UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

APORTE AL DISEÑO DE UN SISTEMA MICROPARTICULADO PARA UN EXTRACTO DE *Passiflora quadrangularis* Linn

Hilbert Iván Medina Jiménez

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Area Curricular de Farmacia

Maestría en Ciencias Farmacéuticas

Bogotá, Colombia

2014

APORTE AL DISEÑO DE UN SISTEMA MICROPARTICULADO PARA UN EXTRACTO DE *Passiflora quadrangularis* Linn

Hilbert Iván Medina Jiménez

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Farmacéuticas

Directora:

DSc. Diana Marcela Aragón Novoa

Codirector:

DSc. MSc Geison Modesti Costa

Grupo de Investigación en Tecnología de Productos Naturales, TECPRONA

Grupo de Investigación Sistemas de Liberación Controlada de Moléculas Biológicamente Activas, SILICOMOBA

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Area Curricular de Farmacia

Maestría en Ciencias Farmacéuticas

Bogotá, Colombia

2014

A mi familia, por su apoyo incondicional

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia, un lugar donde he logrado un crecimiento personal incalculable.

Al Departamento de Farmacia por permitirme el desarrollo de este trabajo, y por su apoyo en el desarrollo de la Maestría.

A la facultad de Ciencias por su apoyo financiero a través de la Beca Auxiliar Docente.

A la División de Investigación de la Sede Bogotá (DIB) por la financiación del proyecto "Evaluación de los perfiles de liberación *in vitro e in vivo* de sistemas microencapsulados de sustancias biológicamente activas".

Al Fondo Nacional de Financiamiento para la Ciencia, la Tecnología y la Innovación, Francisco José de Caldas, (contrato No. 0459 – 2013) Red Nacional para la Bioprospección de Frutas Tropicales-RIFRUTBIO por los fondos brindados.

A mi Ma por que siempre he sentido su amor y es una mujer maravillosa día tras día, tu apoyo a lo largo de todo este tiempo ha sido incondicional. A mi Pa por su talante y su ejemplo de vida, su tenacidad y su amplio apoyo en cada instante. En general, no tengo palabras para agradecerles, gracias totales!

A mi hermano, disfrutando cada minuto, sin importar el cómo, el cúando, o el qué, siempre eres genial, lo sabes, te admiro un montón.

A Aura, por la locura de vivir y el éxtasis de amar, no me olvidaré de la *Passiflora,* no por que su flor me recuerde la Pasión de Cristo, en su lugar siempre me recordará que mientras trabajaba con ella, descubrimos nuestra propia pasión.

A Carlos Martínez, por su amistad, su apoyo, por cada momento vivido, por ser esa persona fantástica.

A Crespo, por todos los buenos y malos momentos, la maestría hubiese sido muy aburrida si no lo hubiese conocido.

A Oscar por todas las discusiones políticas, sociales, económicas y emocionales que hicieron vibrante cada tinto, por su confianza.

A Hernán Jaramillo, por su paciencia, es una de las personas que ha influido positivamente en mi, gracias por todo lo enseñado tanto profesional, como personalmente.

A Lala por su increíble forma de ser, por las sonrisas y por sus ideas.

A la profesora Marcela Aragón, por sus enseñanzas y su paciencia, por todo lo aportado y lo entregado.

A Geison Costa por su paciencia, y por la oportunidad de conocer un mundo nuevo intelectualmente, por su alegría de vivir.

Al profesor Jaiver Rosas, por todo lo enseñado, y por sus invaluables opiniones y su infalible metodología.

A Reina, Isabel, Paola C., Paola R., por todo su apoyo, consejos y amistad.

A todas las personas que conocí durante este proceso por sus enseñanzas y su compañía

Gracias a la vida, a Dios, por la adrenalina del día a día en mi vivir.

Resumen

Passiflora quadrangularis Linn es una planta ampliamente distribuida en Colombia y Sur América, cuyos frutos se han usado para la preparación de bebidas y alimentos y sus hojas son utilizadas en la medicina popular como tranquilizante. Recientemente, han sido descritas actividades farmacológicas de extractos de las hojas sobre el sistema nervioso central como sedante y ansiolítico. Teniendo en cuenta las propiedades atribuídas y demostradas a esta planta, el objetivo de este trabajo fue contribuir al diseño de un sistema microparticulado cargado con un extracto de hojas de *P. quadrangularis* con el fin de generar información preliminar para el futuro desarrollo de un producto fitoterapéutico.

En un primer momento se desarrolló una metodología analítica por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia que permitiese la cuantificación de vitexina y de los flavonoides totales contenidos en el extracto y de esta manera lograr la valoración del extracto contenido en micropartículas poliméricas con el fin realizar la determinación de parámetros tal como eficiencia de encapsulación. Esta metodología fue validada en cuanto a selectividad-especificidad respecto a cada una de las matrices empleadas; la linealidad, precisión, exactitud y los límites de detección y cuantificación del método, se evaluaron de acuerdo a las guías ICH.

Las micropartículas fueron elaboradas con Eudragit E ® PO (Poli(butil metacrilato-co-(2-dimetil aminoetil) metracrilato-co- metil metacrilato) 1:2:1) secando una solución acuosa, acidificada de polímero y extracto. Parámetros experimentales como la temperatura de entrada, caudal de aire, velocidad de aspersión, proporción extracto:polímero y contenido de sólidos fueron evaluados a través de dos diseños experimentales, el primero un diseño Factorial desbalanceado $2^{2-1}\ 3^{3-1}$ y el segundo un diseño factorial 2^3. El rendimiento fue calculado através de un balance de masa y corregido teniendo en cuenta la humedad residual de las micropartículas. Por otro lado, la eficiencia de encapsulación fue evaluada por medio de la cuantificación del extracto remanente, después de suspender las

micropartículas en agua. Los valores de rendimiento estuvieron entre 34,6 y 77,4 % y de eficiencia de encapsulación entre 70,5 y 95,45%.

Finalmente, durante la evaluación de la estabilidad de las micropartículas se encontró que en condiciones de estrés como la hidrólisis básica al igual que en la condición de almacenamiento controlada de 40°C y 75% HR la microencapsulación contribuye a evitar la degradación del extracto.

Palabras clave: Flavonoides, *Passiflora quadrangularis* (Passifloraceae), Secado por aspersión, CLAE, microencapsulación, Eudragit, Polímero

Abstract

Passiflora quadrangularis L. is a plant widely distributed in Colombia and South America, their fruits have been used traditionally in the preparation of foods and beverages, and their leaves tea in the traditional medicine as tranquilizer; recently, pharmacological activities for the leaf extract over central nervous system as sedative and anxiolytic, have been investigated and reported. In bases of the reported and demonstrated activity, the aim of this study was to evaluate the influence of experimental parameters on the manufacture of micro particles loaded with *P. quadrangularis L*. aqueous leaf extract prepared by Spray Drying method, with the scope to bring premilinary information in order to develop a phytotherapeutic product

First, an analytical HPLC methodology was developed in order to have one that allows total flavonoid and vitexin quantification in the extract, allows extract quantification to calculate some parameters as encapsulation efficiency, and allows degradation products quantification after stress conditions. Analytical Methodology was validated according ICH guidelines, it had good presicion (%RSD<5%) and accuracy (90%<%Recovery<110%); limits of quantification and detection were calculated.

Microparticles were manufactured with Eudragit ® E PO (Poly(butyl methacrylate-co-(2-dimethylaminoethyl) methacrylate-co-methyl methacrylate) 1:2:1) by spray- drying an acid solution containing co-polymer and extract, experimental parameters such as Inlet temperature, air flow, pump rate, extract:polymer ratio and solid content were evaluated trough two experimental design, the first, an unbalanced factorial design 2^{2-1} 3^{3-1} and the second, a factorial design 2^3. Yield was calculated by mass balance, and corrected taking into account the final microparticles water content. On the other hand, encapsulation efficiency was monitored by extract quantification in a remains, after suspending microparticles in water; all this made trough HPLC-DAD Method previously validated. Yield percentages ranging from 34,6% to 77,4%, and encapsulation efficiencies between 70,5% to 95,45%, were found.

Finally, evaluating the stability of the microparticles in stress conditions as basic hydrolysis and in the same way controlled conditions of storage as 40°C and 75% RH showed that microencapsulation contributes to avoid degradation of the extract.

Keywords: Flavonoids, Passiflora quadrangularis (Passifloraceae), Spray Drying, HPLC, Microencapsulation, Eudragit, Polymer.

