



**UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
METROPOLITANA**
Unidad Xochimilco

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS**

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL ACEITE ESENCIAL
DE *Moringa oleifera***

SANDY CONTRERAS ROSALES

2143058871

ASESOR INTERNO: M. EN C. MA. LUISA DE LOURDES PÉREZ GONZÁLEZ

ASESOR EXTERNO: DR. IGNACIO GONZÁLEZ SÁNCHEZ

ENERO DE 2020

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

INFORME DE ACTIVIDADES DEL SERVICIO SOCIAL

“Evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de *Moringa oleifera*”

PERTENECE AL PROYECTO GENÉRICO

“Obtención de materias primas, principios activos, medicamentos y productos biológicos”

Alumno: Sandy Contreras Rosales

Matrícula: 2143058871

Asesor interno: M. en C. Ma. Luisa de Lourdes Pérez González

Asesor externo: Dr. Ignacio González Sánchez

Lugar de realización: Laboratorio de Dermatología Farmacéutica y Laboratorio de Síntesis y Aislamiento de Sustancias Bioactivas. Departamento de Sistemas Biológicos. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

Fecha de inicio y terminación: Del 12 de octubre de 2018 a 12 de abril de 2019.

Enero de 2020

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto está dedicado a mis padres, que todo el tiempo me apoyaron a lo largo de mi vida. Que siempre estuvieron ahí para ayudarme cuando más lo necesitaba, por alentarme a seguir adelante. Con todo mi corazón agradezco infinitamente todos los sacrificios que hicieron para poder apoyarme en esta parte de mi vida. A mi sobrina le agradezco sonreírme cuando no lo pedía, pero sí me hacía mucha falta. A mis hermanos y cuñados les agradezco aquellas palabras tan características de ustedes que me animaban a mejorar.

También agradezco ampliamente a la M. en C. María Luisa de Lourdes Pérez González que me permitió utilizar los insumos necesarios para poder realizar este proyecto. Muchas gracias por apoyarme en varios acontecimientos que han marcado mi vida. Le agradezco al Dr. Ignacio González Sánchez Catedrático CONACyT comisionado a la UAM-Xochimilco por otorgarme no sólo los insumos necesarios, sino también su tiempo y conocimiento para llevar a cabo las actividades necesarias. Muchas gracias por su infinita paciencia.

Quiero hacer una mención especial para el Dr. Abraham Faustino Vega y el Dr. Juan Francisco Palacios Espinosa por apoyarme con instalaciones, equipos y tiempo para completar la producción de la nanoemulsión y la extracción del aceite esencial, respectivamente.

Agradezco a la Universidad Autónoma Metropolitana por otorgarme la beca para realizar el servicio social y la tesina.

ÍNDICE

I. Lista de abreviaturas	I
II. Lista de Figuras	II
III. Lista de tablas	III
IV. Resumen	IV
1. Introducción	1
1.1 Piel	1
1.1.1 Permeación cutánea	3
1.1.1.1 Factores que limitan la absorción	3
1.2 Aceite esencial de <i>Moringa oleifera</i>	4
1.3 Nanoemulsiones	5
1.3.1 Métodos de obtención de nanoemulsiones	6
1.4 Evaluación de compuestos en modelos experimentales	7
2. Objetivos	9
2.1 General	9
2.2 Específicos	9
3. Metodología	10
3.1 Evaluación del método adecuado para la fabricación de la nanoemulsión o/w	10
3.2 Determinación de tamaño de partícula	11
3.3 Análisis de estabilidad	11
3.4 Extracción del aceite esencial de las semillas de <i>M. oleifera</i>	11
3.4.1 Densidad	12
3.5 Pruebas de citotoxicidad en líneas celulares	13
3.5.1 Desprendimiento de células y conteo celular	13
3.5.2 Ensayo de citotoxicidad del aceite esencial de las semillas de <i>M. oleifera</i> y de la nanoemulsión	14

3.6 Análisis estadístico	15
4. Resultados y discusión	16
4.1 Obtención la nanoemulsión o/w	16
4.1.1 Efecto de la homogeneización mecánica sobre el tamaño de partícula	19
4.1.2 Efecto de la sonicación sobre el tamaño de partícula	21
4.1.3 Selección del método de obtención y análisis de estabilidad	22
4.2 Rendimiento obtenido al extraer el aceite esencial de las semillas de <i>M. oleifera</i>	24
4.3 Determinación de la densidad del aceite esencial de las semillas de <i>M. oleifera</i>	24
4.4 Efecto del aceite esencial de las semillas de <i>M. oleifera</i> sobre la viabilidad de líneas celulares HaCaT y HeLa	24
4.5 Efecto de la nanoemulsión sobre la viabilidad de líneas celulares HaCaT y HeLa	28
4.5.1 Ensayo de tonicidad de la nanoemulsión como vehículo	30
5. Conclusiones	33
6. Referencias	34

I. Lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado	Abreviatura	Significado
° C	Grados celsius	LogP	Coefficiente de reparto octanol-agua
µg	microgramo	min	minuto
µL	microlitro	mL	mililitro
µM	micromolar	MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
ANOVA	Análisis de varianza	nm	nanómetro
CO₂	Dióxido de carbono	o/w	Aceite en agua
DMEM	Medio de Eagle Modificado por Dulbecco	PBS	Buffer fosfato salino
DMSO	Dimetilsulfóxido	rpm	Revoluciones por minuto
EDTA	Ácido etilendiamino-tetraacético	TH	Tiempo de homogeneización
g	gramo	TS	Tiempo de sonicación
h	hora	VC	Velocidad de corte
IC₅₀	Concentración inhibitoria 50	W/Kg	Vatios por kilogramo
L	litro	w/o	Agua en aceite

II. Lista de figuras

Figura 1. Efecto del aceite esencial de las semillas de <i>M. oleifera</i> sobre la viabilidad de células HaCaT después de 48 h de exposición	25
Figura 2. Efecto del aceite esencial de las semillas de <i>M. oleifera</i> sobre la viabilidad de células HeLa después de 48 h de exposición	26
Figura 3. Efecto del aceite esencial de las semillas de <i>M. oleifera</i> sobre la viabilidad de células HaCaT y células HeLa después de 48 h de exposición	28
Figura 4. Efecto de la nanoemulsión como vehículo sobre la viabilidad de células HaCaT y células HeLa después de 48 h de exposición	29
Figura 5. Ensayo de tonicidad	31

III. Lista de tablas

Tabla 1. pH del manto ácido de la piel en diferentes partes del cuerpo	1
Tabla 2. Formulaciones realizadas para determinar el método para obtener la nanoemulsión o/w del aceite esencial de <i>M. oleifera</i>	11
Tabla 3. Resultados de distribución de partículas obtenidos después de 24 h de su elaboración	17
Tabla 4. Efecto de la velocidad de corte sobre la variación en el tamaño de partícula de la nanoemulsión	19
Tabla 5. Efecto del tiempo de homogeneización sobre la variación en el tamaño de partícula de la nanoemulsión	20
Tabla 6. Efecto del uso de sonicación el tamaño de partícula de la nanoemulsión	21
Tabla 7. Efecto del tiempo de sonicación sobre la variación en el tamaño de partícula de la nanoemulsión	22
Tabla 8. Métodos monomodales	23
Tabla 9. Concentración inhibitoria 50 en células HaCaT y HeLa después de 48 h de exposición a la nanoemulsión	29

IV. Resumen

En estudios previos, se han reportado los beneficios que tiene el aceite esencial de las semillas de *Moringa oleifera* sobre la piel. Este trabajo tiene como objetivo estudiar la actividad citotóxica del aceite esencial de las semillas de *M. oleifera* y una nanoemulsión elaborada con ácido oleico. Para ello, se estudió el efecto de la homogeneización mecánica y el uso de sonicación para obtener una nanoemulsión estable. Por otra parte, se extrajo el aceite esencial de las semillas de *M. oleifera* mediante hidrodestilación. La actividad citotóxica de ambos productos se evaluó sobre las líneas celulares HaCaT y HeLa. Se encontró que la nanoemulsión de ácido oleico y Tween 80 disminuyó la viabilidad celular de las células HaCaT por debajo del 50 %. Además, se determinó que el aceite esencial de las semillas de *M. oleifera* no tuvo un efecto citotóxico considerable sobre los queratinocitos inmortalizados al probar una concentración de hasta 1 600 µg/mL. Los resultados sugieren que el aceite esencial de *M. oleifera* obtenido mediante la técnica de hidrodestilación puede ser adicionado como activo cosmético o excipiente para formulaciones administradas por vía tópica.

1. Introducción

Uno de los retos más difíciles de superar para la producción de formulaciones cosméticas y farmacéuticas es la inclusión de compuestos activos a estas. Como resultado, estos productos deben ser seguros, eficaces y con la calidad necesaria para su administración. La industria farmacéutica tiene la necesidad de obtener nuevas formas farmacéuticas que permitan liberar el ingrediente activo en la diana terapéutica con el fin de absorberse de manera adecuada y segura.

El objetivo de la industria cosmética es la manufactura de productos capaces de mejorar la higiene personal y la apariencia del consumidor. Para cumplir este objetivo elaboran formulaciones que deben administrarse por vía tópica, por lo tanto, se aplican en la piel y/o las mucosas.

1.1 Piel

La piel es el órgano más extenso del cuerpo, tiene un grosor que varía de 0.5 mm a 4 mm (Santos Ramos *et al.* 1994). Este órgano funge como barrera con el exterior ya que impide la entrada de agentes extraños además de evitar la pérdida de solutos. También protege las células de la piel de la radiación ultravioleta debido a la síntesis de melanina (Torres Lacomba *et al.* 2006). El crecimiento de microorganismo ajenos a la microbiota normal de piel es controlado por el manto ácido que posee (pH 4.1 – 5.8). La tabla 1 muestra el pH de acuerdo a su posición en el cuerpo (Proksch 2018).

Tabla 1. pH del manto ácido de la piel en diferentes partes del cuerpo.

Parte del cuerpo	pH
Barbilla	5.6
Frente	4.4
Parpado superior	4.6
Antebrazo, nariz, cuello y mejilla	4.4 – 4.6
Axilas, ingle e Inter dígitos del dedo del pie	6.1 – 7.4

Modificado de: Proksch, E, 2018.

