.031>
- Morales Florido, M. I. (2018). *Desarrollo de un Sistema Autoemulsificable para Administración de Fármacos (SEDDS) que incremente la solubilidad de Enrofloxacin para su administración oral*. (Universidad Autónoma Metropolitana). <https://doi.org/10.1056/nejmoa1407279>
- Morales, M., & Morales, J. (2009). *Plantas medicinales , fitofarmacos y fitomedicamentos : hacia una fitomedicina basada en la evidencia científica* (p. 14). p. 14. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/281747269_Plantas_medicinales_fitofarmacos_y_fitomedicamentos_hacia_una_fitomedicina_basada_en_la_evidencia_cientifica
- Mukherjee, P. K., Harwansh, R. K., Bahadur, S., Duraipandiyar, V., & Al-Dhabi, N. A. (2017). Factors to Consider in Development of Nutraceutical and

Dietary Supplements. In *Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategy* (pp. 653–661). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802104-0.00034-2>

Mulet, X., Boyd, B. J., & Drummond, C. J. (2013). Advances in drug delivery and medical imaging using colloidal lyotropic liquid crystalline dispersions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 393(1), 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2012.10.014>

Myemba, D. T., Bwire, G. M., & Sangeda, R. Z. (2022). Microbiological Quality of Selected Local and Imported Non-Sterile Pharmaceutical Products in Dar es Salaam, Tanzania. *Infection and Drug Resistance*, 15(April), 2021–2034. <https://doi.org/10.2147/IDR.S355331>

NCHS. (2020). *National Center for Health Statistics: National Health and Nutrition Examination Survey 2020*. (July), 2017–2018.

Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2016). Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, 79(3), 629–661. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>

Nguyen, T. N., & Chow, C. K. (2021). Global and national high blood pressure burden and control. *The Lancet*, 398(10304), 932–933. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)01688-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)01688-3)

Nom--ssa-, N. O. M. (2015). *BUENAS PRÁCTICAS DE FABRICACIÓN DE MEDICAMENTOS* (pp. 1–3). pp. 1–3.

NOM-059-SSA1. (2015). Buenas prácticas de fabricación de medicamentos.

NOM-072-SSA1. (2012). Etiquetado de medicamentos y de remedios herbolarios. *Diario Oficial de La Federación*. Retrieved from https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5278341&fecha=21/11/2012

NOM-073-SSA1. (2015a). Estabilidad de fármacos y medicamentos, así como de remedios herbolarios.

- NOM-073-SSA1. (2015b). Estabilidad de fármacos y medicamentos, así como de remedios herbolarios. *DOF - Diario Oficial de La Federación* 5002338, 1–14. Retrieved from https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/170592/NOM-040-NUCL-2016_4ago2016.pdf
- NOM-092-SSA1-1994. (1995). Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. *DOF - Diario Oficial de La Federación*, (62), 6500.
- NOM-111-SSA1-1994. (1995). Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. *DOF - Diario Oficial de La Federación*, (62), 6500.
- NOM-210-SSA1-2014. (2015). Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos. *DOF - Diario Oficial de La Federación*, 480.
- NOM-248-SSA1. (2011). Buenas prácticas de fabricación para establecimientos dedicados a la fabricación de remedios herbolarios.
- OECD. (1995). Water Solubility. *Guideline for Testing of Chemicals*, (July), 1–7. <https://doi.org/10.1787/9789264070684-en>
- OECD. (2019). Health at a Glance 2019. In *Health at a Glance 2019*. <https://doi.org/10.1787/9789264055896-ko>
- Olmos Cruz, A., Carreto Bernal, F., Reyes Torres, C., & Pérez Alcántara, B. D. (2018). *Tendencias Y Retos De La Geografía En América Latina En El Siglo Xxi: Una Perspectiva Desde El Vii Cgal* (U. A. del E. México, Ed.).
- OMS. (2000). *Pautas generales para las metodologías de investigación y evaluación de la medicina tradicional*.
- OMS. (2013). *Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 1014-2023*.
- OMS. (2022). WHO establishes the Global Centre for Traditional Medicine in

India.