Contenido

RESUMEN ..... **IX**

LISTA DE FIGURAS ..... **XVII**

LISTA DE TABLAS ..... **XXI**

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS **1**

INTRODUCCIÓN **3**

1. MARCO TEÓRICO **5**

1.1 Passiflora quadrangularis Linn. *5*

1.1.1 Caracterización química de *Passiflora quadrangularis* 7

1.1.2 Actividades farmacológicas para *P. quadrangularis* *9*

1.2 Principales técnicas para la cuantificación de flavonoides totales en extractos vegetales *10*

1.2.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiencia como metodologia para la cuantificación de flavonoides en plantas y extractos vegetales 12

1.3 Microencapsulación *13*

1.3.1 Microencapsulación de extractos vegetales 17

1.3.2 Secado por aspersión (spray drying) para la obtención de micropartículas 19

1.3.2.1 Aspersión o atomización 21

1.3.2.2 Secado 21

1.3.2.3 Separación 22

1.2.2.4 Variables del proceso de fabricación 22

1.2.2.5 Materiales de recubrimiento 23

2. OBJETIVOS **25**

2.1 Objetivo general *25*

2.2 Objetivos específicos *25*

3.* DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES (FT)Y VITEXINA EN EL EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS DE *P. quadrangularis **27**

3.1 Metodología *27*

3.1.1 Generalidades 27

3.1.2 Material vegetal 28

3.1.3 Obtención del extracto acuoso de hojas de *P. quadrangularis* 28

3.1.4 Desarrollo y validación de metodología analítica para la cuantificación de flavonoides totales y vitexina en un extracto acuoso de hojas de *P. quadrangularis* por CLAE-DAD 28
3.1.4.1 Preparación de muestras 29
3.1.5 Validación de la metodología analítica 30
3.1.5.1 Linealidad y rango 31
3.1.5.2 Exactitud 31
3.1.5.3 Precisión 31
3.1.5.4 Influencia de la matríz 31
3.1.5.5 Límite de detección (LDD) y límite de cuantificación (LDC) 32
3.2 Resultados y discusión 33
3.2.1 Obtención de los extractos 33
3.2.2 Desarrollo de una metodología analítica por CLAE 35
3.2.3 Validación de la metodología analítica 42
3.2.3.1 Linealidad del método y rango 42
3.2.3.2 Precisión 43
3.2.3.3 Exactitud 45
3.2.3.4 Límite de detección y límite de cuantificación 47
3.2.3.5 Influencia de la matríz 48
3.2.4 Cuantificación del contenido de flavonoides totales y vitexina en el extracto acuoso de *P. quadrangularis* 50

4. DISEÑO DE MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CARGADAS CON EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS DE *P. quadrangularis* 53
4.1 Metodología 55
4.1.1 Generalidades 55
4.1.2 Evaluación inicial de factores operacionales y composicionales en la obtención de microparticulas de Eudragit E ® PO cargadas con un extracto acuoso de hojas *P. quadrangularis.* 55
4.1.3 Evaluación adicional de factores operacionales y composicionales en la obtención de microparticulas de Eudragit E PO cargadas con un extracto acuoso de *P. quadrangularis.* 58
4.1.4 Elaboración de micropartículas 58
4.1.5 Caracterización de micropartículas 59
4.1.6 Análisis estadístico 60
4.2 Resultados y discusión 61

5. ENSAYOS PRELIMINARES DE ESTABILIDAD PARA EL EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS DE *P. quadrangularis* LIBRE Y MICROENCAPSULADO 81
5.1 Introducción *81*
5.1.1 Ensayos de estabilidad en condiciones de estrés 81
5.1.2 Ensayos de estabilidad en condiciones de almacenamiento controladas 86
5.2 Metodología *87*
5.2.1 Ensayos de estabilidad en condiciones de estrés 87
5.2.1.1 Hidrólisis ácida 87
5.2.1.2 Hidrólisis básica 87
5.2.1.3 Hidrólisis 88
5.2.1.4 Degradación oxidativa 88
5.2.2 Ensayos de estabilidad en condiciones de almacenamiento controladas 89
5.2.3 Expresión de resultados 90
5.2.3 Análisis estadístico 90
5.3 Resultados y discusión *90*

5.3.1 Ensayos de estabilidad en condiciones de estrés 90
5.3.1.1 Hidrólisis ácida 91
5.3.1.2 Hidrólisis básica 98
5.3.1.3 Hidrólisis a pH neutro 105
5.3.1.4 Degradación oxidativa 111
5.3.2 Ensayos de estabilidad en condiciones de almacenamiento controladas 112

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 125

6.1 Conclusiones 125

6.2 Recomendaciones 126

A. ANEXO: CÓDIGO UTILIZADO PARA EL ANÁLISIS DE DATOS EN EL SOFTWARE R 127

B. ANEXO: HISTOGRAMAS DE DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS PARA EL TAMAÑO DE PARTICULA DE LOS LOTES DE MICROPARTÍCULAS OBTENIDAS 131

7. BIBLIOGRAFÍA 163

Lista de figuras

PÁG

Figura 1-1 Fotografía de hojas, fruto y flores de *P. quadrangularis*..... 6
Figura 1-2 Algunos de los compuestos químicos descritos para las hojas de *P. quadrangularis*..... 8
Figura 1-3 Perfil UV característico de los flavonoides..... 10
Figura 1-4 Tipos de Micropartículas A. Microcápsulas B. Microesferas 14
Figura 1-5 Representación esquematica de la operación unitaria de Secado por Aspersión 20
Figura 3-1 Análisis comparativo de los perfiles cromatográficos de extractos de *P. quadrangularis*..... 34
Figura 3-2 Árbol de decisión para estudios de estrés de fármacos..... 35
Figura 3-3 Gradiente de elución de la fase móvil organica (Fase B) para la cuantificación de flavonoides totales (FT) y vitexina en extracto acuoso de hojas de *P. quadrangularis* 37
Figura 3-4 Cromatograma obtenido para el extracto acuoso de hojas de *P. quadrangularis* crudo..... 38
Figura 3-5 Cromatograma obtenido para el extracto acuoso de hojas de *P. quadrangularis* hidrolizado (Condiciones acidas HCl 0,1 N Reflujo 8h) 39
Figura 3-6 Curva de calibración del estándar externo de vitexina para la cuantificación de Flavonoides Totales y vitexina en el extracto acuoso de hojas de *P. quadrangularis*. ... 43
Figura 4-1 Fórmula estructural de Eudragit E PO 54
Figura 4-2 Influencia de algunos factores sobre el rendimiento de microencapsulación por técnica de secado por aspersión de un extracto acuoso de hojas de *P. quadrangularis*..... 68
Figura 4-3 Influencia de algunas variables sobre la eficiencia de microencapsulación de micropartículas de Eudragit E PO cargadas con un extracto acuoso de hojas de *P. quadrangularis* elaboradas por técnica de secado por aspersión. 69
Figura 4-4 Diagrama de puntos de la influencia de la velocidad de aspersión, contenido de sólidos y proporción copolímero: extracto sobre el rendimiento y la eficiencia de encapsulación de micropartículas de Eudragit E PO, cargadas con un extracto acuoso de *P. quadrangularis.* 76
Figura 4-5 Perfil de liberación de micropartículas cargadas con un extracto acuoso de *P. quadrangularis* (pH 1,2)……80

Figura 5-1 Árbol de decisión para ensayos de estabilidad en condiciones de estrés: hidrólisis ácida y básica..... 83
Figura 5-2 Árbol de decisión para ensayos de estabilidad en condiciones de estrés: hidrólisis 84

Figura 5-3 Ensayos de estabilidad en condiciones de estrés: oxidación 85
Figura 5-4 Abundancia relativa de flavonoides del extracto libre de *P. quadrangularis* durante la hidrólisis acida (HCl 0,1 N) 92
Figura 5-5 Eliminación de la segunda unidad de azúcar de los flavonoides C-O-diglcosidados para convertirse en flavonoides C-glicosidados……..93
Figura 5-6 Abundancia relativa de flavonoides del extracto microencapsulado de P. quadrangularis durante la hidrólisis ácida (HCl 0,1 N)……95
Figura 5 7 Comparación entre el extracto libre y microencapsulado de P. quadrangularis en hidrólisis ácida HCl 0,1 N (Abundancia relativa de cada flavonoide)……96
Figura 7-8 Concentración de flavonoides totales (equivalentes a Vitexina) en hidrólisis ácida (HCl 0,1 N……97
Figura 5 9. Concentración de Vitexina en hidrólisis ácida (HCl 0,1 N)……98
Figura 5 10 Abundancia relativa de flavonoides del extracto libre de P. quadrangularis durante la hidrólisis básica (NaOH 0,1 N)……99
Figura 5-11 Abundancia relativa de flavonoides del extracto microencapsulado de *P. quadrangularis* durante la hidrólisis básica (NaOH 0,1 N)……101
Figura 5 12 Comparación entre el extracto libre y microencapsulado de P. quadrangularis en hidrólisis básica NaOH 0,1 N (Abundacia relativa de cada flavonoide)……102
Figura 5 13 Concentración de flavonoides totales (equivalentes a Vitexina) en hidrólisis basica (NaOH 0,1 N) ……..……103
Figura 5 14 Concentración de Vitexina) en hidrólisis básica (NaOH 0,1 N) ……104
Figura 5 15 Abundancia relativa de flavonoides del extracto libre de P. quadrangularis durante la hidrólisis a pH neutro……106
Figura 5-16 Abundancia relativa de flavonoides del extracto microencapsulado de *P. quadrangularis* durante la hidrólisis a pH neutro……....107
Figura 5-17 Comparación entre el extracto libre y microencapsulado de P. quadrangularis en hidrólisis a pH neutro (Abundacia relativa de cada flavonoide)……109
Figura 5-18 Concentración de flavonoides totales (equivalentes a Vitexina) en hidrólisis a pH neutro……..……110
Figura 5-19 Concentración de vitexina en hidrólisis a pH neutro……..111
Figura 5-20 Abundancia relativa de flavonoides del extracto libre de *P. quadrangularis* durante la monitorización en condiciones de almacenamiento controladas 30ºC y 70%HR……..113
Figura 5-21 Abundancia relativa de flavonoides del extracto microencapsulado de *P. quadrangularis* durante la monitorización en condiciones de almacenamiento controladas 30ºC y 70%HR……114
Figura 5-22 Abundancia relativa de flavonoides del extracto libre de *P. quadrangularis* durante la monitorización en condiciones de almacenamiento controladas 40ºC y 75%HR……..115
Figura 5-23 Abundancia relativa de flavonoides del extracto microencapsulado de *P. quadrangularis* durante la monitorización en condiciones de almacenamiento controladas 40ºC y 75%HR……116
Figura 5-24 Comparación entre el extracto libre y microencapsulado de *P. quadrangularis* en condiciones de almacenamiento controladas (orientina 2”-O-glucósido)……117
Figura 5-25 Comparación entre el extracto libre y microencapsulado de *P. quadrangularis* en condiciones de almacenamiento controladas (orientina 2”-O-xilósido)…. ……...…117

Figura 5-26 Comparación entre el extracto libre y microencapsulado de *P. quadrangularis* en condiciones de almacenamiento controladas (orientina) ……118
Figura 5-27 Comparación entre el extracto libre y microencapsulado de *P. quadrangularis* en condiciones de almacenamiento controladas (vitexina 2”-O-glucósido)… ……119
Figura 5-28 Comparación entre el extracto libre y microencapsulado de *P. quadrangularis* en condiciones de almacenamiento controladas (vitexina 2”-O-glucósido)… ……120
Figura 5-29 Comparación entre el extracto libre y microencapsulado de *P. quadrangularis* en condiciones de almacenamiento controladas (vitexina)……..121

.