La piel se divide en tres capas: A) epidermis, B) dermis e C) hipodermis, las cuales se diferencian por los conjuntos celulares que poseen.

A) Epidermis: Es la capa más externa de la piel, la cual está compuesta por células dendríticas y queratinocitos o células no dendríticas.

Los queratinocitos están organizados en cuatro o cinco estratos, los cuales se diferencian por su morfología (Burkhart *et al.* 2007; Saúl *et al.* 2015):

- *Estrato córneo:* Es un conjunto de células aplanadas y de apariencia amorfa. Estas tienden a desprenderse mediante el rompimiento de las estructuras que mantienen unidas a las células (desmosomas), los cuales se encuentran en la parte profunda de este estrato. Este estrato es capaz de mantener la piel hidratada y de permitir el paso de moléculas pequeñas debido al conjunto de células y compuestos lipídicos que lo conforman.
- *Lúcida:* Este estrato se encuentra en las palmas de las manos y las plantas de los pies. Actualmente se desconoce su función.
- *Granulosa:* Está compuesta por queratohialina, la cual es un precursor de la queratina. Su función principal es impedir la desintegración de la membrana plasmática de los queratinocitos que han muerto por apoptosis.
- *Espinal:* Contiene desmosomas que permiten el anclaje con capas o estratos adyacentes.
- *Basal:* Este estrato es el más profundo de las células no dendríticas. En ella se originan los queratinocitos (queratopoyesis), lo que permite regenerar, reparar y mantener la piel, además contiene melanina. Los hemidesmosomas presentes en este estrato permiten anclar la epidermis a la dermis.

Las células dendríticas están conformadas por melanocitos o células de Mansson, células de Langerhans, misma que generan una respuesta inmune de

hipersensibilidad u otras reacciones, y células de Merkel, las cuales están relacionadas con la percepción táctil (Castell Rodríguez *et al.* 2013).

B) Dermis: Está capa se compone de fibras colágenas, elásticas y reticulares que le brindan a la piel elasticidad y plasticidad. También tiene terminaciones nerviosas que le permiten recibir estímulos. Además de contener mastocitos y fibroblastos (Navarrete Franco 2003).

C) Hipodermis: También conocido como tejido subcutáneo, está compuesta por adipocitos (Navarrete Franco 2003).

1.1.1 Permeación cutánea

La industria cosmética aprovecha la estructura de la piel para fabricar productos que pueda tener efecto más allá de epidermis. Por lo que actualmente se conocen dos vías por las cuales atraviesan los activos para llegar a su diana de acción (Badía Vila *et al.* 2012):

- Vía transepidérmica: La absorción se da a través de la piel, sin embargo, la misma es limitada por el estrato córneo
- Vía transapendicular o transanexial: La absorción se da a través de los folículos pilosebáceos o glándulas sudoríparas

1.1.1.1 Factores que limitan la absorción

Para que un compuesto pueda ser administrado por vía tópica y que ejerza su acción, es necesario tomar en cuenta tres elementos importantes: la piel, la forma farmacéutica y el ingrediente activo.

La piel, al ser una barrera, determina el grado de absorción de los compuestos, sin embargo, existen otros factores que limitan o potencian la absorción de compuestos activos. La temperatura aumenta la absorción de moléculas al dilatar los capilares de la piel. Mientras que el grado de hidratación de la piel es directamente

proporcional a la absorción de ingredientes activos (Torres Lacomba *et al.* 2006; Badía Vila *et al.* 2012).

También se deben tomar en cuenta las características de la forma farmacéutica y las propiedades fisicoquímicas del ingrediente activo al momento de fabricar un producto, pues esto determinará la velocidad de liberación del compuesto y la facilidad para atravesar el estrato córneo.

El coeficiente de reparto octanol-agua (LogP) indica si un compuesto es lipofílico o hidrofílico, por lo que aquellos compuestos con un LogP elevado tendrán la capacidad de atravesar el estrato córneo con facilidad, debido a su naturaleza lipofílica y a su apolaridad. El grado de ionización del ingrediente activo determina la fracción de fármaco que podrá atravesar el estrato córneo, ya que la fracción no ionizada es liposoluble. Por otro lado, la afinidad del ingrediente activo al vehículo determinara la liberación del mismo; de esta forma la absorción será más rápida con emulsiones, seguido de soluciones y geles, mientras que en las suspensiones y los sólidos la absorción será menor (Santos Ramos *et al.* 1994; García-Delgado *et al.* 2004). Por su naturaleza lipofílica, los aceites pueden absorberse a través de piel de manera eficiente.

1.2 Aceite esencial de las semillas de *Moringa oleifera*

Actualmente, las investigaciones para encontrar nuevas moléculas activas se han centrado en el estudio de los productos naturales debido a las propiedades benéficas que tienen sobre las moléculas convencionales.

La *Moringa oleifera* es un árbol nativo de India y África que ha llamado la atención de la industria cosmética debido a sus propiedades humectantes y antioxidantes. En la cultura popular, así como en diferentes industrias, se utilizan las raíces, hojas, flores, vainas verdes y semillas debido a su alto valor nutricional y a los beneficios que posee (Amaglo *et al.* 2010).

Las propiedades benéficas de las semillas se deben a la composición química de estas. Algunos estudios reportan que cada 100 g de materia está compuesta por alrededor de 38 g de compuestos oleosos, 36 g son proteínas, mientras que aproximadamente 12 g son carbohidratos y fibra. Además, contiene taninos, saponinas, compuestos fenólicos, fitatos, flavonoides, terpenoides y lectina, además de vitaminas y minerales (Gopalakrishnan *et al.* 2016).

El aceite esencial de las semillas de *M. oleifera* es descrito como un líquido, a temperatura ambiente, de color amarillo dorado. Puede ser extraído con ayuda de una prensa o mediante el uso de disolventes (Leone *et al.* 2016). Hasta el momento, no se ha reportado que el tipo de extracción afecte la composición de ácidos grasos del aceite, pero sí en el rendimiento obtenido. Dicho aceite presenta una densidad aproximada de 0.901 g/mL a 24 °C. Su índice de refracción se encuentra alrededor de 1.460 a 40 °C y su viscosidad se halla cerca de 64.7 mPaxs (Leone *et al.* 2016).

El extracto oleoso de las semillas está compuesto principalmente por ácido oleico, que representa 65.7 % de los ácidos grasos extraídos. Sin embargo, también contiene otros aceites como: ácido behénico, ácido esteárico, ácido palmítico, entre otros. La composición lipídica aceite esencial de las semillas de *M. oleifera* puede reparar tejidos dañados, fungir como antioxidante y humectante, además permite potenciar la absorción (Vermaak *et al.* 2011; Paniagua *et al.* 2016). Debido a sus múltiples beneficios, el aceite de las semillas de *M. oleifera* resulta útil para la formulación de dermofarmacéuticos o cosméticos que puedan ser administrados por vía tópica.

1.3 Nanoemulsiones

Los aceites esenciales, incluyendo el aceite esencial de las semillas de *M. oleifera*, pueden incluirse en formulaciones completa o parcialmente oleosas, como las nanoemulsiones. Las nanoemulsiones son dispersiones de dos líquidos inmiscibles entre sí, donde uno de los líquidos se encuentra dispersó en el otro formando una fase discontinua y una fase continúa respectivamente. Esta dispersión se origina

por la acción de uno o más tensoactivos que permiten reducir la tensión interfacial entre ambos líquidos para obtener una fase homogénea o emulsión. Estas formulaciones se caracterizan por ser cinéticamente estables pero termodinámicamente inestables (Kesrevani *et al.* 2016). Además, el tamaño de partícula de las nanoemulsiones debe ser mayor a 10 nm pero menor o igual a 500 nm (Badruddoza *et al.* 2018).

Estos sistemas se pueden clasificar con base en la composición de cada una de sus fases, por lo que se pueden formar tres tipos de nanoemulsiones (Jaiswal *et al.* 2015):

- *Aceite en agua (o/w)*: En estas formulaciones, la fase discontinua es de naturaleza oleosa mientras que la fase continua es acuosa.
- *Agua en aceite (w/o)*: La fase acuosa se encuentra dispersa en la fase oleosa.
- *Bi-Continuas*: En estas, los micro-dominios de ambas fases se encuentran dispersos en el sistema.

Las nanoemulsiones pueden administrarse por vía oral, tópica, parenteral, entre otras rutas. Estas formulaciones son capaces de mejorar la biodisponibilidad del fármaco y aumentar la absorción de las formulaciones en la piel (Kesrevani *et al.* 2016).

1.3.1 Métodos de obtención de nanoemulsiones

Una nanoemulsión puede obtenerse mediante métodos de alta energía o de alta energía dependiendo de las características de los excipientes y del compuesto activo.

- *Métodos de alta energía*: Tienden a gastar aproximadamente 10^8 a 10^{10} W/Kg para disminuir el tamaño de las gotas de la nanoemulsión. Al utilizar estos métodos la distribución del tamaño de partícula dependerá de la tensión

interfacial, la viscosidad y la densidad de ambas fases. Los métodos de alta energía más utilizados son la homogeneización de alta presión, la microfluidización y la sonicación.

En la homogeneización de alta presión la disminución del tamaño de partícula se debe a que la mezcla pasa a través del orificio del vástago a alta presión lo que somete a las gotas a una intensa turbulencia y a una gran fuerza de corte. La microfluidización, al igual que en el caso anterior, se somete a una gran fuerza de corte cuando pasa a través de microcanales. En el caso de la sonicación, la cavitación forma una turbulencia que rompe las gotas de la emulsión (Jafari 2017; Jasmina *et al.* 2017).

- *Métodos de baja energía:* Gastan aproximadamente 10^3 a 10^5 W/Kg. Estos métodos someten al sistema a una inversión de fases en respuesta a cambios en la composición o temperatura, atravesando un estado de baja tensión interfacial lo que origina la disminución de la fase discontinua. La temperatura de inversión de fase y el punto de inversión de fase, son los métodos de baja energía más utilizados.

En el primer caso, la emulsión se prepara por encima de su temperatura de inversión de fase. Al enfriarse y pasar por esta temperatura la emulsión pasa de w/o a o/w. En el segundo caso, la emulsión se prepara a temperatura ambiente, para posteriormente diluirla con agua lo que provoca la inversión de fases al pasar por el punto de inversión (Jafari 2017; Jasmina *et al.* 2017).