OMS. (2023). Hypertension. *Organización Mundial de La Salud*, 2023.

Organización Mundial de la Salud. (2013). Información general sobre la hipertension en el mundo. Una enfermedad que mata en silencio, una crisis de salud pública mundial. *Oms*, 1–39. Retrieved from http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/87679/1/WHO_DCO_WHD_2013.2_spa.pdf

Osakwe, O. (2016). Preclinical In Vitro Studies : Development and Applicability. In *Social Aspects of Drug Discovery, Development and Commercialization*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802220-7/00006-5>

Ott, C., & Schmieder, R. E. (2022). Diagnosis and treatment of arterial hypertension 2021. *Kidney International*, 101(1), 36–46. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2021.09.026>

Pandey, A. K., Kumar, P., Saxena, M. J., & Maurya, P. (2020). Distribution of aromatic plants in the world and their properties. In *Feed Additives* (pp. 89–114). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814700-9.00006-6>

Park, S. H., Hong, C. R., & Choi, S. J. (2020). Prevention of Ostwald ripening in orange oil emulsions: Impact of surfactant type and Ostwald ripening inhibitor type. *Lwt*, 134(September), 110180. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110180>

Patil, K. R., Mahajan, U. B., Unger, B. S., Goyal, S. N., Belemkar, S., Surana, S. J., ... Patil, C. R. (2019). Animal Models of Inflammation for Screening of Anti-inflammatory Drugs: Implications for the Discovery and Development of Phytopharmaceuticals. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), 1–38. <https://doi.org/10.3390/ijms20184367>

Paulina, L., Elzbieta, M., Anna, T., Banach, M., & Jolanta, M. (2018). Adhering to the principles of clinical pharmacology - The Correct Fixed Combinations of Antihypertensive Drugs. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 11(2), 165–170. <https://doi.org/10.1080/17512433.2018.1412826>

- Pistoia, F., Sacco, S., Degan, D., Tiseo, C., Ornello, R., & Carolei, A. (2016). Hypertension and Stroke: Epidemiological Aspects and Clinical Evaluation. *High Blood Pressure and Cardiovascular Prevention*, 23(1), 9–18. <https://doi.org/10.1007/s40292-015-0115-2>
- Piszczek, P., Kuszewska, K., Błaszowski, J., Sochacka-Obruśnik, A., Stojakowska, A., & Zubek, S. (2019). Associations between root-inhabiting fungi and 40 species of medicinal plants with potential applications in the pharmaceutical and biotechnological industries. *Applied Soil Ecology*, 137(February), 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.01.018>
- Pouton, C. W. (2000). Lipid formulations for oral administration of drugs: Non-emulsifying, self-emulsifying and “self-microemulsifying” drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11(SUPPL. 2), 93–98. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(00\)00167-6](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(00)00167-6)
- Pouton, C. W. (2006). Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: Physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 29(3-4 SPEC. ISS.), 278–287. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2006.04.016>
- Pouton, C. W., & Porter, C. J. H. (2008). Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: Materials, methods and strategies. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(6), 625–637. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.10.010>
- Quirino-Barreda, C. T., Gazga-Urioste, C., Juárez-Sandoval, J. J., Faustino-Vega, A., Noguez-Méndez, N. A., Macín-Cabrera, S. A., & Melo-Ruíz, V. E. (2017). Cristales líquidos liotrópicos. Nanoestructuras biomiméticas para uso tópico medicinal. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria En Nanociencia y Nanotecnología*, 10(19), 7–25. <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2017.19.57559>
- Rahman, M. S., Hasan, M. S., Nitai, A. S., Nam, S., Karmakar, A. K., Ahsan, M. S., ... Ahmed, M. B. (2021). Recent developments of carboxymethyl

cellulose. *Polymers*, 13(8). <https://doi.org/10.3390/polym13081345>

Rai, G. S., & Rozario, C. J. (2023). Anaesthesia & Intensive Care Medicine Mechanisms of drug interactions II: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 24(4), 217–220. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mpaic.2023.01.001>