Lista de tablas

PÁG.

Tabla 1-1 Ventajas y desventajas de algunas metodologías de microencapsulación (cuadro comparativo)..... 15
Tabla 1-2 Reportes relevantes de sistemas microparticulados para algunos extractos vegetales..... 18
Tabla 3-1 Rendimiento de obtención del extractoacuoso de hojas de *Passiflora quadrangularis*..... 33
Tabla 3-2 Factor de capacidad para cada uno de los flavonoides en el método propuesto para el extracto de hojas *P. quadrangularis* crudo y enriquecido con estándares de vitexina y orientina……...41

Tabla 3-3 Resolución para cada uno de los flavonoides en el método propuesto para el extracto de hojas *P. quadrangularis* crudo y enriquecido con estándares de vitexina y orientina……...42
Tabla 3-4 Parámetros estadísticos determinados para evaluar la linealidad del sistema cromatográfico para la cuantificacion de flavonoides totales y vitexina en el extracto acuoso de hojas de *P. quadrangularis*..... 42
Tabla 3-5 Evaluación de la repetibilidad del método propuesto para la cuantificación de flavonoides totales y vitexina en el extracto acuoso de hojas de *P. quadrangularis.* (Estándar: vitexina) 44
Tabla 3-6 Evaluación de la precisión intermedia del método propuesto para la cuantificación de flavonoides totales y vitexina en el extracto acuoso de hojas de *P. quadrangularis.*(Estándar: vitexina) 45
Tabla 3-7 Evaluación de la exactitud del método propuesto para la cuantificación de flavonoides totales y vitexina en el extracto acuoso de hojas de *P. quadrangularis* (Estándar: vitexina) 46
Tabla 3-8 Porcentajes de recuperación calculados del sistema propuesto para la cuantificación de flavonoides Totales y vitexina en el extracto acuoso de hojas de *P. quadrangularis* (Estándar: vitexina) 46
Tabla 3-9 LDD y LDC Calculados para el sistema propuesto para la cuantificación de Flavonoides totales y vitexina en el extracto acuoso de hojas de *P. quadrangularis* 47
Tabla 3-10 Parámetros de las curvas de calibración para la influencia de la matriz. 48
Tabla 3-11 Prueba de t-student para las pendientes de las curva de calibración..... 49

Tabla 3-.12 Resultados de la cuantificación de flavonoides totales y vitexina en el extracto acuoso de P. quadrangularis……...50
Tabla 4-1 Diseño experimental utilizado para la evaluacion inicial de factores en elaboración de micropartículas de Eudragit ® E PO cargadas con un extracto acuoso de hojas de *P. quadrangularis*.....57
Tabla 4-2 Diseño experimental utilizado para la evaluación adicional de variables de entrada en la elaboración de micropartículas de Eudragit ® E PO cargadas con un extracto acuoso de hojas de *P. quadrangularis*.....58
Tabla 4-3 Parámetros de tamaño y distribución de tamaño de partícula de las micropartículas de Eudragit ® E PO, cargadas con un extracto acuoso de *P. quadrangularis*, obtenidas por secado por aspersión. 61
Tabla 4-4 Rendimiento y eficiencia de encapsulación de micropartículas poliméricas de *P. quadranqularis* obtenidas por secado por aspersión. Fase I 63
Tabla 4-5 Rendimiento y eficiencia de encapsulación de micropartículas de Eudragit ® E PO cargadas con un extracto acuoso de *P. quadrangularis*, obtenidas por secado por aspersión. Fase II 75
Tabla 4-6 Parámetros de tamaño y distribución de tamaño de partícula de las micropartículas de Eudragit ® E PO, cargadas con un extracto acuoso de *P. quadrangularis*, obtenidas por secado por aspersión Fase II 78
Tabla 4-7 Rendimiento y eficiencia de encapsulación de microparticulas elaboradas con Eudragit E ® PO cargadas con un extracto acuoso de hojas de *P. quadrangularis,* bajo las condiciones seleccionadas 79
Tabla 5-1 Clasificación cualitativa de estabilidad para hidrólisis ácida y básica 85
Tabla 5-2 Clasificación cualitativa de estabilidad para hidrolisis a pH neutro 86
Tabla 5-3 Clasificación cualitativa de estabilidad para degradación oxidativa 86

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviatura/Símbolo	Término
%p/v	Porcentaje peso a volumen
%p/p	Porcentaje peso a peso
CA	Caudal de Aire
Cf	Cantidad final
CLAE	Cromatografía Líquida de Alta eficiencia
Co	Cantidad Inicial
Conc	Concentración
CV	Coeficiente de Variación
DE	Desviación Estándar
DER	Desviación Estándar Relativa
Dvs	Diámetro Volumen-Superficie
EE%	Eficiencia de encapsulación
Gl(gl)	Grados de Libertad
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
i.d.	Diámetro interno
ICH	International Conference on Harmonization
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
Lm	Modelo lineal
LOD	Límite de Detección
LOQ	Límite de Cuantificación
Max	Máximo
Mf	Peso Final
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mm	milimetro
Mo	Peso Inicial
MP	Micropartículas
N	Normalidad
N	Número de datos
NA	No Aplica
Nm	nanómetro
ºC	Grados Celsius
P	Poporción Polimero Extracto
PLA	Ácido Poliláactico
PLGA	Ácido poli láctico-co-glicólico

Abreviatura/Símbolo	Término
R%	Rendimiento
Rta	Respuesta
T	Temperatura
t cal	Valor t calculado
t tab	Valor t tabulado
VA	Velocidad de Aspersión
VAG	Contenido de Sólidos
λ	Longitud de onda
µg	Microgramo
µm	Micrómetro

Introducción

Colombia es considerado uno de los doce países megadiversos del mundo, ya que con una extensión terrestre del 0.7% de la superficie del planeta, alberga alrededor del 10% de la fauna y flora del mundo (Instituto de Investigación en Recursos Biológicos Alexander von Humbolt, 2008). Esta condición enmarcada en los convenios internacionales firmados, como el Convenio de Diversidad Biológica y el Protocolo de Nagoya (Convention on Biological Diversity, 2012; Convention on Biological Diversity, 2013), propone una amplia investigación en pro del desarrollo y uso sostenible de la biodiversidad, sumado a la protección y reconocimiento de los conocimientos de las comunidades que la han usado tradicionalmente.

En este sentido, ha sido observada una ascendente demanda de productos naturales, debido a la creciente investigación en este campo y al gran interés de parte de los consumidores. En el área de plantas medicinales, las investigaciones se dirigen principalmente a: la comprobación biológica de los reportes etnomedicinales de plantas usadas tradicionalmente, la definición de las condiciones requeridas para obtener extractos estandarizados derivados de estas plantas, la caracterización química de los metabolitos presentes en los extractos, la identificación de compuestos con actividades biológicas promisorias y también para lograr asegurar su calidad en el mercado y a la adecuación tecnológica que permita a incorporación de extractos en algunas formas farmacéuticas (Rates, 2001; Cañigueral et al., 2003; Sahoo et al., 2010; Sen et al., 2011).

Uno de los principales retos para el desarrollo de productos derivados de plantas medicinales es el aseguramiento de su calidad. Para ello es de vital importancia controlar múltiples variables a través de toda la cadena de abastecimiento y fabricación. Este control debe realizarse por medio de marcadores propios de cada planta y producto (Sahoo et al., 2010).

En Colombia, el decreto 2266 de 2004 ha definido como fitoterapéutico el producto medicinal empacado y etiquetado, cuyas sustancias activas provienen de material de la planta medicinal o asociaciones de estas, presentado en estado bruto o en forma farmacéutica que se utiliza con fines terapéuticos; también puede provenir de extractos, tinturas o aceites, el producto fitoterapéutico no podrá contener en su formulación principios activos aislados y químicamente definidos, adicionalmente este decreto aclara que los productos obtenidos de material de la planta medicinal que haya sido procesado y obtenido en forma pura no será clasificado como producto fitoterapéutico. Esta reglamentación además refiere a las sustancias activas como los ingredientes de los productos fitoterapéuticos que tienen actividad terapéutica y establece que en el caso de los productos fitoterapéuticos cuyas sustancias activas hayan sido identificadas, se debe normalizar su preparación si se dispone de métodos analíticos adecuados que los cuantifiquen estableciendo que deben hacer parte del control de calidad de materia prima y producto terminado en la producción industrial; en cambio en los casos en que no se puedan identificar las sustancias activas, se puede considerar que todo el material de la planta medicinal o su preparación constituyen la sustancia activa. La comercialización del los productos fitoterapéuticos sólo puede realizarse bajo la autorización de un registro sanitario, en la que se debe entregar a la agencia sanitaria entre otros; los certificados de análisis del control de calidad del material de la planta medicinal que deberán incluir ensayos de autenticidad (caracterización organoléptica, identificación macroscópica y microscópica), ensayos físicoquímicos que garanticen pureza e integridad incluyendo identificación mediante perfil cromatográfico, metales pesados según recomendaciones de OMS, pesticidas, ensayos microbiológicos y otras determinaciones establecidas en los textos de referencia oficialmente aceptadas en Colombia; las técnicas de análisis del producto (de los textos de referencia ó la documentación que sustente la metodología empleada incluida la validación del método); estudios de estabilidad sustentando la vida útil del producto terminado; y los certificados de análisis del patrón de referencia o marcador o huella digital utilizados para el control de calidad del material de la planta medicinal (Ministerio de la Protección Social, 2004). Por todos los requerimientos regulatorios anteriormente expuestos, es de vital importancia generar información que pueda contribuir al control de calidad de productos fitoterapeuticos derivados de plantas medicinales.