1.4 Evaluación de compuestos en modelos experimentales

Para demostrar que una formulación es segura, es necesario realizar las pruebas pertinentes que permitan comprobarlo. Con este fin, se pueden realizar pruebas *in vitro* o *in vivo*.

Debido a cuestiones éticas, las pruebas *in vitro* se suelen realizar en primera instancia al probar sustancias desconocidas, o también se pueden utilizar como única herramienta para probar la seguridad de un determinado producto. Los cultivos celulares son una alternativa viable para estudiar la fisiología y la bioquímica de las células disminuyendo el sacrificio de animales. Estos métodos permiten obtener resultados reproducibles y válidos (Albarracín Serra *et al.* 2002).

Las pruebas *in vivo*, tal como su nombre lo implica, son ensayos que se realizan dentro de un animal vivo, o en su defecto, en el tejido de este. Estas pruebas se llevan a cabo durante los ensayos preclínicos. De manera contraria a los modelos *in vitro* que consisten en ensayos fuera del organismo (Martínez-Torres *et al.* 2016).

Las líneas celulares se caracterizan por proliferar de manera indefinida y tienen una alta homogeneidad celular permitiendo estudiar el efecto que tiene una sustancia sobre un determinado tipo de célula. Existen diversos tipos de líneas celulares, las cuales se pueden diferenciar por la especie de la que se obtiene, el origen del tejido, si provienen de células tumorales o si fueron transformadas para su inmortalización (Tavira Montalván *et al.* 2009). Las líneas celulares procedentes de las dermis son útiles para estudiar *in vitro* el efecto de una formulación cosmética o farmacéutica sobre un tipo de células de la piel.

La línea celular HaCaT son queratinocitos inmortalizados provenientes de piel humana (Boukamp *et al.* 1988), pueden ser utilizadas para estudiar los efectos de fármacos o cosméticos sobre un tipo de células de la piel. Por lo tanto, esta línea celular es adecuada para estudiar la citotoxicidad de una sustancia para uso cosmético. El grado de citotoxicidad de una sustancia está dada por su valor de concentración inhibitoria 50 (IC₅₀, por sus siglas en inglés, que es la concentración que disminuye la viabilidad celular en un 50 %); para determinar este valor es necesario establecer un intervalo de concentraciones (Novohradsky *et al.* 2014).

2. Objetivos

2.1 General

Evaluar la actividad citotóxica de una emulsión de aceite esencial de las semillas de *M. oleifera* en líneas celulares.

2.2 Específicos

- Obtener el aceite esencial de las semillas de *M. oleifera*.
- Formular una emulsión aceite en agua empleando el aceite esencial de las semillas de *M. oleifera*.
- Determinar la concentración inhibitoria 50 del aceite esencial de *M. oleifera* en las líneas celulares HaCaT y HeLa.
- Determinar la concentración inhibitoria 50 de la emulsión de aceite esencial de *M. oleifera* en las líneas celulares HaCaT y HeLa.

3. Metodología

3.1 Evaluación del método adecuado para la obtención de la nanoemulsión o/w

Para obtener una nanoemulsión, es necesario establecer un método que permita generar las nanopartículas deseadas. Por ello, se experimentó con dos métodos de alta energía: homogeneización mecánica y sonicación. Para este fin, se procedió de acuerdo a lo siguiente.

En cada uno de los experimentos se pesó 5 g de Tween 80 de Croda en un vaso de precipitado de 250 mL y se adicionó 93 mL de agua destilada, posteriormente, se agitó con ayuda de un magneto en un agitador múltiple marca IKA RO 5® durante 6 min. En seguida, se adicionó la fase acuosa sobre la fase oleosa para homogeneizarlos en el ULTRA-TURRAX® T 25 digital a 10 000, 5 000, 3 000 y 2 800 rpm durante 15, 10, 5, 2, 1 y 0.17 min a 25 °C ± 2 °C. Una vez que ambas fases se incorporaron, las formulaciones se sometieron a baño de hielo y se sonicaron con el equipo UP200Ht de Hielscher® por 15, 10 y 5 min en pulsos de 2.5 min de sonicación y 2.5 min de descanso a una amplitud del 50 % y ciclos del 100 %. En el método NENO-1 sólo se utilizó la homogeneización mecánica para obtener la nanoemulsión.

Se utilizaron varios métodos con el fin de determinar el impacto de la velocidad de corte, el tiempo de homogeneización, el uso de sonicador así como el tiempo de sonicación (ver tabla 2).

Tabla 2. Formulaciones realizadas para determinar el método para obtener la nanoemulsión o/w del aceite esencial de *M. oleifera*.

Método	VC (rpm)	TH (min)	TS (min)
NENO 01	10 000	15	NA
NENO 02	10 000	15	10
NENO 03	5 000	15	10
NENO 04	5 000	15	5
NENO 05	5 000	5	10
NENO 06	5 000	5	15
NENO 07	3 000	5	10
NENO 08	3 000	5	15
NENO 09	3 000	2	10
NENO 10	3 000	2	15
NENO 11	2 800	1	10
NENO 12	2 800	0.17	10

VC: Velocidad de corte. TH: Tiempo de homogeneización. TS: Tiempo de sonicación

3.2 Determinación de tamaño de partícula de las nanoemulsiones

Las formulaciones fueron caracterizadas mediante el tamaño de partícula. Para ello, se empleó el equipo HORIBA® Partica LA – 950V2, utilizando agua destilada como blanco y un índice de refracción de 1.6, el cual es el índice por defecto para emulsiones o/w. El tamaño de partícula de las muestras fue determinado 24 h después de su producción.

3.3 Análisis de estabilidad

Con el fin de analizar la estabilidad de las nanoemulsiones, se colocaron 20 mL de las formulaciones obtenidas con cada método en un frasco de vidrio y se cerró con una tapa de rosca. El frasco con nanoemulsión se dejó reposar durante 1 mes a temperatura ambiente en una gaveta. Después de un mes se observó si existió separación de fases o sedimentación inversa, también conocido como cremación (Robins 2000).

3.4 Extracción de aceite esencial de las semillas de *M. oleifera*

Para obtener el extracto oleoso de las semillas de *M. oleifera* se implementó el método de hidrodestilación (HD-UAMX).

Previo a la obtención se quitó la cascara de las semillas. Se utilizó el molino IKA M20® para pulverizar las semillas. Se pesó 286.6 g del polvo y se colocó en un matraz bola de 2 L con ayuda de un embudo. Se agregó 700 mL de agua destilada al matraz bola. Se montó el equipo para la hidrodestilación. La temperatura se mantuvo a 94 °C durante 4 h. Posteriormente se apagó el reóstato y se dejó enfriar a temperatura ambiente.

El aceite extraído fue decantado en un vaso de precipitado de 1 L dejando reposar por al menos 12 h. Se utilizó una micropipeta de 1 mL para separar la mayor parte del aceite, el cual se colocó en tubos eppendorf de 1.5 mL y se centrifugo a 12 000 rpm por 20 min. Se repitió el proceso para separar la fase oleoso con la ayuda de una micropipeta, así como el proceso de centrifugación. La fase oleosa se filtró a vacío utilizando sulfato de sodio anhidro para eliminar trazas de agua en el aceite esencial de las semillas de *M. oleifera*.

Se calculó el rendimiento obtenido mediante la siguiente formula:

$$\% \text{ de aceite} = \frac{\text{Peso del aceite obtenido} \times 100}{\text{Peso de polvo de semillas utilizadas}}$$

3.4.1 Densidad

La densidad es un parámetro que relaciona la masa y el volumen de un compuesto, esto permite identificar sustancias a través de esta relación.

Para determinar la densidad del aceite extraído, se utilizó un picnómetro de 10 mL. Se pesó el picnómetro vacío. Después, se llenó cuidadosamente con el extracto oleoso cuidando de no producir burbujas. Finalmente se pesó el picnómetro con el aceite. Se utilizó la siguiente ecuación para determinar la densidad relativa del aceite:

$$\delta = \frac{m \text{ del aceite} - m \text{ del picnómetro}}{m \text{ del agua} - m \text{ del picnómetro}}$$

Donde *m del aceite* es la masa obtenida al pesar el aceite con el picnómetro, *m del agua* es la masa del agua con el picnómetro y *m del picnómetro* es el peso del picnómetro vacío.

3.5 Pruebas de citotoxicidad en líneas celulares

Las pruebas de citotoxicidad se llevaron a cabo en las líneas celulares HaCaT (queratinocitos humanos inmortalizados) y HeLa (cáncer cérvico-uterino, como referencia), para lo cual las células fueron cultivadas en medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) y fueron incubadas a 37 °C en una atmosfera con 5 % de CO₂ y una humedad relativa del 90 %. La actividad citotóxica del aceite esencial de las semillas de *M. oleifera* se evaluó sobre la línea celular HaCaT y la línea celular HeLa. Para ello se utilizó bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT).

3.5.1 Desprendimiento de células y conteo celular

Antes del conteo celular fue necesario desprender las células de las placas de cultivo. Para ello, se descartó el medio de cultivo con ayuda de una micropipeta de 1 mL. Se agregó 3 mL de buffer fosfato salino con ácido etilendiaminotetraacético (PBS con EDTA 1 mM). Se incubó en condiciones de cultivo por 5 min. Posteriormente, se descartaron 2 mL de la solución de PBS con EDTA. El volumen restante de la solución se utilizó para desprender las células que aún quedaban adheridas a la placa.

Después de desprender todas las células con ayuda de una micropipeta, la suspensión celular se transfirió a un tubo de ensayo y se adicionó medio de cultivo para tenerlas en un medio con nutrientes y diluidas, con el fin de facilitar el conteo celular en la cámara de Neubauer.

Se preparó la cámara de Neubauer colocando encima un cubreobjetos sobre el área de conteo. A través del borde de los portaobjetos se adicionó 10 µL de la suspensión celular en cada lado de la cámara con ayuda de una micropipeta, llenando las áreas

de conteo por capilaridad. Se contaron las células viables de las dos zonas de conteo para linfocitos con el fin de determinar el número de células totales en el medio.

Considerando que la zona de conteo de linfocitos tiene un área de 1 mm^2 y una profundidad de 0.1 mm , esto sugiere que esta área contiene un volumen de 0.1 mm^3 o 10^{-4} mL . Con este razonamiento, se utilizó la siguiente ecuación para determinar el número de células:

$$\text{Número de células} = \bar{x} (\text{células}) \times \frac{1}{10^{-4} \text{ mL}}$$

Donde \bar{x} es el promedio de células contadas en los cuadrantes del área de conteo para linfocitos.