Raposo, F., & Ibelli-Bianco, C. (2020). Performance parameters for analytical method validation: Controversies and discrepancies among numerous guidelines. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 129, 115913. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115913>

Raw, A. S., Furness, M. S., Gill, D. S., Adams, R. C., Holcombe, F. O., & Yu, L. X. (2004). Regulatory considerations of pharmaceutical solid polymorphism in Abbreviated New Drug Applications (ANDAs). *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(3), 397–414. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.10.011>

Rios, Alvaro, Alanis, Glafiro, Favela, S. (2017). Etnobotánica de los recursos vegetales, sus formas de uso y manejo, en Bustamante, Nuevo León. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 8(44), 23.

Rios, M. Y., Aguilar-Guadarrama, A. B., & Gutiérrez, M. del C. (2007). Analgesic activity of affinin, an alkamide from *Heliopsis longipes* (Compositae). *Journal of Ethnopharmacology*, 110(2), 364–367. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.09.041>

Rivera-Mondragón, A., Ortiz, O. O., Bijttebier, S., Vlietinck, A., Apers, S., Pieters, L., & Caballero-George, C. (2017). Selection of chemical markers for the quality control of medicinal plants of the genus *Cecropia*. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 1500–1512. <https://doi.org/10.1080/13880209.2017.1307421>

Rochlani, Y., Khan, M. H., Banach, M., & Wilbert, S. (2017). Are two drugs better than one? a review of combination therapies for hypertension. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 18(4), 377–386. <https://doi.org/10.1080/14656566.2017.1288719>

Rosa-Lugo, V., Acevedo-Quiroz, M., Déciga-Campos, M., & Rios, M. Y. (2017).

- Antinociceptive effect of natural and synthetic alkamides involves TRPV1 receptors. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 69(7), 884–895. <https://doi.org/10.1111/jphp.12721>
- Rossier, B. C., Bochud, M., & Devuyst, O. (2017). The hypertension pandemic: An evolutionary perspective. *Physiology*, 32(2), 112–125. <https://doi.org/10.1152/physiol.00026.2016>
- Rouzaud-laborde, C., Lafitte, P., Balardy, L., Czosnyka, Z., & Schmidt, E. A. (2018). ICP and Antihypertensive Drugs. *Acta Neurochirurgica Supplement*, 126, 163–165.
- Ruilope, L. M., Chagas, A. C. P., Brandão, A. A., Gómez-Berroterán, R., Alcalá, J. J. A., Paris, J. V., & Cerda, J. J. O. (2017). Hipertensión en América Latina: perspectivas actuales de las tendencias y características. *Hipertension y Riesgo Vascular*, 34(1), 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.hipert.2016.11.005>
- Salud, S. de. (1999). *Ley General de Salud*.
- SAMINENI, R., CHIMAKURTHY, J., & KONIDALA, S. (2022). Emerging Role of Biopharmaceutical Classification and Biopharmaceutical Drug Disposition System in Dosage form Development: A Systematic Review. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 19(6), 706–713. <https://doi.org/10.4274/tjps.galenos.2021.73554>
- Sánchez-Tépoz, J. S., Juan Carlos Gallaga-Solórzano, Wynter, R. del C. A. E., & Zúñiga-Estrada, A. (2018). La regulación sanitaria en México: Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios. *Gaceta de México*, 154(3), 373–375. <https://doi.org/10.24875/gmm.18004351>
- Santos-Burgoa, C., Urbina-Fuentes, M., Rivera-Dommarco, J. Á., Híjar, M., Sánchez-Tépoz, J. S., Gallaga-Solórzano, J. C., ... Ariza, A. C. (2018). Desarrollo de la capacidad para la regulación en salud en México. *Gaceta de México*, 154(3), 368–390. <https://doi.org/10.24875/gmm.18004351>
- Sarma, S. S. S., Jiménez-Santos, M. A., & Nandini, S. (2021). Rotifer species diversity in Mexico: An updated checklist. *Diversity*, 13(7).