Para el género Passiflora la especie más usada en productos fitoterapéuticos es *Passiflora incarnata,* esta planta esta listada en el Martindale (The Extra pharmacopoeia) como sedativo y antiespástico, su uso en productos fitoterapéuticos se encuentra aceptado en 24 paises, su actividad ansiolítica ha sido aceptada por varias instituciones dentro las que se destacan, el British herbal Compendium y la German Commission (Kaviani et al., 2013). Cabe resaltar que en Colombia se comercializan productos fitoterapéuticos derivados de plantas del género Passiflora, específicamente de las especies *Passiflora mollisima* y *Passiflora incarnata* (Guevara et al. 2010). Estas dos especies están incluidas en textos aceptados en la legislación colombiana como referencia; se hace importante por tanto resaltar y apoyar con diversos estudios nuevas especies de Passiflora para evaluar si su uso como plantas medicinales es relevante.

Entre las especies vegetales destacadas en el campo de plantas medicinales del género Passiflora, se encuentra *Passiflora quadrangularis* Linn., planta distribuida principalmente en Suramérica, presente en varios departamentos de Colombia, conocida comúnmente como badea o tumbo gigante (Ocampo Pérez et al., 2007) cuyo fruto es usado como alimento y comercializado para tal fin. La badea es una planta cuyas hojas se han usado tradicionalmente en la medicina popular como tranquilizante y a la cual se le han realizado algunos estudios para evaluar su actividad farmacológica sobre el sistema nervioso central (Castro et al, 2007; Gazola, 2012) y como terapia antihemorrágica en los casos de mordedura de la serpiente *Bothrops atrox* (Otero et al., 2000). El extracto acuoso de las hojas de esta planta ha sido objeto de caracterización química y existen varios compuestos que han sido aislados e identificados (Sakalem et al., 2012; Costa et al., 2013). El uso de las hojas de estás plantas puede contribuir a dar valor agragado al cultivo de la misma (a pesar de ser el cultivo con menor participación dentro de las especies de Pasifloras cultivadas en Colombia) (CEPASS Huila, 2010), ya que uno de los subproductos agroindustriales de este son las hojas, que en el mejor de los casos es usado como compostaje actualmente.

En lo que respecta a la microencapsulación, ésta técnica se ha usado con diferentes fines entre ellos el de modificar la liberación de sustancias activas, bien sea mediante la modulación de la velocidad liberación o mediante su direccionamiento a sitios específicos; así como para proteger las moléculas de factores externos, evitando reacciones de degradación. Adicionalmente, esta técnica posibilita el enmascaramiento de propiedades organolépticas no deseadas (Lopretti et al., 2007). En cuanto al secado por aspersión

(Spray-Drying), este se ha utilizado para microencapsular extractos vegetales de diversas fuentes, obteniendo partículas sólidas que tienen varias ventajas sobre sus precursores sin microencapsular, dentro de las que se destaca una liberación controlada o modificada, una mayor estabilidad y la posibilidad de incorporación en formas farmacéuticas como cápsulas o tabletas (Gharsallaoui et al., 2007). Al iniciar este trabajo investigativo se propuso contribuir al diseño de un sistema microparticulado elaborado utilizando secado por aspersión con el objetivo de mejorar la estabilidad del extracto frente algunas condiciones de estrés y de almacenamiento controladas.

De manera general, en este documento se presentan los resultados de la evaluación de algunas variables del proceso de obtención de micropartículas elaboradas con Eudragit ® E PO cargadas con el extracto acuoso de las hojas de *P. quadrangularis*, como parte de un aporte al diseño de un sistema microparticulado, cuya elaboración se basa en el método de Secado por Aspersión o Spray Drying. Previo a esto, fue necesario el desarrollo de una metodología analítica que permitiese la cuantificación de flavonoides, como los constituyentes de interés del extracto. Esta metodología se desarrolló por Cromatografia Líquida de Alta Eficiencia (CLAE) en fase reversa, mediante la construcción de un método de cuantificación por estándar externo, usando el flavonoide vitexina como patrón. Adicionalmente, se reportan los resultados de la evaluación de estabilidad comparativa entre el sistema microparticulado y el extracto libre, en condiciones de estrés y de almacenamiento controladas.

Este trabajo se realizó en los grupos de investigación de Tecnología en Productos Naturales, TECPRONA y Sistemas de Liberación de Moléculas Biólogicamente Activas, SILICOMOBA, del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia.

1. Marco teórico

1.1 *Passiflora quadrangularis* Linn.

La familia Passifloraceae es una familia de fanerógmas tropical, dentro de la cual se encuentran las subfamilias Malesherbioideae, Passifloroideade y Turneroideade, con alrededor de 17 géneros diferentes (USDA, 2015), dentro de los que se destaca el género *Passiflora* que comprende más de 500 especies, que se distribuyen principalmente en América, pero además en Asia, Australia y algunas regiones de África (Dhawan et al., 2004). Varias de estas especies se han utilizado tradicionalmente como plantas medicinales y algunos de sus frutos son comestibles y se usan en la preparación de bebidas y alimentos (Barrett, 1994; Carvajal et al., 2014). Las plantas de este género crecen en climas tropicales y subtropicales, son arbustos o plantas herbáceas de tallo maderable o herbáceo, generalmente enredaderas y raramente arborecentes, poseen pedúnculos de tres brácteas, tienen una estructura floral diferencial respecto a otros géneros, son bisexuales o unisexuales, tienen un receptáculo largo que generalmente sobresale en forma de copa, rodeado de reborde desde plano a muy filamentoso, algunas poseen apéndice de diferente tamaño y color. El género *Passiflora* poseé una gran variedad de fitoconstituentes dentro de los que se encuentran alcaloides, fenoles, flavonoides y algunos compuestos cianogénicos (Dhawan et al., 2004). Cabe resaltar que Colombia es uno de los países con el mayor número de especies de este género, con 137 especies diferentes, distribuidas en las cinco regiones del país, con una alta diversificación en la región Andina, se considera que 48 especies son endémicas y 5 de ellas han sido catalogadas como extintas (Hernandez y Bernal, 2000).

Una de las especies del género es *P. quadrangularis* (conocida comúnmente en Colombia como badea, en Brasil como maracuyá-gigante ó maracuja-assu, en Centroamérica como

tumbo gigante ó granadilla grande y en países de habla inglesa como giant passion fruit), es una planta nativa que crece entre los 0 y los 1500 m de altitud, en áreas no inundables. En Colombia se distribuye en varios departamentos dentro de los cuales se incluyen Amazonas, Antioquia, Bolívar, Cauca, Caldas, Chocó, Caquetá, Cundinamarca, Guainía, Huila, Magdalena, Meta, Nariño, Norte de Santander, Quindío, Vaupés, Vichada, Risaralda, Santander, Tolima y Valle del Cauca (Ocampo Pérez et al., 2007).

El fruto de esta planta es el más grande de todas las Passifloraceas, de 10 a 30 cm de largo, 7 a 15 cm de diámetro; de cáscara delgada amarillo verdoso, pulpa gruesa esponjosa, jugosa, de gusto dulce, de color blanco, de 2,5 cm de grueso aproximadamente. Semillas duras, aplanadas, obovadas, con arilo de color salmón traslúcido, jugoso y sub-ácido. Hojas ovaladas de color verde claro, cordadas en la base, lanceoladas, de 10 a 20 cm de largo y 8 a 16 cm de ancho, de ápice abruptamente acuminado, de bordes enteros y ondulados. El peciolo tiene tres aristas, la inferior más desarrollada y tres pares de glándulas nectaríferas. Pedúnculo solitario en las de axilas 1,5 a 3 cm de largo. Flores de unos 12 cm de diámetro de color blanco, azul, violáceo, rojo y rosado (CEPASS Huila, 2011). En la Figura 1-1, se puede observar una foto del fruto, las hojas y la flor de esta planta.

Figura 1-1 Fotografía de hojas, fruto y flores de *P. quadrangularis*

Tomado de: CEPASS HUILA (2011).