3.5.2 Ensayo de citotoxicidad del aceite esencial de las semillas de *M. oleifera* y de la nanoemulsión

Para evaluar la citotoxicidad del aceite esencial de *M. oleifera* diluido en dimetilsulfóxido (DMSO), se sembraron 7 000 células/pozo en $200 \mu\text{L}$ de medio de cultivo células de las líneas celulares HaCaT y HeLa en placas de 96 pozos. Los tratamientos fueron administrados de mayor a menor concentración. Se utilizó una fila como control de vehículo y una fila más como blanco para el lector de placas.

Las concentraciones estudiadas del aceite esencial de las semillas de *M. oleifera* comprendieron un rango de $400 \mu\text{g/mL}$ hasta $1600 \mu\text{g/mL}$. Para ello, se agregaron $50 \mu\text{L}$ del medio de cultivo con el tratamiento cinco veces más concentrado a seis pozos de una fila, administrando una concentración diferente a cada fila. Después de 48 h se determinó la viabilidad celular por el ensayo de MTT. Se determinó la densidad óptica utilizando el lector de placas Epoch 2® de Biotek® a una longitud de onda de 540 nm .

La citotoxicidad de la nanoemulsión se determinó de la misma manera.

Para ambos ensayos se empleó la siguiente ecuación para determinar el porcentaje de viabilidad.

$$\% Viabilidad = \frac{\text{Densidad óptica de células tratadas}}{\text{Densidad óptica de células control}} \times 100$$

3.6 Análisis estadístico

Los datos obtenidos durante la etapa experimental fueron analizados utilizando el programa estadístico Origin 7®. Este mismo programa fue utilizado para graficar la viabilidad celular en función de la concentración presentadas en este trabajo.

Durante el análisis de datos se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) de un factor para determinar si existía diferencia significativa entre los ensayos estudiados. Se utilizó un nivel de confianza del 95 %.

4. Resultados y discusión

4.1 Obtención de la nanoemulsión o/w

Para establecer el método adecuado para obtener la nanoemulsión a 500 nm (Badruddoza *et al.* 2018) se estudió el efecto de la velocidad de corte, el tiempo de homogenización, la sonicación y el tiempo de sonicación.

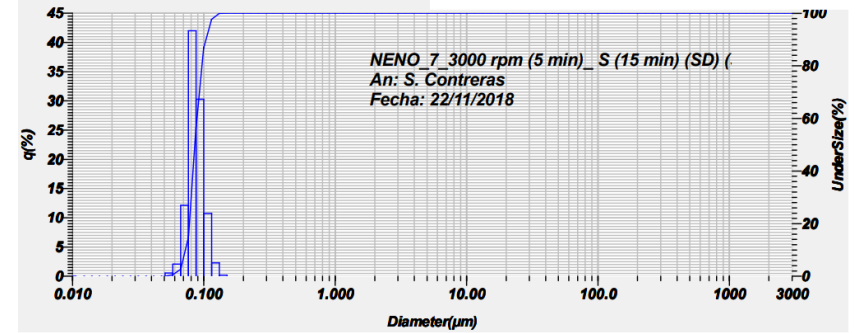
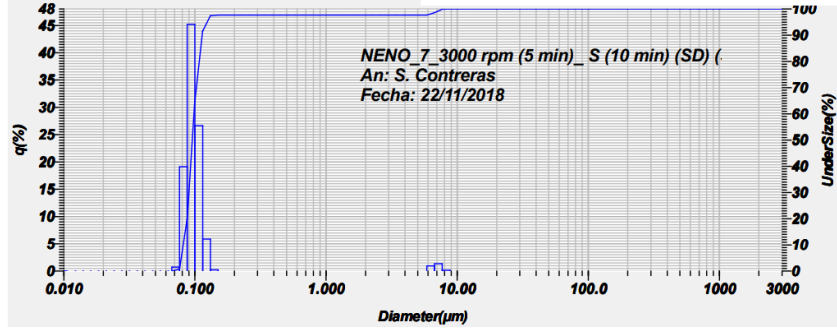
En la tabla 3 se encuentran los resultados de distribución del tamaño de partícula de acuerdo con el método utilizado. El factor de exclusión de métodos fue la presencia de dos o más poblaciones durante la determinación del tamaño de partícula. Los métodos se descartaron de manera inmediata y no se les realizó la prueba de estabilidad debido a que pueden provocar la desestabilización del sistema. Los métodos que se excluyeron fueron: el método NENO-1 a NENO-7, NENO-9, NENO-10 y NENO-12 que presentaron dos o más poblaciones (ver tabla 2).

En la tabla 3 se observar que los métodos NENO-1, NENO-4, NENO-6 y NENO-12 presentaron un diámetro medio de 672.52, 904.26, 1271.85 y 7703.10 nm respectivamente. El diámetro medio de estos métodos fue mayor a 500 nm. De la misma manera, los métodos NENO-4, NENO-6 y NENO-12 mostraron que el 90 % de las partículas tenían un diámetro mayor a 500 nm con un D_{90} de 670.80, 5921.83 y 28, 529.80 nm a diferencia de NENO-1 que presentó un D_{90} de 114.53 nm. Estos resultados difieren con el tamaño de partícula de las nanoemulsiones de 500 nm (Badruddoza *et al.* 2018)

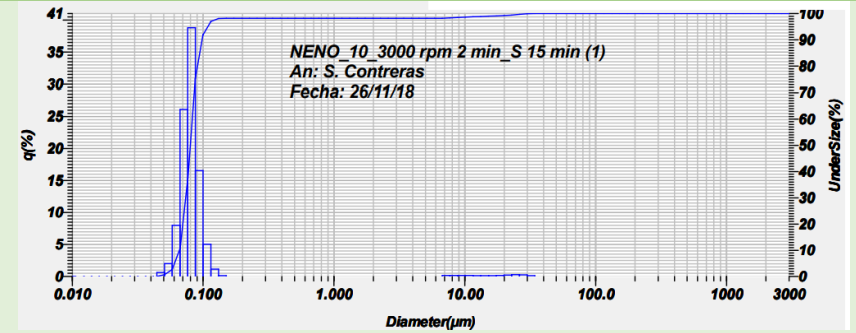
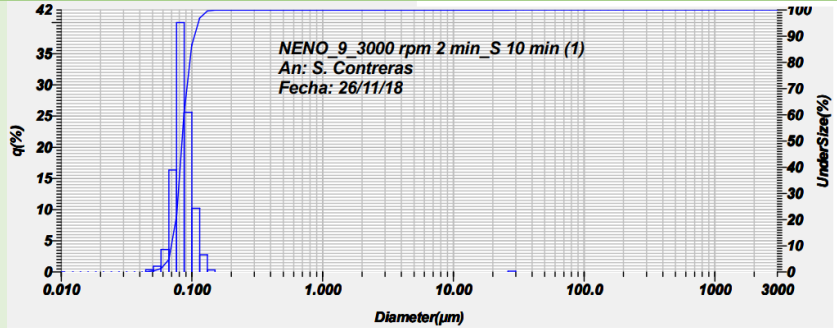
Tabla 3. Resultados de distribución de partículas obtenidos después de 24 h de su elaboración.

MT	#P	Media	Moda	D ₅₀	D ₉₀	TE	MT	#P	Media	Moda	D ₅₀	D ₉₀	TE
NENO-1	3	672.52	83.40	86.70	114.53	--	NENO-2	3	284.56	73.20	73.87	88.23	--
MT	#P	Media	Moda	D ₅₀	D ₉₀	TE	MT	#P	Media	Moda	D ₅₀	D ₉₀	TE
NENO-3	2	92.88	73.70	76.60	100.53	--	NENO-4	M	904.26	81.07	84.33	670.80	--
MT	#P	Media	Moda	D ₅₀	D ₉₀	TE	MT	#P	Media	Moda	D ₅₀	D ₉₀	TE
NENO-5	2	90.15	72.60	74.33	97.70	--	NENO-6	2	1271.85	69.70	71.47	5921.83	--

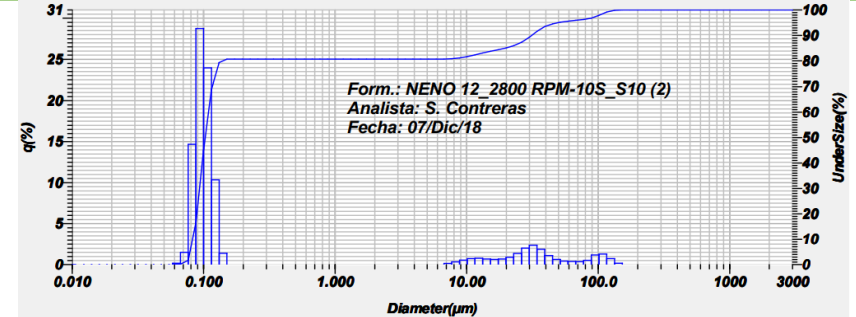
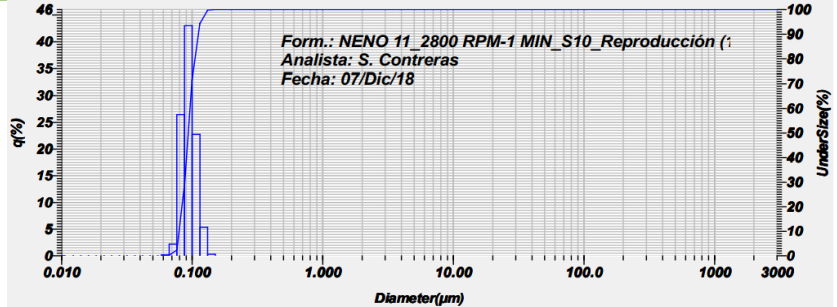
MT	#P	Media	Moda	D50	D90	TE	MT	#P	Media	Moda	D50	D90	TE
NENO-7	2	246.02	94.50	95.60	113.53	--	NENO-8	1	87.10	84.00	85.43	103.93	15 días



MT	#P	Media	Moda	D50	D90	TE	MT	#P	Media	Moda	D50	D90	TE
NENO-9	2	107.22	82.90	84.10	104.53	--	NENO-10	2	343.33	80.27	79.93	98.37	--



MT	#P	Media	Moda	D50	D90	TE	MT	#P	Media	Moda	D50	D90	TE
NENO-11	1	94.55	92.90	93.40	111.60	30 días	NENO-12	2	7703.10	90.63	95.93	28529.80	--



4.1.1 Efecto de la homogeneización mecánica sobre el tamaño de partícula

La homogeneización mecánica es utilizada para obtener sistemas con un tamaño de partícula nanométrico. La velocidad de corte y el tiempo de homogeneización son factores importantes que no sólo repercuten en el tamaño de partícula, sino que también afectan el coeficiente de variación del tamaño de partícula como se observa en la tabla 3.