<https://doi.org/10.3390/d13070291>

- Savla, R., Browne, J., Plassat, V., Wasan, K. M., & Wasan, E. K. (2017). Review and analysis of FDA approved drugs using lipid-based formulations. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 43(11), 1743–1758. <https://doi.org/10.1080/03639045.2017.1342654>
- Seidel, V. (2020). Plant-derived chemicals: A source of inspiration for new drugs. *Plants*, 9(11), 1–3. <https://doi.org/10.3390/plants9111562>
- Shalaeva, E. V., & Messerli, F. H. (2023). What is resistant arterial hypertension? *Blood Pressure*, 32(1). <https://doi.org/10.1080/08037051.2023.2185457>
- Shanley, A. (2018). Pharmaceutical Technology. *Estrategias de Formulación En La Fase Temprana Del Desarrollo de Medicamentos*, 15(6). Retrieved from http://www.pharmatechespanol.com.mx/articulo/675.la_importancia_de_los_estudios_de_estabilidad_en_medicamentos?&show=1
- Shegokar, R. (2020). Preclinical testing — Understanding. In *Drug Delivery Aspects* (pp. 19–32). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821222-6.00002-6>
- Sheikhpour, M., Barani, L., & Kasaeian, A. (2017). Biomimetics in drug delivery systems: A critical review. *Journal of Controlled Release*, 253, 97–109. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.03.026>
- Shrestha, H., Bala, R., & Arora, S. (2014). Lipid-Based Drug Delivery Systems. *Journal of Pharmaceutics*, 2014, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2014/801820>
- Siew, A. (2017). Formulation strategies in early-stage drug development. *Pharmaceutical Technology*, 41(10), 20–27.
- Silva, F. C. da, Araújo, B. J. de, Cordeiro, C. S., Arruda, V. M., Faria, B. Q., Guerra, J. F. D. C., ... Fürstenau, C. R. (2022). Endothelial dysfunction due to the inhibition of the synthesis of nitric oxide: Proposal and characterization of an in vitro cellular model. *Frontiers in Physiology*, 13(November), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.978378>
- Singh, S., Dwivedi, R., & Chaturvedi, V. (2012). Influence of vehicles used for

oral dosing of test molecules on the progression of mycobacterium tuberculosis infection in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(11), 6026–6028. <https://doi.org/10.1128/AAC.01702-12>

Skaf, J., Hamarsheh, O., Berninger, M., Balasubramanian, S., Oelschlaeger, T. A., & Holzgrabe, U. (2018). Improving anti-trypanosomal activity of alkamides isolated from *Achillea fragrantissima*. *Fitoterapia*, 125(September 2017), 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2017.11.001>

Sulaiman, Shah, S., Khan, S., Hussain, D., & Hussain, W. (2020). Quantitative Ethnobotanical Study of Indigenous. *Plants*, 9(1001), 1–29.

Sun, D., Gao, W., Hu, H., & Zhou, S. (2022). Why 90% of clinical drug development fails and how to improve it? *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 12(7), 3049–3062. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2022.02.002>

Sun, H. J., Wu, Z. Y., Nie, X. W., & Bian, J. S. (2020). Role of endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: The link between inflammation and hydrogen sulfide. *Frontiers in Pharmacology*, 10(January), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01568>

Tabassum, N., & Ahmad, F. (2011). Role of natural herbs in the treatment of hypertension. *Pharmacognosy Reviews*, 5(9), 30–40. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.79097>

Tabuenca Navarro, D. (2014). Aplicación de la calidad integral al medicamento. *Academia de Farmacia “Reino de Aragón”. Colegio Oficial de Farmacéuticos de Zaragoza, España*, 50. Retrieved from <http://www.ub.edu/sdm/tertulies/PresentacionPPdef.pdf>