1.1.1 Caracterización química de *Passiflora quadrangularis*

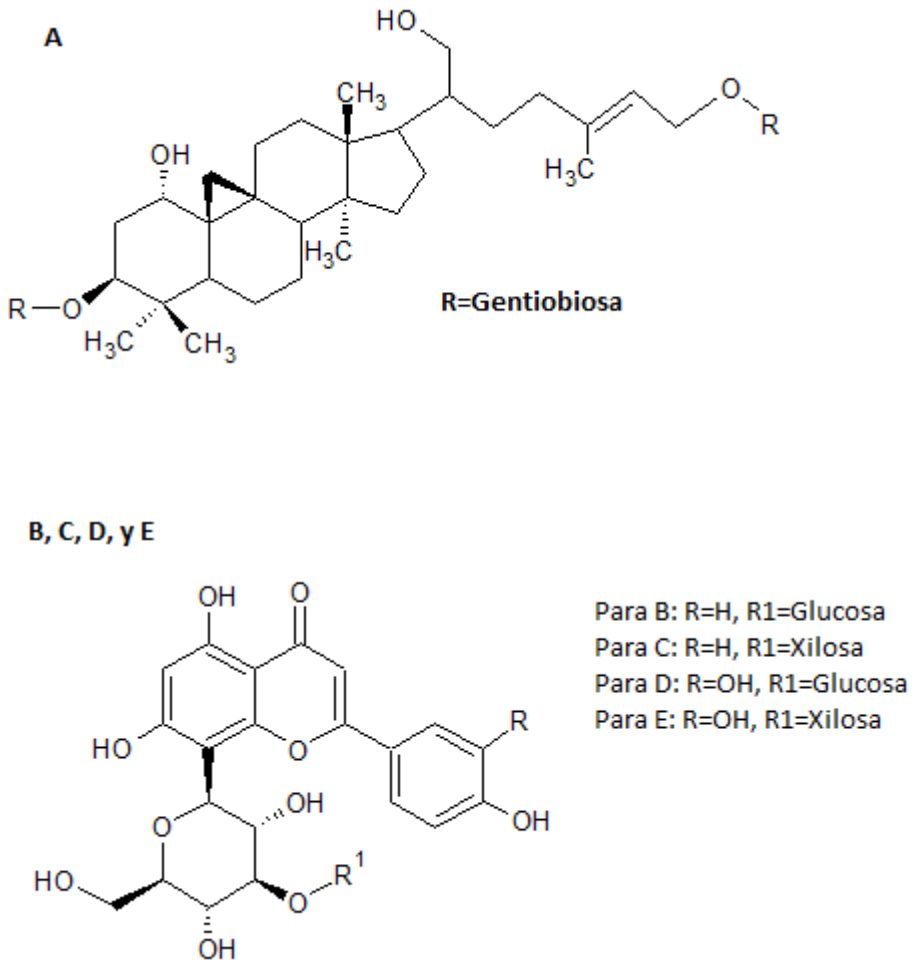
Se han realizado varios estudios fitoquímicos que han permitido identificar diversos compuestos de *P. quadrangularis.* En este apartado se describen los principales hallazgos de esta especie, aclarando que su exploración no ha sido tan amplia en comparación con otras especies, tales como *P. edulis* y *P. incarnata.* Incluso el número de reportes es menor en comparación con otras especies del mismo género. Entre las principales clases de metabolitos descritas para esta especie, se destacan los flavonoides y saponinas. Respecto a las saponinas, a partir de extractos metanólicos de las hojas de esta planta fue aislada una saponina denominada quadrangulósido (Figura 1-2) (Orsini et al., 1985), un glicósido triterpénico de núcleo cicloartano, que también se ha encontrado posteriormente en *P.alata* (Reginatto et al., 2004). En investigaciones adicionales se han descrito otras saponinas con el mismo tipo de núcleo, además de saponinas de núcleo oleanólico, como el ácido 3-soforósido oleanólico (Orsini et al., 1985). Recientemente, algunas saponinas como ácido ciclopassifólico arabinosil diglicosido, ácido ciclopassifólico III ramnhosido, ácido ciclopassifólico III, fueron identificadas por CLAE-MS/MS, por medio de sus valores de masas y su patrón de fragmentación (Sakalem et al., 2012). Así mismo, en la pulpa del fruto fueron identificados varios compuestos monoterpénicos: ácido (2E)-2,6-dimetil-2,5-heptadienoico, ácido (2E)-2,6-dimetil-2,5-heptadienoico -D- glucopiranosiléster, (5E) -2,6-dimetil-5,7-octadien-2,3-diol, (3E) -3,7-dimetil-3-octen-1,2,6,7-tetrol;2,5-dimetil-4-hidroxi-3(2H)-furanona β–D-glucopiranósido (Osorio et al., 1999).

Además de saponinas, algunos flavonoides también fueron identificados en las hojas de esta especie por medio de CLAE-MS/MS, como orientina-2''-*O*-xilósido, vitexina-2”-*O*-glucósido, vitexina-2”-*O*-xilósido (Sakalem et al., 2012).

Costa investigó la composición química de diferentes especies del género *Passiflora*, presentes en Brasil y Colombia, mediante técnicas cromatográficas, con énfasis en aminoácidos, flavonoides y saponinas a partir del extracto acuoso de hojas. Para el caso particular de *P. quadrangularis*, por medio de Cromatografía en Capa Delgada (CCD), identificó la presencia de los aminoácidos alanina, prolina, ácido glutámico y ácido γ-amino-butírico. Mediante Cromatografía de Contracorriente de Alta Velocidad (CCCAV), aisló 4

flavonoides *C*-*O*-diglicosidados, los cuales identificó por medio de técnicas espectroscópicas y espectrométricas como vitexina-2”-*O*-glucósido, vitexina-2”-*O*-xilósido, orientina-2”-*O*-glucósido y orientina-2”-*O*-xilósido. Adicionalmente, también aisló tres saponinas que fueron elucidadas como 3-O-β-D-glicopiranosil-9,19-ciclolanost-24Z-en-1α,3β,21,26-tetraol y 3-O-β-D-glicopiranosil-9,19- ciclolanost-24Z-en-1β,3β,21,26-tetraol, 3-O-β-D-glicopiranosil-(1→2)-β-D-glicopiranosídeo del ácido oleanólico, e identificó el quadrangulósido (Costa, 2013).

Figura 1-2 Algunos de los compuestos químicos descritos para las hojas de *P. quadrangularis*



A: quadrangulósido B: vitexina 2”*O*-glucósido C: vitexina 2 ”*O*-xilósido D: Orientina 2”*O*-glucósido E: orientina 2 ”*O*-xilósido

1.1.2. Actividades farmacológicas descritas para *P. quadrangularis*

A continuación se resumen brevemente algunas de las diversas actividades farmacológicas que se han reportado para esta planta.

Okamoto et al. observaron que compuestos aislados (dentro de los que se encuentra vitexina) de *P. quadrangularis* presentan inhibición de la Enzima Convertidora de Angiotensina (iECA), e inhibición de la Aldosa Reductasa, ambas *in vitro,* lo que indica una posible actividad terapéutica como antihipertensivos (Okamoto et al., 1994).

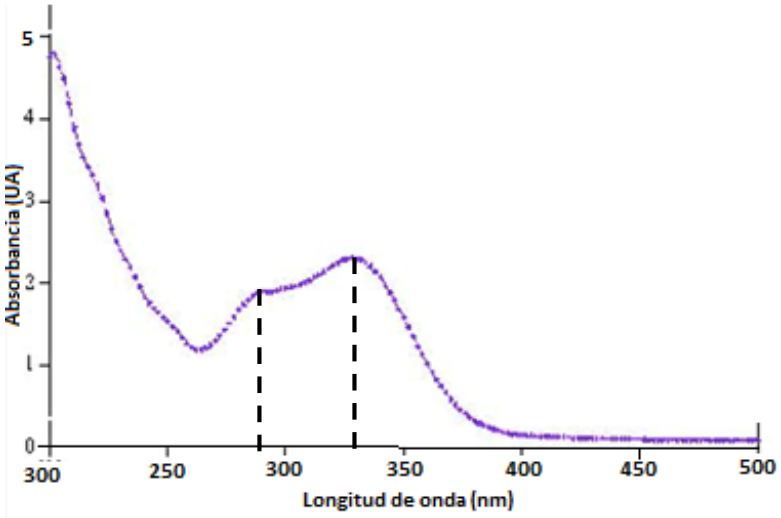
Otero et al. realizaron una investigación del efecto neutralizante antihemorrágico de varios extractos de plantas usados tradicionalmente en varias regiones de Colombia contra la mordedura de serpientes, su modelo consistió en una administración oral a ratones Swiss Webster del extracto acuoso posterior a una exposición al veneno de *Bothrops atrox* (vía i.d.); encontrando actividad del extracto acuoso de hojas y ramas de *P. quadrangularis* (Otero et al., 2000).

Castro et al. reportaron el posible efecto ansiolítico de extractos hidro-alcohólicos de las hojas de esta planta en ratas *Wistar* en dosis de 100, 250, y 500 mg/kg. La actividad fue evaluada mediante el test de campo abierto en donde se observó el aumento del tiempo de deambulación y erguimiento. Adicionalmente, mediante el test de laberinto en cruz elevado, observaron un aumento del tiempo de permanencia del animal en los brazos abiertos; parámetros que indican un efecto ansiolítico del extracto (Castro et al., 2007). En un trabajo posterior, Gazola observó actividad sedante del sistema nervioso central de los extractos acuosos de varias especies de *Passiflora*, siendo activos los extractos acuosos de la pulpa de *P. ligularis,* de los pericarpios de *P. alata* y *P. quadrangularis* y de las hojas de *P. edulis* var. edulis, *P. manicata* y *P. quadrangularis,* siendo esta última la que presentó mayor actividad. Con base en esos resultados, se realizó un fraccionamiento bioguiado del extracto acuoso de las hojas de *P. quadrangularis*, del cual se obtuvieron tres fracciones enriquecidas en flavonoides, saponinas y aminoácidos respectivamente. La actividad sedante solo se observó en la fracción enriquecida en flavonoides. Posteriormente, se determinó que el flavonoide mayoritario de esta fracción, identificado como vitexina-2”-*O*-xilósido, también presentó actividad sedante (Gazola, 2012).