La tabla 4 muestra el efecto de la velocidad de corte sobre la distribución del tamaño de partícula. Este ensayo demostró una reducción considerable en el coeficiente de variación al disminuir la velocidad de corte. Sin embargo, el método NENO-2 presentó tres poblaciones mientras que NENO-3 mostró dos poblaciones. El método NENO-2 presentó el mayor coeficiente de variación con 634.17 % al usar una velocidad de corte de 10 000 rpm, entre tanto el método NENO-3 manifestó un coeficiente de variación de 100.32 % a 5 000 rpm. El análisis de varianza determinó que existe una diferencia estadísticamente significativa en el coeficiente de variación entre ambas formulaciones.

Tabla 4. Efecto de la velocidad de corte sobre la variación en el tamaño de partícula de la nanoemulsión.

Método	VC	TH	TS	# P	%CV	Diferencia significativa
NENO-2	10 000	15	10	3	634.17	Sí
NENO-3	5 000	15	10	2	100.32	

Abreviaturas: VC: Velocidad de corte. TH: Tiempo de homogeneización. TS: Tiempo de sonicación. # P: Número de poblaciones. %CV: Porcentaje de coeficiente de variación.

Por otra parte, en la tabla 5 se observa el efecto del tiempo de homogeneización sobre la distribución del tamaño de las gotas de aceite de la nanoemulsión. Al usar una velocidad de corte de 5 000 rpm y homogeneizar por 15 min utilizando el método NENO-3 se lograron obtener dos poblaciones. Así mismo, al homogeneizar por 5 min a 5 000 rpm usando el método NENO-5 se obtuvo el mismo número de poblaciones (ver tabla 3). El método NENO-3 y NENO-5 mostraron un coeficiente de variación similar, teniendo un 100.32 % y 101.42 % respectivamente. El análisis de variancia mostró que el coeficiente de variación de ambas formulaciones es estadísticamente diferente.

Al intentar reducir el tiempo de homogeneización se realizaron dos ensayos a 2 800 rpm por 1 min (NENO-11) y 0.17 min (NENO-12) donde se logró obtener una población y dos poblaciones respectivamente (ver tabla 3). Así mismo, al usar el método NENO-11 se obtuvo un coeficiente de variación de 12.57 % mientras que usar el método NENO-12 se presentó un coeficiente de variación de 285.96 % tal como se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Efecto del tiempo de homogeneización sobre la variación en el tamaño de partícula de la nanoemulsión.

Método	VC (rpm)	TH (min)	TS (min)	# P	%CV	Diferencia significativa
NENO-3	5 000	15	10	2	100.32	Sí
NENO-5	5 000	5	10	2	101.42	
NENO-11	2 800	1	10	1	12.57	Sí
NENO-12	2 800	0.17	10	2	285.96	

Abreviaturas: VC: Velocidad de corte. TH: Tiempo de homogeneización. TS: Tiempo de sonicación. # P: Número de poblaciones. %CV: Porcentaje de coeficiente de variación.

La literatura indica que la homogeneización mecánica permite disminuir el tamaño de partícula gracias al rotor y estator del vástago del Ultraturrax® T25. Cuando el rotor gira provoca una turbulencia que hace que las partículas colisionen entre sí y con el estator (Starkloff *et al.* 2013).

En 2015, Flores y colaboradores evaluaron el efecto de la velocidad de corte y el tiempo de homogeneización para la producción de una nanoemulsión de β -caroteno (Flores-Miranda *et al.* 2015). En su estudio señalan que el tamaño de partícula disminuye al aumentar la velocidad de corte y el tiempo de homogeneización. Sin embargo, se observó un aumento de tamaño de partícula al aumentar la velocidad de corte. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en este estudio. Esto puede deberse a que el mayor número de choques puede provocar la ruptura de las gotas de aceite formando partículas pequeñas o encontrarse con gotas más grandes ocasionando la fusión de estas (Kotta *et al.* 2015).

4.1.2 Efecto de la sonicación sobre el tamaño de partícula

La sonicación es un método de alta energía que permite obtener nanoemulsiones, por lo tanto, puede ser utilizado como único método (Jafari *et al.* 2006) o combinarlo con otro método de obtención que permitan la producción de formulaciones con un tamaño de partícula nanométrico (Ochoa *et al.* 2016).

En la tabla 6 se muestra el efecto de la sonicación comparado con el método en la que sólo se utilizó la homogeneización mecánica como único método para la fabricación de la nanoemulsión. Al utilizar la homogeneización mecánica como único método (NENO-1) se obtuvo un coeficiente de variación de 547.64 % mientras que al utilizar la sonicación como complemento (NENO-2) el coeficiente de variación aumentó a 634.17 %. A pesar de ello, NENO-1 mostró tener tres poblaciones de tamaño de partícula mientras que en NENO-2 se observaron dos poblaciones (ver tabla 3).

Tabla 6. Efecto del uso de sonicación sobre el tamaño de partícula de la nanoemulsión.

Método	VC	TH	TS	# P	%CV	Diferencia significativa
NENO-1	10 000	15	0	3	547.64	Sí
NENO-2	10 000	15	10	2	634.17	

VC: Velocidad de corte. TH: Tiempo de homogeneización. TS: Tiempo de sonicación. # P: Número de poblaciones. %CV: Porcentaje de coeficiente de variación.

También se estudió el efecto que tiene el tiempo de sonicación sobre la distribución del tamaño de partícula, tal como se muestra en la tabla 7. NENO-3 mostró tener 2 poblaciones de tamaño de partícula y un coeficiente de variación de 100.32 % al usar 10 min de sonicación. Mientras que en NENO-4 se observó poblaciones múltiples y un coeficiente de variación de 352.70 % al sonicar por 5 min. El análisis de varianza demostró que existe diferencia estadísticamente significativa en el coeficiente de variación de ambos métodos.

Tabla 7. Efecto del tiempo de sonicación sobre la variación en el tamaño de partícula de la nanoemulsión.

Método	VC	TH	TS	# P	%CV	Diferencia significativa
NENO-3	5 000	15	10	2	100.32	Sí
NENO-4	5 000	15	5	Múltiple	352.70	

Abreviaturas: VC: Velocidad de corte. TH: Tiempo de homogeneización. TS: Tiempo de sonicación. # P: Número de poblaciones. %CV: Porcentaje de coeficiente de variación.

Los resultados sugieren que utilizar la sonicación después de la homogeneización mecánica permite disminuir el número de poblaciones de tamaño de partículas. Así mismo, el tiempo de sonicación también afecta la distribución del tamaño de partícula.

Estos resultados coinciden con el estudio realizado por Ochoa y colaboradores en 2016. En esa investigación se estudió el efecto de la sonicación como método para obtener una nanoemulsión de curcumina. En este mismo estudio se evidenció que el porcentaje de amplitud repercute en el suministro de energía al método (Ochoa *et al.* 2016). Por lo tanto, a mayor energía mayor turbulencia, lo que provoca una fusión de gotas pequeñas con grandes o la producción de gotas más pequeñas debido a la coalescencia entre partículas (Kotta *et al.* 2015). En consecuencia, se pueden producir emulsiones homogéneas o heterogéneas.

4.1.3 Selección del método de obtención y prueba de estabilidad

Los ensayos previos fueron cruciales para encontrar el proceso de manufactura adecuado que permitiera obtener la distribución de tamaño de partícula más homogéneo posible.

En la tabla 8 se muestran las formulaciones que manifestaron tener sólo una población de tamaño de partícula. El método NENO-8 tuvo un tamaño de partícula medio de 87.10 nm, mientras que en el método NENO-11 se encontró un promedio de tamaño de gota de 94.55 nm. En cuanto al coeficiente de variación, NENO-8 mostró un coeficiente de variación de 13.97 % mientras que en NENO-11 fue de 12.57 %. El análisis estadístico demuestra que existe diferencia estadísticamente significativa en el coeficiente de variación entre las dos formulaciones. Esto puede

deberse a que en el método NENO-8 se homogeneizó a 3 000 rpm por 5 min y se sonicó por 15 min a diferencia del método NENO-11 que se homogeneizó a 200 rpm menos durante 1 min y se sonicó por 5 min menos en comparación con en el método NENO-8. Estos resultados coinciden con algunos estudios previamente publicados (Kotta *et al.* 2015; Ochoa *et al.* 2016).

Tabla 8. Métodos monomodales.

Método	VC	TH	TS	#P	Media	%CV	D ₅₀	D ₉₀	Diferencia significativa
NENO-8	3 000	5	15	1	87.10	13.97	85.43	103.93	Sí
NENO-11	2 800	1	10	1	94.55	12.57	93.40	111.60	

Abreviaturas: VC: Velocidad de corte. TH: Tiempo de homogeneización. TS: Tiempo de sonicación. #P: Número de poblaciones. D₅₀: Diámetro promedio del 50 % de las partículas. D₉₀: Diámetro promedio del 90 % de las partículas. %CV: Porcentaje de coeficiente de variación.

Los resultados obtenidos indican que las formulaciones obtenidas utilizando el método NENO-11 fueron más estables al presentar cremación a los 30 días después de iniciar la prueba de estabilidad. Mientras que las formulaciones fabricadas mediante NENO-8 presentaron cremación 15 días después de iniciada la prueba de estabilidad.

La literatura indica que una de las características de las nanoemulsiones es el movimiento Browniano que tiene la fase interna debido al tamaño de partícula menor a 500 nm (Velásquez *et al.* 2014). Este movimiento aleatorio permite el choque de las partículas de la fase interna sin entrar en contacto debido con las micelas formadas por el tensoactivo. En 2019, Alvarado y Medina señalaron que la desestabilización de las nanoemulsiones puede deberse a micelas libres formadas por el tensoactivo (Alvarado López *et al.* 2019). Las micelas y el movimiento Browniano pudieron facilitar la migración de las partículas pequeñas hacia las partículas más grandes provocando la maduración de Oswald, ocasionando la cremación de la nanoemulsión. Esta señalización concuerda con los resultados obtenidos en este estudio.