Talegaonkar, S., Mustafa, G., Akhter, S., & Iqbal, Z. I. (2010). Design and development of oral oil-in-water nanoemulsion formulation bearing atorvastatin: In vitro assessment. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 31(5), 690–701. <https://doi.org/10.1080/01932690903120540>

Thomford, N. E., Senthebane, D. A., Rowe, A., Munro, D., Seele, P., Maroyi, A., & Dzobo, K. (2018). Natural products for drug discovery in the 21st century:

Innovations for novel drug discovery. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6). <https://doi.org/10.3390/ijms19061578>

Thomsen, M. O., Christensen, L. P., & Grevsen, K. (2018). Harvest Strategies for Optimization of the Content of Bioactive Alkamides and Caffeic Acid Derivatives in Aerial Parts and in Roots of *Echinacea purpurea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(44), 11630–11639. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03420>

Tlili, N., & Sarikurkcu, C. (2020). Bioactive compounds profile, enzyme inhibitory and antioxidant activities of water extracts from five selected medicinal plants. *Industrial Crops and Products*, 151(December 2019), 112448. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112448>

Truzzi, F., Tibaldi, C., Zhang, Y., Dinelli, G., & D'Amen, E. (2021). An overview on dietary polyphenols and their biopharmaceutical classification system (Bcs). *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11). <https://doi.org/10.3390/ijms22115514>

Uritu, C. M., Mihai, C. T., Stanciu, G. D., Dodi, G., Alexa-Stratulat, T., Luca, A., ... Tamba, B. I. (2018). Medicinal plants of the family Lamiaceae in pain therapy: A review. *Pain Research and Management*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/7801543>

Vasisht, K., Sharma, N., & Karan, M. (2016). Current Perspective in the International Trade of Medicinal Plants Material: An Update. *Current Pharmaceutical Design*, Vol. 22, pp. 4288–4336. <https://doi.org/10.2174/1381612822666160607070736>

Veryser, L., Taevernier, L., Joshi, T., Tatke, P., Wynendaele, E., Bracke, N., ... Spiegeleer, B. De. (2016). Mucosal and blood-brain barrier transport kinetics of the plant N -alkylamide spilanthol using in vitro and in vivo models. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1159-0>

Veryser, L., Wynendaele, E., Taevernier, L., Verbeke, F., Joshi, T., Tatke, P., & de Spiegeleer, B. (2014). N-Alkylamides: From plant to brain. *Functional*

- Foods in Health and Disease*, 4(6), 264–275.
<https://doi.org/10.31989/ffhd.v4i6.6>
- Vidal, O., & Brusca, R. C. (2020). Mexico's biocultural diversity in peril. *Revista de Biología Tropical*, 68(2), 669–691.
<https://doi.org/10.15517/rbt.v68i2.40115>
- Villarreal, M. L., Cardoso-Taketa, A., Ortíz, A., & Sharma, A. (2014). Biotecnología para producir medicinas de plantas mexicanas. *Revista Digital Universitaria*, 15(8), 1–15. Retrieved from <http://www.revista.unam.mx/vol.15/num8/art62/%5CnBIOTECNOLOGIA>
- Visetvichaporn, V., Kim, K.-H., Jung, K., Cho, Y., & Kim, D. (2020). Formulation of self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) by D-optimal mixture design to enhance the oral bioavailability of a new cathepsin K inhibitor (HL235). *International Journal of Pharmaceutics*, 573(June), 118772. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118772>
- Wagner, H. (2011). Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Fitoterapia*, 82(1), 34–37.
<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.11.016>
- Wang, C. J., He, F., Huang, Y. F., Ma, H. L., Wang, Y. P., Cheng, C. S., ... Zhou, H. (2020). Discovery of chemical markers for identifying species, growth mode and production area of *Astragali Radix* by using ultra-high-performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Phytomedicine*, 67(December 2019), 153155.
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.153155>
- Wang, L., Yan, W., Tian, Y., Xue, H., Tang, J., & Zhang, L. (2020). Self-Microemulsifying Drug Delivery System of Phillygenin: Formulation Development, Characterization and Pharmacokinetic Evaluation. *Pharmaceutics*, 12(2), 130. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12020130>
- Wermelt, J. A., & Schunkert, H. (2017). Management der arteriellen Hypertonie. *CME Zertifizierte Fortbildung*, 42(5), 515–526.
<https://doi.org/10.1007/s00059-017-4574-1>