1.2 Principales técnicas para la cuantificación de flavonoides totales en extractos vegetales

Los flavonoides presentan un espectro de absorción característico, con dos bandas de máxima absorción, una en el rango de 240 a 285 nm (correspondiente al anillo cinamoilo) y otra entre 300 y 550 nm (debido al anillo benzoilo), dependiendo del grado y tipo de sustitución de los anillos, por lo cual son suceptibles de cuantificación mediante espectofotometría UV (Figura 1-3) (Bohm, 1999).

Figura 1-3 Perfil UV característico de los flavonoides



Las principales estrategias reportadas para la cuantificacion de flavonoides totales en muestras de matrices complejas como los extractos vegetales, se basan en técnicas de espectrofotometría ultravioleta/visible mediante reacciones colorimétricas, debido a que los flavonoides tienen una estructura general de 3 anillos, siendo 2 aromáticos, que suelen contener al menos tres hidroxilos fenólicos, lo que facilita su clasificación y reactividad selectiva a compuestos como el cloruro de aluminio ($AlCl_3$), ó 2,4-dinitrofenilhidrazina. Las flavonas y flavonoles, forman complejos estables con el cloruro de aluminio y son susceptibles de analizar mediante espectrofotometría ultravioleta-visible a 415 nm, mientras que las flavanonas y flavanonoles forman complejos más estables con la 2,4-Dinitrofenilhidrazina, que absorben a 495 nm.

Sin embargo, estas metodologías analíticas están limitadas en cuanto a la información que suministran, ya que por su fundamento hacen imposible la diferenciación de los compuestos contenidos en una muestra y pueden generarse imprecisiones al cuantificar compuestos diferentes a los flavonoides que son capaces de reaccionar con los aditivos de la metodología, como compuestos fenólicos hidroxilados. Por lo anterior se han empleado otros métodos analíticos que buscan una mejor precisión tales como cromatografía de capa delgada de alta eficiencia y cromatografía líquida de alta eficiencia. Los ejemplos citados aportan información definitiva en la caracterización de las muestras, pero presentan limitaciones importantes debido a los costos de funcionamiento y la participación de personal capacitado (Salamanca, 2007).

Algunos autores han demostrado que la CLAE tiene como ventaja la separación de los flavonoides contenidos en una muestra de origen vegetal. Por ejemplo, en la investigación llevada a cabo por He et al., se reportó una cuantificación de flavonoides totales mediante espectofotometría UV utilizando $Al(NO_3)_3$ como reactivo para formar complejos, además de la separación y posterior cuantificación de dos de ellos (quercetina y plumbagina) mediante CLAE. Ambas metodologías son propuestas por los autores para el control de calidad de derivados de *Drosera peltata Smith var. glabrata* Y.Z.Ruan, mostrando que la metodología de CLAE-FR permite separar los flavonoides contenidos en la muestra (He et al., 2012). En una investigación llevada a cabo sobre *Bauhinia forficata* Link, Marques et al., compararon los resultados de la cuantificación de flavonoides en extractos hidroalcohólicos de las hojas de esta planta mediante espectrofotometría UV/Visible y CLAE, encontrando que ambos métodos son válidos para llevar cuantificaciones rutinarias y que guardan relaciones lineales en sus resultados. Sin embargo, presentan algunas desviaciones estadísticamente aceptables que pueden ser atribuidas a que dada la naturaleza compleja de la muestra que contiene diversos flavonoides, mediante la espectrofotometría se pueden cuantificar algunos flavonoides que no están presentes en el cromatograma obtenido por CLAE adicional a los errores sistemáticos propios de cada metodología (Marques et al., 2013).

1.2.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiencia como metodología para la cuantificación de flavonoides en plantas y extractos vegetales

La cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) es una de las metodologías más utilizadas para la separación y cuantificación de diversos tipos de compuestos y se puede utilizar en una amplia gama de sustancias, entre ellas, los metabolitos secundarios vegetales (Lazarowych y Pekos, 1998; AEFI, 2001).

Se reconocen en general diferentes tipos de cromatografia líquida de alta eficiencia, de forma global su clasificación depende de la forma como se realiza la separación: en primer lugar la cromatografía basada en la adsorción, en la cual los procesos de separación se basan en fenomenos de adsorción y desorción, en ella se encuentran dos subcategorías, la cromatografía en fase reversa (donde la fase estacionaria es de carácter apolar y la fase móvil es polar) y la cromatografía en fase normal (donde la fase móvil es de característica apolar y la fase estacionaria es polar). En segundo lugar, la cromatografía basada en el intercambio iónico, donde las interacciones de tipo iónico permiten una adecuada separación y en tercer lugar la cromatografía de exclusión por tamaño en donde la separación se basa en el tamaño molecular de los analitos presentes (Kazakevich, 2007).

Con el fin de garantizar que la metodología por CLAE asegure resultados confiables, veraces y reproducibles, los métodos analíticos, en especial aquellos con fines cuantitativos, deben ser previamente validados, antes de su utilización. Los parámetros de validación suelen incluir selectividad, linealidad, precisión, exactitud, límites mínimos de cuantificación y de detección (AEFI, 2001).

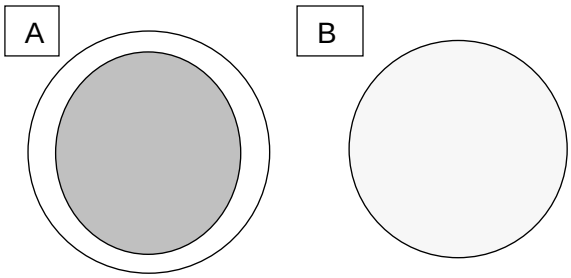
Algunos autores han usado la cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) para la cuantificación tanto de compuestos incluidos en la matrices analizadas como para la cuantificación de grupos de compuestos similares (familias de compuestos como flavonoides, fenoles, etc.). Por ejemplo Zeraik y Yariwake, quienes reportaron una validación de metodología analítica para la cuantificación de isoorientina y flavonoides totales en pulpa de frutos de *Pasiiflora edulis* mediante CLAE-DAD en la cual, la cuantificación de flavonoides totales se realizó con el proposito de utilizarlo como análisis de control de calidad de la pulpa y la cuantificación de isoorientina como marcador para la optimización de la extracción de flavonoides (Zeraik y Yariwake, 2010). Endale et al.

realizaron una aproximación similar en busca de un método para el control de calidad de tabletas que contienen extracto de *G. lotoides,* usando vicenina-2 como estándar para la cuantificacion de flavonoides totales y de la propia vicenina-2 contenida en el extracto usado en la elaboración de las tabletas (Endale et al., 2005). An et al. utilizaron CLAE-DAD para la cuantificación simultánea de 18 compuestos en hojas de *Apocynum venetum* dentro de los cuales se encuentran 17 flavonoides, el obejetivo del estudio fue establecer diferencias con *Pocynum hendersonii* una planta usada para adulterar material vegetal auténtico. En este estudio se resalta la importancia de la utilización de CLAE ya que permite diferenciar las dos plantas por sus perfiles cromatográficos distintos (An et al., 2013). Por otro lado Karioti et al., cuantificaron flavonoides en preparaciones acuosas y tinturas de inflorecencias de plantas de la familia, en este trabajo se resalta la importancia de identificar marcadores para su uso en la identificación y control de calida rutinario de las plantas (Karioti et al., 2014).

1.3 Microencapsulación

La microencapsulación es definida como un proceso en el cual partículas o gotas finas son rodeadas por un agente de recubrimiento o son embebidas dentro de una matríz homogénea o heterogénea, generando partículas de tamaño micrométrico (Muñoz-Celaya et al., 2012). Dependiendo de la partícula obtenida se le da a ésta la denominación de microcápsula o microesfera. En el primer caso el material de naturaleza sólida o líquida se encuentra completamente cubierto por una fina capa del material de recubrimiento, en el caso de microesferas el material queda disperso dentro de una matriz del material de microencapsulación (Figura 1-4). El obtener uno u otro tipo de micropartícula dependerá de la metodología utilizada y las propiedades fisicoquímicas de los materiales usados (Rosas y Pedraz, 2007).

Figura 1-4 Tipos de Micropartículas A. Microcápsulas B. Microesferas



Existen diferentes metodologías de microencapsulación y día a día se generan nuevas metodologías o se realizan modificaciones a cada una de ellas con el fin de optimizar los rendimientos u obtener características definidas en el producto final. Dentro de las más usadas y estudiadas se encuentran: coacervación, spray drying (secado por aspersión), spray cooling (enfriamiento por aspersión), evaporación del solvente, precipitación *in-situ*. La elección de la metodología, dependerá de las características deseadas y las propiedades fisicoquímicas del material a encapsular (Masters, 1990; Rosas y Pedraz, 2007).

En la Tabla 1-1 se presentan ventajas y desventajas de algunas metodologías de microencapsulación (adaptado de Estevinho et al., 2013). En esta tabla los autores han propuesto la comparación en caracteristicas como la naturaleza hidrofílica, hidrofóbica, o anfifílica de los ingredientes; el tamaño de partícula de la muestra, y han asignado a cada metodología una valoración cualitativa que pretende describir y comparar si el uso de un material es viable, inviable o representa un reto, durante la elaboración de micropartículas.

Tabla 1-1 Ventajas y desventajas de algunas metodologías de microencapsulación (cuadro comparativo).