4.2 Rendimiento obtenido al extraer el aceite esencial de las semillas de *M. oleifera*
La literatura indica que aproximadamente el 38 % del peso de las semillas de *M. oleifera* está conformado por aceite (Gopalakrishnan *et al.* 2016). Al finalizar la extracción se calculó el rendimiento del aceite obtenido. Partiendo de una masa total de 207 g de semillas de *M. oleifera* molidas, se obtuvo un rendimiento de 74.36 g de aceite esencial o 25.95 % en relación con la masa de las semillas.

4.3 Determinación de la densidad del aceite esencial de las semillas de *M. oleifera*
El aceite esencial extraído de las semillas de *M. oleifera* presentó una densidad de 0.910 g/mL utilizando la metodología antes planteada.

4.4 Efecto del aceite esencial de las semillas de *M. oleifera* sobre la viabilidad en líneas celulares HaCaT y HeLa

Antes de fabricar algún producto para consumo humano, es indispensable determinar la seguridad de las sustancias. Para ello, es necesario determinar el valor de IC₅₀. La prueba de citotoxicidad es un ensayo *in vitro* ampliamente utilizado para determinar la concentración que puede llegar a disminuir la viabilidad celular hasta un 50 % (Novohradsky *et al.* 2014).

Se determinó el efecto citotóxico del aceite esencial de las semillas de *M. oleifera* sobre las líneas celulares HaCaT y HeLa mediante la técnica de MTT.

En la figura 1 se observa el efecto del aceite esencial de las semillas de *M. oleifera* sobre la viabilidad células HaCaT, donde se aprecia la disminución del porcentaje de viabilidad en los tres experimentos tomadas sin que la viabilidad se reduzca al 50 % o menos. El ensayo 1 mostró una viabilidad mínima de 79.08 % a una concentración de 1 000 µg/mL, mientras que la viabilidad mínima del segundo ensayo fue de 92.38 % a una concentración de 1 200 µg/mL. En el experimento 3 se observó una lectura mínima de 66.82 % a una concentración de 1 600 µg/mL (figura 1).

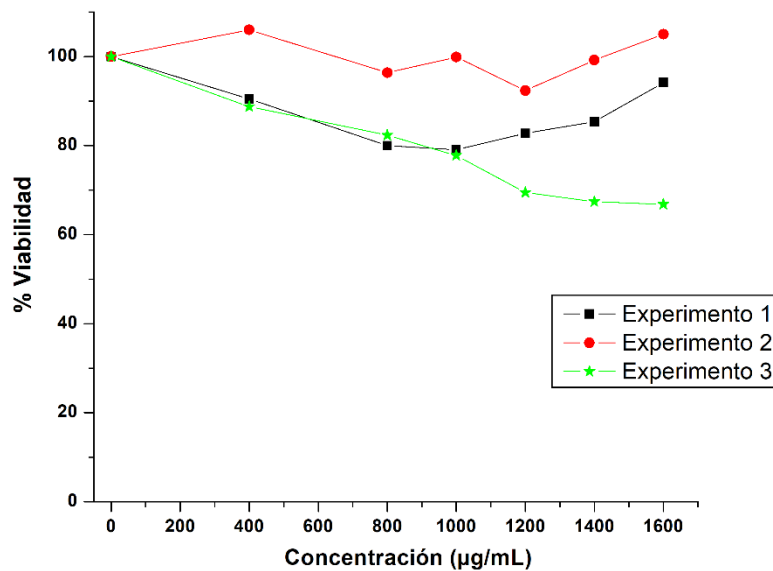


Figura 1. Efecto del aceite esencial de las semillas de *M. oleifera* sobre la viabilidad de células HaCaT después de 48 h de exposición. Durante el ensayo de citotoxicidad en células HaCaT no se observó un efecto citotóxico considerable.

El aceite esencial de las semillas de *M. oleifera* presentó un pobre efecto citotóxico sobre las células HaCaT, sin embargo, el porcentaje de viabilidad nos disminuyó más allá del 66.82 %.

Por otro lado, la viabilidad aumento ligeramente al utilizar el aceite esencial de las semillas de *M. oleifera* a una concentración de 1600 µg/mL. Esto puede deberse a la alta concentración de ácidos grasos presentes en el aceite esencial de las semillas de *M. oleifera*. Se ha reportado que lo queratinocitos son capaces de producir enzimas para llevar a cabo la lipogénesis de *novo* para ello pueden ahorrar energía utilizando los ácidos grasos exógenos para la producción de fosfolípidos capaces de formar parte de la bicapa lipídica de la membrana de las nuevas células (Dumas *et al.* 2018). En un estudio con células de carcinoma hepatocelular (Hep-G2) donde determinó que el ácido oleico era capaz de promover la lipogénesis *de novo* al utilizar una concentración del 1 % v/v (Kohjima *et al.* 2009). En otro estudio

se estableció que al utilizar ácido oleico a 100 μM ácido oleico es capaz de promover la proliferación celular al acelerar la fase G_0/G_1 (Belal *et al.* 2018).

Se utilizó la línea celular HeLa como referencia para determinar el intervalo de concentraciones para estudiar el efecto citotóxico del aceite esencial de las semillas de *M. oleifera*. En la figura 2 se aprecia que no disminuyó la viabilidad a un nivel igual o menor al 50 %, por lo tanto, no se pudo calcular un IC_{50} . En el experimento 1, la menor viabilidad fue de 69.23 % y se obtuvo a una concentración de 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que en el experimento 2 fue de 76.57 % a 1 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El experimento 3 mostró una viabilidad mínima de 65.3 % al utilizar una concentración de 1 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

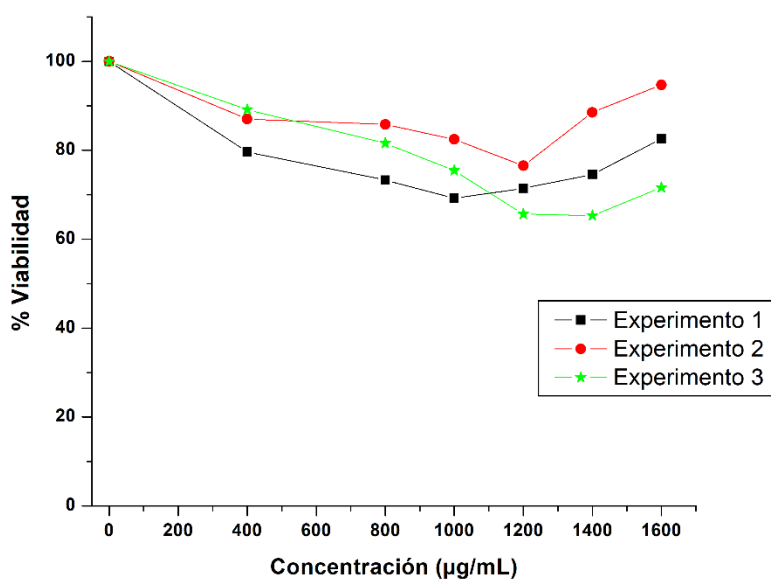


Figura 2. Efecto del aceite esencial de las semillas de *M. oleifera* sobre la viabilidad de células HeLa después de 48 h de exposición. Durante el ensayo de citotoxicidad en células HeLa no se observó un efecto citotóxico considerable en ningún experimento.

Por determinar las concentraciones del aceite esencial de las semillas de *M. oleifera* a estudiar se utilizó como referencia un estudio previo realizado en la línea celular HeLa. En ese trabajo utilizaron las células HeLa para estudiar la citotoxicidad del

aceite esencial de semillas de *M. oleifera* obtenido mediante prensado en frío (Elsayed *et al.* 2015).

En dicho estudio, la menor viabilidad celular se obtuvo en el tercer ensayo. En este experimento la viabilidad celular decayó a 65.3 % al utilizar una concentración de 1 400 µg/mL. Esto difiere con un resultado previamente publicados donde se obtuvo una IC₅₀ de 442.8 µg/mL en células HeLa (Elsayed *et al.* 2015). La discrepancia puede deberse al método para obtener el aceite esencial de semillas de *M. oleifera*. Algunos estudios han comparado dos o más métodos para obtener el aceite esencial de un determinado vegetal. En estos ensayos se determinó que el rendimiento obtenido puede variar en los métodos de extracción debido a factores como: presión, calor, solubilidad, tamaño de partícula, entre otros (Torrenegra *et al.* 2015; Gómez Mitjans *et al.* 2016).

Además de lo anterior, la ubicación geográfica, la época de recolección, la antigüedad del material vegetal, su almacenamiento, entre otros, son factores que afectan la proporción de los compuestos de los aceites esenciales (Mejía *et al.* 2007).

Se comparó el efecto citotóxico del aceite esencial de las semillas de *M. oleifera* sobre células HaCaT y células HeLa. Para ello se realizó un ANOVA de una vía utilizando un nivel de significación de 0.05.

En la figura 3 se observa que ambas líneas celulares presentan un declive similar en el porcentaje de viabilidad al exponerlas al aceite esencial de las semillas de *M. oleifera*. En la línea celular HaCaT la viabilidad mínima fue de 80.50 % mientras que en las células HeLa fue de 71.23 %, estas viabilidades se presentaron al exponer ambas líneas celulares a una concentración de 1 200 µg/mL. Sin embargo, el análisis estadístico indica que no existe diferencia estadísticamente significativa en la viabilidad de ambas líneas celulares.