- Williams, H. D., Trevaskis, N. L., Charman, S. A., Shanker, R. M., Charman, W. N., Pouton, C. W., & Porter, C. J. H. (2013). Strategies to address low drug solubility in discovery and development. *Pharmacological Reviews*, *65*(1), 315–499. <https://doi.org/10.1124/pr.112.005660>
- Williams, H. D., Trevaskis, N. L., Yeap, Y. Y., Anby, M. U., Pouton, C. W., & Porter, C. J. H. (2013). Lipid-Based Formulations and Drug Supersaturation: Harnessing the Unique Benefits of the Lipid Digestion/Absorption Pathway. *Pharmaceutical Research*, *30*(12), 2976–2992. <https://doi.org/10.1007/s11095-013-1126-0>
- Willig, J. B., Salomón, J. L. d. O., Vianna, D. R. B., Moura, S., Pilger, D. A., Buffon, A., & Konrath, E. L. (2019). *Heliopsis longipes* S.F. Blake (Asteraceae) extract causes cell cycle arrest and induces caspase dependent apoptosis against cancer cell lines. *South African Journal of Botany*, *125*, 251–260. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.07.035>
- Woelkart, K., Dittrich, P., Beubler, E., Pinl, F., Schoop, R., Suter, A., & Bauer, R. (2008). Pharmacokinetics of the main alkamides after administration of three different *Echinacea purpurea* preparations in humans. *Planta Medica*, *74*(6), 651–656. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1034284>
- Wolk, O., Agbaria, R., & Dahan, A. (2014). Provisional in-silico biopharmaceutics classification (BCS) to guide oral drug product development. *Drug Design, Development and Therapy*, *8*, 1563–1575. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S68909>
- Wongsawatkul, O., Prachayasittikul, S., Isarankura-na-ayudhya, C., Satayavivad, J., Ruchirawat, S., & Prachayasittikul, V. (2008). Vasorelaxant and Antioxidant Activities of *Spilanthes acmella*. *International Journal of Molecular Sciences*, *9*, 2724–2744. <https://doi.org/10.3390/ijms9122724>
- Wu, C., Lee, S. L., Taylor, C., Li, J., Chan, Y. M., Agarwal, R., ... Tyner, K. (2020). Scientific and Regulatory Approach to Botanical Drug Development: A U.S. FDA Perspective. *Journal of Natural Products*, *83*(2), 552–562. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00949>

- Yang, D., Li, W., Fang, L., & Liu, C. (2019a). Investigation of Controlled Release Molecular Mechanism of Oil Phase in Spilanthol Emulsion: Development and In Vitro, In Vivo Characterization. *AAPS PharmSciTech*, 20(6). <https://doi.org/10.1208/s12249-019-1454-4>
- Yang, D., Li, W., Fang, L., & Liu, C. (2019b). Investigation of Controlled Release Molecular Mechanism of Oil Phase in Spilanthol Emulsion: Development and In Vitro, In Vivo Characterization. *AAPS PharmSciTech*, 20(6), 1–10. <https://doi.org/10.1208/s12249-019-1454-4>
- Zhang, L., Luan, H., Lu, W., & Wang, H. (2020). Preformulation Studies and Enabling Formulation Selection for an Insoluble Compound at Preclinical Stage—From In Vitro, In Silico to In Vivo. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 109(2), 950–958. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.10.023>
- Zhao, J., Jiang, K., Chen, Y., Chen, J., Zheng, Y., Yu, H., & Zhu, J. (2020). Preparation and Characterization of Microemulsions Based on Antarctic Krill Oil. *Marine Drugs*, 18(10), 492. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/md18100492>
- Zhu, Z., Liu, J., Yang, Y., Adu-Frimpong, M., Ji, H., Toreniyazov, E., ... Xu, X. (2021). SMEDDS for improved oral bioavailability and anti-hyperuricemic activity of licochalcone A. *Journal of Microencapsulation*, 38(7–8), 459–471. <https://doi.org/10.1080/02652048.2021.1963341>