		Lecho Fluidizado	**Coacervación**	**Spray Drying**	**Spray Cooling**	**Disco giratorio**	**Liposomas**
Naturaleza de los ingredientes	Hidrófilo	Viable	Reto	Viable	Viable	Viable	Viable
	Lipófilo		Viable	Viable	Inviable	Inviable	
	Anfifílico		Reto	Reto	Reto	Reto	
	Sólido		Viable		Viable	Viable	Inviable
	Líquido	Inviable		Viable	Reto	Reto	Viable
	más de 100 mcm	Viable		.	Viable	Viable	
	menos de 100 mcm	Inviable		.			.
Costo en uso		Medio	Alto	Bajo	Muy bajo	Medio	Alto
Capacidad de producción	Producción por lotes	1 T	0,5 T	-	-	-	-
	Contínua	-	-	2 T/h	5 T/h	1 T/h	0,5 T /h

(Adaptado de Estevinho et al., 2013)

Los materiales usados para la microencapsulación son muy variados. Sin embargo, se destacan los polímeros, las ceras y algunos azúcares, siendo los primeros los más utilizados. Estos pueden ser de diferentes tipos: polímeros naturales, polímeros sintéticos y polímeros semi sintéticos (Lopretti et al., 2007). La microencapsulación en polímeros de barrera o de cubierta, o la inclusión en una matríz polimérica reducen la humedad en sustancias higroscópicas y actúa como una barrera física que impide el acceso de oxígeno y pequeñas moléculas, inhibiendo degradaciones químicas y enzimáticas (Wang et al., 2009).

La microencapsulación es uno de los procesos de transformación de materiales más importantes que permite modificar la liberación de sustancias, empleando una grande variedad de excipientes. Sin este proceso el uso de algunos materiales sería inviable desde

el punto de vista tecnológico. La microencapsulación es una técnica utilizada en la obtención de productos finales o intermediarios para la elaboración de medicamentos, fitoterapéuticos, alimentos, aditivos, saborizantes, colorantes, fragancias, vacunas, cosméticos, dispositivos médicos, textiles e incluso en aplicaciones para la agricultura. Algunas ventajas de microencapsular son (Rosas y Pedraz, 2007; Estevinho et al., 2013):

- → Disminuye la reactividad de las sustancias encapsuladas al disminuir el contacto con factores externos
- → Modifica la velocidad liberación de la sustancia encapsulada
- → Facilita el manejo y almacenamiento
- → Enmascara propiedades no deseadas
- → Protege de pérdidas en algunos procesos industriales
- → Puede dirigir la liberación a un sitio específico

Las micropartículas obtenidas deben ser caracterizadas para guiar el diseño de procesos para su obtención o para vigilar su escalamiento. A continuación se enumeran las pruebas de caracterización más comunes (Calero et al., 2008):

- → Tamaño de partícula
- → Forma y superficie de partícula
- → Rendimiento del proceso
- → Eficiencia de microencapsulación
- → Liberación *in vitro*
- → Liberación *in vivo*

1.3.1 Microencapsulación de extractos vegetales

Los productos fitoterapéuticos estándarizados son comercializados generalmente en formas farmacéuticas líquidas, preparaciones viscosas y también como formas farmacéuticas sólidas que resultan de procesos de transformación de materiales que incluyen el secado y trituración de plantas o el secado y/o micro-encapsulación de un extracto. Los extractos secos son elaborados secando o micro encapsulando un extracto concentrado de material vegetal (hojas, raíces, semillas, planta completa, inflorescencia, etc.) resultando en un polvo seco (Souza et al., 2008). Los polvos secos pueden obtenerse por varias técnicas de secado o microencapsulación, siendo el secado por aspersión (spray drying) uno de los métodos más comunmente usados en las industrias de procesamiento vegetal. Este proceso genera un polvo seco, con características específicas, a partir de un líquido (que puede ser solución, emulsión, o una suspensión) y la aspersión del mismo dentro de una corriente de gas caliente que actua como medio secante (Masters, 1990).

Para propósitos industriales, los extractos secos y microencapsulados tienen muchas ventajas sobre las formas líquidas ya que tienen mejor estabilidad y son más fáciles de manipular, estandarizar, transportar y almacenar (Oliveira et al., 2006).

En la Tabla 1-2 se resumen algunos ensayos llevados a cabo por diferentes autores con el objetivo de obtener micropartículas cargadas con extractos vegetales.

Tabla 1-2 Reportes relevantes de sistemas microparticulados para algunos extractos vegetales.

Planta	Parte de la planta	Tipo de extracto	Metodología de microencapsulación	Referencia
Piper sarmentosum	Fruto	Acuoso	Coacervación	Chan et. al. 2010
Matricaria recutita L	Partes aéreas	Metanólico	Emulsión - Difusión	(Esmaeili et al., 2011)
Lippiasidoides	Toda la Planta	Hidro-alcohólico	Secado por aspersión	(Fernandez et al., 2012)
Coffea arabica	Fruto	Aceite (por extrusión)	Secado por aspersión	(Frascareli et al., 2012)
Linum usitatissimum	Semillas	Aceite (por extrusión)	Secado por aspersión	(Gallardo et al., 2013)
Quercus resinosa	Hojas	Acuoso	Secado por aspersión	(Gallegos-Infante et al., 2013)
Rhamnus purshiana	Corteza	Acuoso	Secado por aspersión	(Gallo et al., 2011)
Hamamelis virginiana	Hojas	Acuoso	Secado por aspersión	(Gallo et al., 2013)
Morinda citrifolia L.	Fruto	Acuoso	Secado por aspersión	(Krishnaiah et al., 2012)
Phyllanthus urinaria	Toda la Planta	Hidro-alcohólico	Emulsificación-Precipitación	(Lam et al., 2013)
Macadamia integrifolia	Fruto	Aceite	Secado por aspersión	(Laohasongkrama et al., 2011)
Entada africana	Hojas	Hidro-alcohólico	Coacervación	(Obidike y Emeje, 2011)
Silybum Marianum	Toda la Planta	Seco	Congelación por aspersión	(Passerini et al., 2012)
Opuntia ficus-indica	Fruto	Hidro-alcohólico	Secado por aspersión	(Saénz et al., 2009)
Salvia fruticosa Miller	Hojas	Acuoso	Secado por aspersión	(Sahin-Nadeem et al, 2009)
Solanumly copersicum	Fruto		Secado por aspersión	(Shu et al., 2006)
Myrciaria jaboticaba	Cascara	Hidro-alcohólico	Secado por aspersión	(Silva et. al., 2013)
Camellia sinensis.	Hojas	Asistido por MW	Co-precipitación	(Sosa et al., 2011)

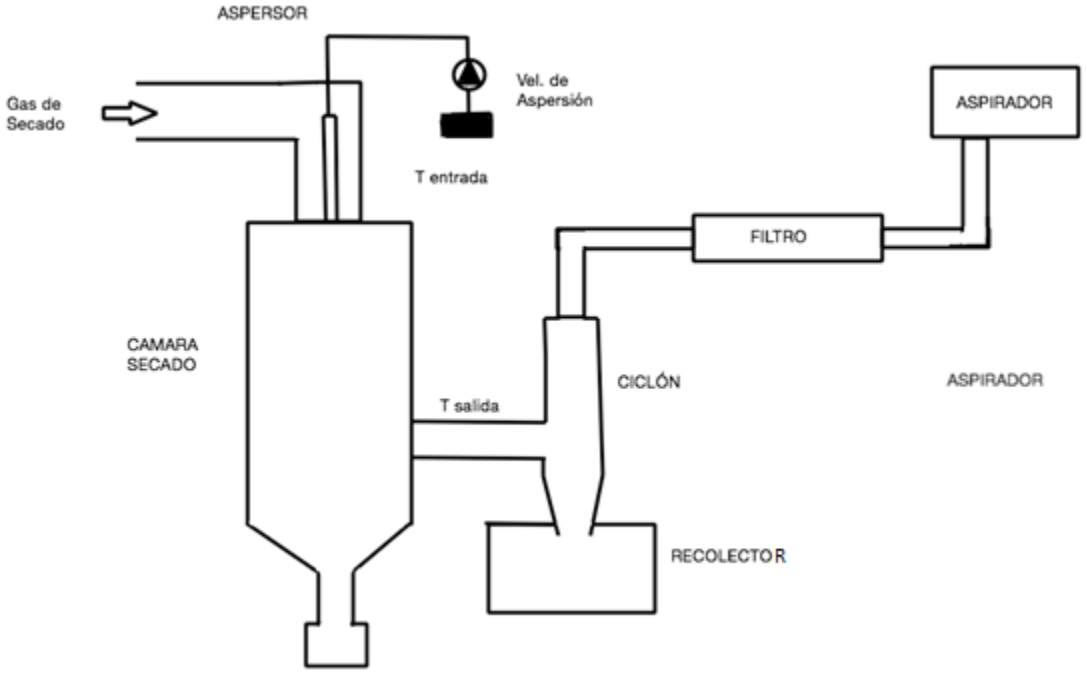
Un ejemplo adicional muy relevante para el desarrollo del presente trabajo es el de la investigación llevada a cabo por Bott et al., quienes realizaron una comparación de la estabilidad para diferentes condiciones de almacenamiento entre partículas obtenidas mediante las metodologías de secado por aspersión (spray drying) y secado por lecho

fluido (spouted bed drying), para un extracto de la especie *Passiflora alata*. En esta comparación se encontró que las partículas obtenidas por secado mediante lecho fluido siempre tenían un contenido más alto de flavonoides totales y se calcularon los tiempos de vida media para las partículas obtenidas que variaron dependiendo de la condición de almacenamiento propuesta y de las condiciones de secado propias de cada metodología (Bott et al., 2010). Este trabajo permite observar que es importante controlar el proceso de secado por aspersión con el fin de no alterar la composición del material usado y en este sentido no afectar sus propiedades.