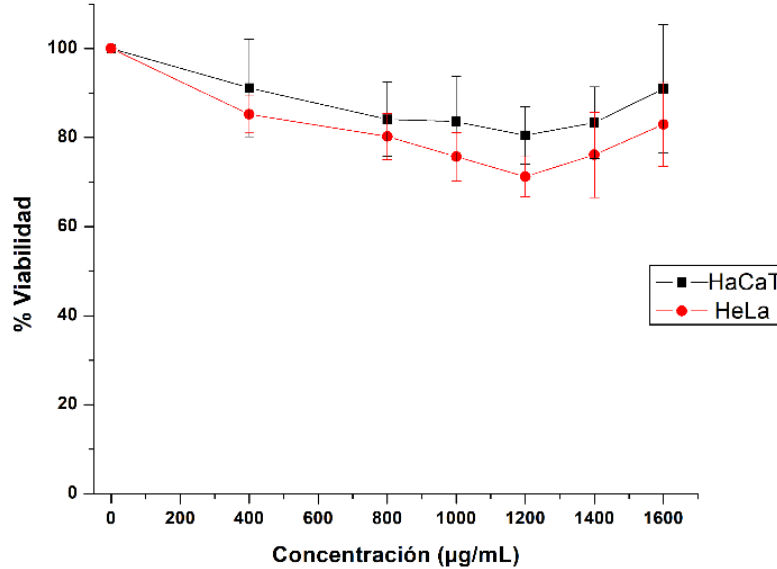


Figura 3. Efecto del aceite esencial de las semillas de *M. oleifera* sobre la viabilidad de células HaCaT y células HeLa después de 48 h de exposición. Se comparó el promedio obtenido de los experimentos individuales de las líneas celulares HaCaT y HeLa. No hubo diferencia estadísticamente significativa entre ambas líneas celulares.

4.5 Efecto de la nanoemulsión sobre la viabilidad de líneas celulares HaCaT y HeLa
 Se utilizó la técnica de MTT para determinar la citotoxicidad de la nanoemulsión como vehículo para transportar las nanopartículas del aceite esencial de las semillas de *M. oleifera*.

Se observó la disminución drástica de la viabilidad celular tanto en células HaCaT como células HeLa después de administrar el aceite esencial de *M. oleifera*, tal como se muestra en la figura 4. Debido a que la viabilidad decayó por debajo del 50 % de viabilidad se logró obtener la IC₅₀ utilizando el modelo de Boltzmann. Las células HaCaT tuvieron una viabilidad mínima de 18.08 % utilizando un volumen de 50 µL mientras que las células HeLa la menor viabilidad fue de 32.73 % utilizando un volumen de 50 µL.

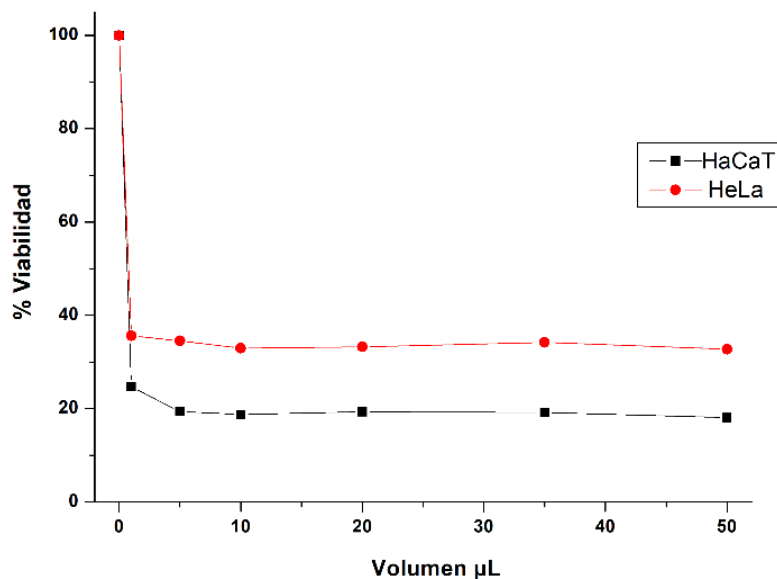


Figura 4. Efecto de la nanoemulsión como vehículo sobre la viabilidad de células HaCaT y células HeLa después de 48 h de exposición. La nanoemulsión tiene un efecto citotóxico considerable en ambas líneas celulares.

En la tabla 8 se presenta el volumen de nanoemulsión y la concentración de Tween 80 necesario para disminuir la viabilidad celular al 50 % tanto en células HaCaT como HeLa.

Tabla 9. Concentración inhibitoria 50 en células HaCaT y HeLa después de 48 h de exposición a la nanoemulsión.

Línea celular	Concentración de Tween 80 (µM)
HaCaT	27.81
HeLa	12.50

El ensayo de MTT demostró que el vehículo utilizado para la nanoemulsión ocasionó la disminución de la viabilidad celular en los queratinocitos inmortalizados y las células de cáncer cérvico-uterino de manera considerable, de modo tal que se obtuvo una IC₅₀ de 27.81 y 12.50 µM respectivamente.

Se ha reportado el efecto citotóxico del Tween 80 sobre líneas celulares de cáncer, entre ellas, la línea celular HeLa. En un reporte previo se encontró que el IC₅₀ de

las células HeLa fue de 1.60 μM (Aurelio Navarro 2018), resultado que difiere con el obtenido en este estudio. Esto puede deberse a que Aurelio utilizó un medio isotónico (PBS) para diluir el Tween 80, mientras que en este estudio se utilizó un medio hipotónico (agua).

4.5.1 Ensayo de tonicidad de la nanoemulsión como vehículo

El efecto citotóxico observado también puede deberse, en parte, a que las células fueron expuestas a un medio hipotónico ocasionando muerte celular por lisis. Para ello se realizó una prueba de tonicidad exponiendo eritrocitos a diferentes medios con el fin de determinar si la osmosis es un factor que considerar para la disminución abrupta de la viabilidad celular.

Se realizó un ensayo de tonicidad sustituyendo el agua destilada por agua mili-Q en una formulación, y en la otra se utilizó PBS. En la figura 5 se observa el efecto de formulaciones con agua mili-Q y PBS, con respecto a los controles de agua y PBS, sobre las muestras de sangre al tiempo inicial y a los 2, 5, 7 y 10 min.

Previo a la adición de los eritrocitos se observa la apariencia original de cada una de las sustancias a estudiar. El orden de los tubos de izquierda a derecha fue: agua, PBS, nanoemulsión con agua mili-Q (NMQ) y nanoemulsión elaborada con PBS (NPBS). Los tubos con agua, PBS y NPBS muestran una apariencia cristalina, mientras que el tubo NMQ manifiesta una coloración blanquecina y turbia.

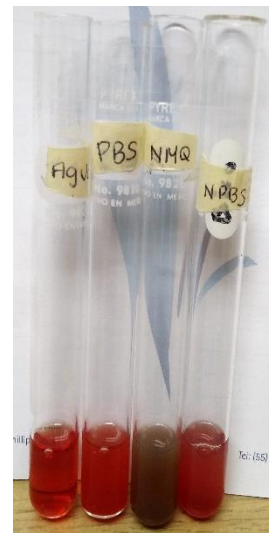
Desde los 2 min de iniciado el ensayo, el tubo control con agua se mantuvo todo el experimento de color rojo y cristalino, lo que indica una hemólisis, dado que el agua es hipotónica en comparación con el interior de los eritrocitos (Ira Fox 2011). Mientras que los 2 min los tubos restantes mostraron un carácter turbio. Dicho aspecto fue variando dependiendo de la solución y del tiempo de exposición a la misma.



Previo a la
adición de
eritrocitos



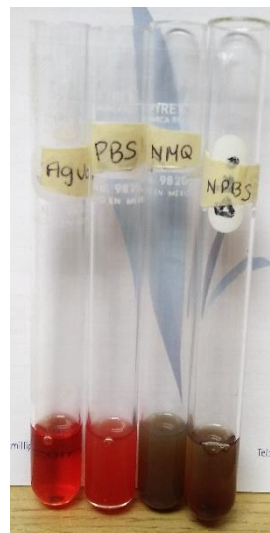
2 min



3 min



5 min



10 min

Figura 5. Ensayo de tonicidad. Para el ensayo de tonicidad se utilizó agua y PBS como control de hemólisis. Al probar el efecto de la nanoemulsión con agua Mili-Q (NMQ) y la nanoemulsión con PBS (NPBS) se encontró que ambas formulaciones provocaron la hemólisis de las células sanguíneas.

En el tubo con PBS se mantuvo una coloración roja de aspecto turbio, la cual se mantuvo durante todo el experimento. Esto sugiere que existe una concentración osmótica similar a la del interior del eritrocito, por lo cual no hubo hemolisis (Ira Fox 2011).

Por otro lado, el tubo NMQ mostró una coloración rojo oscuro turbia a los 2 min, dicha turbidez se mantuvo hasta el final del experimento. Mientras que la coloración viró a café oscuro a los 3 min, manteniendo esa coloración hasta finalizar el experimento. El cambio de coloración sugiere que el medio provocó la ruptura de los eritrocitos debido a la diferencia de concentración osmótica en comparación con el interior de los eritrocitos. Adicionalmente, el cambio de color de rojo a café puede deberse a la desnaturalización de la hemoglobina. La turbidez observada está dada probablemente por la nanoemulsión, y no por la presencia de eritrocitos íntegros.

Mientras que en el tubo NPBS se mantuvo una coloración roja y turbia hasta los 3 min. A partir de los 5 min, el medio volvió cristalino y la coloración empezó a cambiar a café oscuro, sugiriendo la hemolisis de los eritrocitos y el inicio de la desnaturalización de la hemoglobina. A los 10 min se observó que la coloración del medio era café oscuro y cristalino.

En un estudio publicado en 2004 se realizó una prueba de tolerancia *in vitro* con eritrocitos y demostró que cuando los eritrocitos sufren hemolisis liberan hemoglobina oxigenada al medio y al desnaturalizarse provocan el oscurecimiento del medio. Así mismo, se probó que aun después de la lisis celular el tensoactivo sigue en contacto con la hemoglobina, lo que ocasiona su desnaturalización (Vallejo *et al.* 2004).

5. Conclusión

En este estudio se observó que la distribución del tamaño de partícula se ve afectado por la velocidad de corte, el tiempo de homogeneización y el uso y tiempo de sonicación. Se logró fabricar una nanoemulsión mediante el método NENO-11 usando una velocidad de corte de 2 800 rpm por 1 min y sonicando por 10 min con una amplitud del 50 % y ciclos del 100 %. Esta nanoemulsión presentó un tamaño de partícula medio de 94.55 nm, coeficiente de variación de 12.57 % además de ser monomodal.

Se extrajo el aceite esencial de las semillas de *M. oleifera* mediante el método de hidrodestilación (HD-UAMX), obteniendo un rendimiento de 25.95 % p/p, el cual presentó una densidad de 0.910 g/mL.