ANEXOS

Anexo 1. Listado de reactivos químicos y disolventes utilizados para el desarrollo y análisis químico, farmacológico y preformulación del extracto cuantificado.

Nombre del reactivo	Marca	No. de catálogo	Grado
Agua	J.T Baker	4220-20	Reactivo
Alcohol etílico	Fermont	06063	Reactivo
Alcohol etílico	Fermont	H6122	HPLC
Agua	Fermont	H5052	HPLC
Acetonitrilo	Fermont	H6002	HPLC

Ácido acético	-	-	HPLC
Formalina (Buffer)	HYCEL	7935	Reactivo
n-octanol	-	-	Reactivo
Tween 80	HYCEL	-	Reactivo
Ácido clorhídrico fumante	J.T Baker	953502	Reactivo
Propilenglicol	Golden bell	-	Reactivo
Fosfato monobásico	-	-	Reactivo
Hidróxido de sodio	-	-	Reactivo
Transcutol	-	-	Reactivo
Labrasol	-	-	Reactivo
Labrafil	-	-	Reactivo

Anexo 2. Ecuaciones para determinar los parámetros estadísticos

Parámetro estadístico	Ecuación
Coeficiente de correlación (R)	$r = \sqrt{\frac{(n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y))^2}{((n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2))}}$
Coeficiente de determinación (r ²)	$r^2 = \frac{(n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y))^2}{((n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2))}}$
Coeficiente de variación (CV)	$CV = \frac{S}{y} * 100$

Coeficiente de variación de la regresión ($CV_{y/x}$)	$CV_{y/x} = \left(\frac{S_{y/x}}{\bar{y}} \right) * 100$
Desviación estándar (S)	$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$
Desviación estándar de la ordenada (S_{b_0})	$S_{b_0} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(\bar{x})^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$
Desviación estándar de la pendiente (S_{b_1})	$S_{b_1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$
Desviación estándar de la regresión ($S_{y/x}$)	$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n-2}}$
Diferencia absoluta de medias $ di $	$ di = \bar{y}_i - \bar{y}_0 $
Intervalo de confianza para la media poblacional $IC(\mu)$	$IC(\mu) = \bar{y} \pm t_{0,975,n-2} \frac{S}{\sqrt{n}}$
Intervalo de confianza para la ordenada al origen $IC(\beta_0)$	$IC(\beta_0) = b_0 \pm t_{0,975,n-2} S_{b_0}$
Intervalo de confianza para la pendiente $IC(\beta_1)$	$IC(\mu) = \bar{y} \pm t_{0,975,n-2} \frac{S}{\sqrt{n}}$
Límite de cuantificación (LC)	$LC = \frac{(10)(S_{y/x})}{b_1}$
Límite de detección (LD)	$LD = \frac{(3,3)(S_{y/x})}{b_1}$
Media aritmética $\bar{x}, \bar{y}, \bar{y}_1$	$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}, \bar{y} = \frac{\sum y}{n}, \bar{y}_i = \frac{\sum y_i}{n}$
Ordenada al origen (b_0)	$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$
Pendiente (b_1)	$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$

% de Recobro (%R)	$\%R = \frac{\text{Cantidad recuperada}}{\text{Cantidad adicionada}} * 100$
Factor de capacidad (k')	$k' = (C_S V_S) / (C_M V_M) = K V_S / V_M$
Número de platos teóricos (N _{ef})	$N_{ef} = L/H = (t'_R/\sigma)^2$