Además, el aceite esencial de las semillas de *M. oleifera* extraído mediante el método HD-UAMX no mostró tener un efecto citotóxico considerable sobre células HaCaT y células HeLa después de 48 h de exposición al usar una concentración de hasta 1600 µg/mL. Por lo tanto, este aceite esencial de semillas de *M. oleifera* puede ser utilizado a una concentración ≤ 1600 µg/ mL como activo cosmético o excipiente para formulaciones administradas por vía tópica.

La turbidez presente en los tubos con NMQ y NPBS no permitió observar la lisis celular. Sin embargo, el cambio de coloración en los medios sugiere que existió hemólisis debido a la desnaturalización de la hemoglobina.

6. Referencias

- Albarracín Serra, A., M. Alemany Lamana, M. Alonso Franch, B. Álvarez Palomo, J. Aranceta Bartrina, J. M. Argilés Huguet, M. L. Bonet Piña, *et al.* (2002). Técnicas y métodos de investigación en nutrición humana. Barcelona, Glosa. 100-101.
- Alvarado López, G. and E. Medina Lezama (2019). Nanoemulsiones O/W de aceite esencial de naranja y tween 80. *Revista de la Sociedad Química del Perú* **85**: 189-205.
- Amaglo, N. K., R. N. Bennett, R. B. Lo Curto, E. A. S. Rosa, V. Lo Turco, A. Giuffrida, A. L. Curto, *et al.* (2010). Profiling selected phytochemicals and nutrients in different tissues of the multipurpose tree *Moringa oleifera* L., grown in Ghana. *Food Chemistry* **122**(4): 1047-1054.
- Aurelio Navarro, V. (2018). Evaluación de la citotoxicidad de derivados de piridinas 2,4,6-trisustituídas en líneas celulares de cáncer. *Tesis de Licenciatura en Química Farmacéutico Biológica*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Badía Vila, M. A. and E. García Miranda (2012). *Cosmetología aplicada a la estética decorativa*. España, Ediciones Paraninfo. 81, 109.
- Badruddoza, A. Z. M., A. Gupta, A. S. Myerson, B. L. Trout and P. S. Doyle (2018). Low energy nanoemulsions as templates for the formulation of hydrophobic drugs. *Advanced Therapeutics* **1**, 1-8
- Belal, S. A., A. S. Sivakumar, D. R. Kang, S. Cho, H. S. Choe and K. S. Shim (2018). Modulatory effect of linoleic and oleic acid on cell proliferation and lipid metabolism gene expressions in primary bovine satellite cells. *Animal cells and systems* **22**(5): 324-333.
- Boukamp, P., R. T. Petrussevska, D. Breitkreutz, J. Hornung, A. Markham and N. E. Fusenig (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *The Journal of cell biology* **106**(3): 761-771.
- Burkhart, C., D. Morrell and L. Goldsmith (2007). *Farmacología dermatológica*. Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica, 11e. L. L.

- Brunton, B. A. Chabner and B. C. Knollmann. New York, NY, McGraw-Hill Education: 1679-1680.
- Castell Rodríguez, A. E. and M. Herrera Enríquez (2013). Piel y anexos. Histología y biología celular, 2e. D. T. I. Fortoul van der Goes. New York, NY, McGraw-Hill Education: 207-222.
- Dumas, S. N. and J. M. Ntambi (2018). A Discussion on the Relationship between Skin Lipid Metabolism and Whole-Body Glucose and Lipid Metabolism: Systematic Review. *Journal of cell signaling* **3**(3): 189.
- Elsayed, E. A., M. A. Sharaf-Eldin and M. Wadaan (2015). *In vitro* evaluation of cytotoxic activities of essential oil from *Moringa oleifera* seeds on HeLa, HepG2, MCF-7, CACO-2 and L929 cell lines. *Asian Pac. J. Cancer Prev* **16**(11): 4671-4675.
- Flores-Miranda, G. A., G. Valencia del Toro and J. Yáñez-Fernández (2015). Stability evaluation of *B*-Caroteno nanoemulsions prepared by homogenization-emulsification process using stearic acid as oil phase. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* **14**(3): 667-680.
- García-Delgado, R., E. E. Travesedo and A. S. Romero (2004). Rationale use of topical drugs in dermatology. *Medicina cutánea ibero-latino-americana* **32**(1): 39-44.
- Gómez Mitjans, D., V. Pita Bravo and B. Zumalacárregui de Cárdenas (2016). Caracterización de aceites de las semillas de *Moringa oleifera* a partir de la extracción por diferentes métodos. *Revista Colombiana de Biotecnología* **18**: 106-111.
- Gopalakrishnan, L., K. Doriya and D. S. Kumar (2016). *Moringa oleifera*: a review on nutritive importance and its medicinal application. *Food science and human wellness* **5**(2): 49-56.
- Ira Fox, S. (2011). Fisiología humana. China, McGraw-Hill Education. 140-142.
- Jafari, S. M. (2017). Nanoencapsulation technologies for the food and nutraceutical industries. Reino Unido, Academic Press. 40-55.

- Jafari, S. M., Y. He and B. Bhandari (2006). Nano-Emulsion Production by Sonication and Microfluidization-A Comparison. *International Journal of Food Properties* **9**(3): 475-485.
- Jaiswal, M., R. Dudhe and P. K. Sharma (2015). Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. *3 Biotech* **5**(2): 123-127.
- Jasmina, H., O. Džana, E. Alisa, V. Edina and R. Ognjenka (2017). Preparation of nanoemulsions by highenergy and lowenergy emulsification methods. *CMBEBIH 2017*, Singapore, Springer Singapore. 317-322.
- Kesrevani, R. K. and A. K. Sharma (2016). Nanoarchitected biomaterials: present status and future prospects in drug delivery. *Nanoarchitectonics for smart delivery and drug targeting*. A. M. Holban and A. M. Grumezescu. Estados Unidos, William Andrew Publishing: 35-66.
- Kohjima, M., M. Enjoji, N. Higuchi, M. Kato, K. Kotoh, M. Nakashima and M. Nakamuta (2009). The effects of unsaturated fatty acids on lipid metabolism in HepG2 cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* **45**(1): 6-9.
- Kotta, S., A. W. Khan, S. H. Ansari, R. K. Sharma and J. Ali (2015). Formulation of nanoemulsion: a comparison between phase inversion composition method and high-pressure homogenization method. *Drug Delivery* **22**(4): 455-466.
- Leone, A., A. Spada, A. Battezzati, A. Schiraldi, J. Aristil and S. Bertoli (2016). *Moringa oleifera* seeds and oil: characteristics and uses for human health. *International journal of molecular sciences* **17**(12): 2141.
- Martínez-Torres, A. C., A. C. Uscanga-Palomeque and C. Rodríguez-Padilla (2016). Actividad citotóxica *in vitro* frente a células tumorales. *Investigación en plantas de importancia médica*: 269-312.
- Mejía, O., M. Julio, M. S. Sánchez O, C. R. Bonilla C and P. Vanegas M (2007). Efecto de la altura y frecuencia de corte y secado en el rendimiento y calidad del aceite esencial de pronto alivio. *Scientia Et Technica* **XIII**(33): 253-255.
- Navarrete Franco, G. (2003). Histología de la piel. *Revista de la facultad de medicina UNAM* **46**(4): 130-133.

- Novohradsky, V., L. Zerzankova, J. Stepankova, A. Kisova, H. Kostrhunova, Z. Liu, P. J. Sadler, *et al.* (2014). A dual-targeting, apoptosis-inducing organometallic half-sandwich iridium anticancer complex. *Metallomics* **6**(8): 1491-1501.
- Ochoa, A. A., J. A. Hernández-Becerra, A. Cavazos-Garduño, E. J. Vernon-Carter and H. S. García (2016). Preparation and characterization of curcumin nanoemulsions obtained by thin-film hydration emulsification and ultrasonication methods. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* **15**(1): 79-90.
- Paniagua, A. and J. Chora (2016). Elaboración de aceite de semillas de *Moringa oleífera* para diferentes usos. *Revista de ciencias de la salud* **3**(9): 36-46.
- Proksch, E. (2018). pH in nature, humans and skin. *The Journal of Dermatology* **45**(9): 1044-1052.
- Robins, M. M. (2000). Emulsions - creaming phenomena. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **5**(5): 265-272.
- Santos Ramos, B. and M. D. Guerrero Aznar (1994). Administración de medicamentos: teoría y práctica. España, Díaz de Santos. 77-78.
- Saúl, A. and G. Martínez (2015). La piel. Saúl. Lecciones de dermatología, 16e. A. Saúl. New York, NY, McGraw-Hill Education: 1-18.
- Starkloff, W. J., S. D. Palma and N. L. Gonzalez-Vidal (2013). Nanosuspensiones: Disminución del tamaño de partícula como herramienta para mejorar la biodisponibilidad de fármacos liposolubles. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* **44**(4): 7-16.
- Tavira Montalván, C. A., A. Ortega García, I. Dávila González, S. Estrada Mondaca and A. Meneses Acosta (2009). Alcances y perspectivas del cultivo de células animales en la biotecnología farmacéutica. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas* **40**(4): 35-46.
- Torrenegra, M. E., C. Granados, M. R. Osorio and G. León (2015). Comparación de la hidro-destilación asistida por radiación de microondas (MWHD) con hidro-destilación convencional (HD) en la extracción de aceite esencial de *Minthostachys mollis*. *Información tecnológica* **26**: 117-122.

- Torres Lacomba, M. and I. Salvat Salvat (2006). Guía de masoterapia para fisioterapeutas. Buenos Aire; Madrid, Médica Panamericana. 135-139.
- Vallejo, O., J. John, O. Castrillón, C. Carla, M. Garzón, M. Sandra, A. Giraldo, *et al.* (2004). Prueba de tolerancia *in vitro* con eritrocitos para medir el potencial de irritabilidad de los surfactantes. *Vitae* **11**(1): 49-54.
- Velásquez, I. and J. C. Pereira (2014). Emulsiones de agua en crudo. Aspectos Generales. *Revista INGENIERÍA UC* **21**(3): 45-54.
- Vermaak, I., G. P. P. Kamatou, B. Komane-Mofokeng, A. Viljoen and K. Beckett (2011). African seed oils of commercial importance - cosmetic applications. *South African journal of botany* **77**(4): 920-933.