1.3.2 Secado por aspersión (spray drying) para la obtención de micropartículas

El secado por aspersión (spray drying) es una operación unitaria en la que una solución, emulsión o suspensión se convierte en una sustancia sólida, mediante una aspersión de líquido seguida de una rápida evaporación del solvente. Esta técnica es ampliamente utilizada en procesos industriales para el secado de varios materiales dentro de los cuales se encuentran Ingredientes Farmacológicamente Activos (IFAs) y excipientes. La primera aplicación de esta operación unitaria data de 1872 (fecha en la cual fue patentado) como un proceso que consiste en cuatro etapas básicas : la aspersión de un líquido, que luego entra en contacto con una corriente de gas, en donde se evapora el solvente, obteniéndose un sólido que es separado finalmente. La aspersión transforma la corriente de líquido en pequeñas gotas, que tienen una alta área superficial lo que favorece el secado de las mismas (Figura 1-5) (Paudel et al., 2012) .

Figura 1-5 Representación esquematica de la operación unitaria de Secado por Aspersión



Por varias décadas, uno de los métodos de microencapsulación con más desarrollo, dada su amplia utilización en la industria, ha sido el secado por aspersión. El secado por aspersión es una tecnología de bajo costo, rápida, permite un fácil escalonamiento, produce micropartículas de calidad aceptable y es reproducible, si se compara con otras técnicas de microencapsulación. El proceso es flexible y permite utilizar una amplia gama de materiales, los equipos se encuentran comercialmente disponibles y son fácilmente adaptables. Además, los costos de producción son mucho más bajos comparados con otras técnicas de microencapsulación (Estevinho et al., 2013). Sin embargo, se considera que hay un alto desperdicio de energía dado que no se aprovecha todo el calor durante el secado.

A continuación se realiza una breve descripción de las etapas de la operación unitaria de secado por aspersión, la aspersión o atomización, el secado y la separación o recolección de las partículas. Luego, se presentan dos apartados muy importantes en la microencapsulación utilizando el secado por aspersión, las variables del proceso de fabricación y los materiales de recubrimiento.

1.3.2.1 Aspersión o atomización

La aspersión o atomización puede hacerse por presión o aprovechando una fuerza centrífuga; los aspersores usados pueden ser atomizadores neumáticos, boquilla de presión, disco rotatorio o boquilla sonicada (Masters, 1990). El objetivo de la aspersión es obtener la mayor área de transferencia posible, con el fin de hacer más eficiente el uso del calor para el secado ya que se aumenta de esta manera la transferencia de masa y calor. El elegir un tipo específico de aspersor dependerá de las características del material deseado (en especial el tamaño) y de la viscosidad del sistema a asperjar. Es importante destacar que un aumento en la viscosidad y/o la tensión superficial, aumentará el tamaño de partícula final (Gharsallaoui et al., 2007).

1.3.2.2 Secado

Dependiendo de la dirección de la corriente de gas secante y la posición del atomizador se pueden distinguir dos tipos de secado por aspersión, co-corriente y contra-corriente. En el primero el líquido es asperjado en la misma dirección en la que circula el aire dentro de la cámara de secado, en el segundo, el medio secante circula en sentido contrario al líquido asperjado.

La temperatura de entrada del medio secante es mayor al punto de ebullicion del solvente principal del liquido asperjado, por lo que el secado es casi instantáneo y el interior de las partículas se suele encontrar a temperaturas más bajas a las usadas en el secado (Buchi Technologies, 2008).

Existen tres etapas en la operación de secado, en el momento inmediato a la entrada en contacto de la gota con el gas secante (que está caliente), la temperatura de la gota se eleva hasta una temperatura constante; luego sucede la evaporación del solvente a temperatura y presión parcial de vapor constantes, la velocidad de difusión del solvente hacia la superficie se considera constante. Finalmente cuando la cantidad de solvente es crítica, la velocidad de difusión cae rápidamente y forma el *dry crust* o gránulo seco en superficie. La duración de cada etapa dependerá de la temperatura de entrada y de la naturaleza de la sustancia asperjada, pero en general el proceso es muy rápido tomando

solo entre 5 y 100 segundos, el secado es tan rápido que la partícula no alcanza la misma temperatura del aire de entrada (Gharsallaoui et al., 2007).

1.3.2.3 Separación

Como etapa final las partículas más densas caen en la cámara de secado donde son recolectadas, las demás partículas pasan a un ciclón, donde se separan del gas y el vapor del solvente y son recolectadas a través de filtros. El resultado final son partículas que puedan o no formar agregados dependiendo de la composición de la sustancia asperjada y el gas usado para el secado (Buchi Technologies, 2008).

1.3.2.4 Variables del proceso de fabricación

Para obtener buenos rendimientos y eficiencias de microencapsulación por la metodología de secado por aspersión, es necesario optimizar las condiciones de operación, las principales variables operacionales que se pueden modificar son:

- **La temperatura de entrada del aire:** al aumentarse permite un secado más rápido aunque una temperatura demasiado alta puede causar un rompimiento de la partícula obteniéndose una liberación muy rápida de la sustancia encapsulada. Sin embargo, una temperatura de entrada baja puede generar partículas con alto contenido de humedad, baja fluidez y alta tendencia a la aglomeración (Gharsallaoui et al., 2007).
- **La temperatura con la que se introduce la corriente de líquido a ser asperjada**: al aumentar esta última se disminuye la viscosidad y el tamaño de gota obteniendo una mejor aspersión. Sin embargo, este aumento de temperatura podría ser desfavorable ya que se aumenta la volatilidad y puede generar degradaciones no deseadas en compuestos termolábiles.
- **La velocidad con la cual se atomiza:** dado que las gotículas deben secarse antes de chocar con las paredes de la cámara, la velocidad de aspersión debe garantizar

que el tiempo sea lo suficientemente largo para eliminar el solvente de la goticula, atraves del intercambio con el medio secante.

- **La temperatura de salida del aire**, (exhaust temperature): que es la temperatura al final de la zona de secado, es considerado una variable de control de proceso, es difícil de predecir esta temperatura e incluso su control se hace difícil en la práctica (Masters, 1990).

1.3.2.5 Materiales de recubrimiento

El material de recubrimiento que se escoja para la microencapsulación es de vital importancia ya que afecta la estabilidad de la partícula formada y el rendimiento del proceso, para escogerlo se deben tener en cuenta propiedades como la solubilidad, el peso molecular, la temperatura de transición vítrea, la capacidad de formar películas, los costos y las propiedades emulsificantes, entre otras. La mayor parte de estos materiales son polímeros, que pueden ser de origen natural, semi sintético, o sintético. Es ideal que los polímeros no aumenten considerablemente la viscosidad para obtener una mejor aspersión. Dentro de los más usados en el secado por aspersión se encuentran gomas como la goma xantana, goma acacia, los alginatos y las carrageninas; proteínas como las de leche, proteínas de trigo o soya y gelatina; malto dextrinas con diferentes pesos moleculares, y polímeros sintéticos como ácido poli láctico PLA, ácido poli láctico-glicólico PLGA ó polimetacrilatos (Gharsallaoui et al., 2007).

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Contribuir al diseño y desarrollo de micropartículas poliméricas para un extracto acuoso de hojas de *Passiflora quadrangularis* L. mediante la metodología de Spray-Drying.

2.2 Objetivos Específicos

- → Implementar una metodología analítica que permita la cuantificación de flavonoides totales presentes en el extracto acuoso de hojas de *Passiflora quadrangularis* L.
- → Evaluar el efecto de algunas variables de la metodología de Spray Drying en la microencapsulación del extracto acuoso de hojas de *Passiflora quadrangularis* L. en un polímero.
- → Comparar la estabilidad en condiciones de estrés del extracto acuoso de hojas de *Passiflora quadrangularis* L. libre y microencapsulado.

3. Desarrollo y validación de una metodología analítica para la cuantificación de flavonoides totales (FT) y vitexina en el extracto acuoso de hojas de *P. quadrangularis*

En este capitulo se muestra la metodología analítica que fue desarrollada y validada para la cuantificación de flavonoides totales y vitexina en el extracto acuoso de hojas de *P quadrangularis*, en él se describen la metodología y a continuación se reportan y discuten los resultados obtenidos.

3.1 Metodología

3.1.1 Generalidades

La metodología analítica fue desarrollada y validada en un cromatógrafo líquido Shimadzu® equipado con desgasificador DGU-20, dos bombas binarias LC-6AD, sistema detector de arreglo de diodos SPD M20-A, horno para columna CTO-20A, automuestreador SIL-20A HT y módulo de comunicación CMB-20A. Software para el procesamiento de datos *LabSolutions LC software*.

Los solventes usados, acetonitrilo y metanol grado CLAE son provenientes de J.T. Baker, US®, el agua grado CLAE fue obtenida através del equipo Direct-Q System (Millipore®), ácido acético glacial grado analítico (Reagent Grade, Scharlau®, Spain). El estándar de

vitexina fue adquirido de Fluka®(purum 96%). El estándar de orientina fue adquirido de Sigma Aldrich®(Analitycal Standard 98%) .

3.1.2 Material Vegetal

Las hojas de *Passiflora quadrangularis* Linn., fueron recolectadas en noviembre de 2013 en la zona rural de Rivera, Huila, Colombia (localizado a 2º. 47' 00" N y 75º. 16' 00" W con una altura de 729 metros sobre el nivel del mar). Un ejemplar, identificado por el botánico Carlos Parra, se depositó en el Herbario del Instituto Nacional de Ciencias (ICN) y se le asignó el código COL:572634.

3.1.3 Obtención del extracto acuoso de hojas de *P. quadrangularis*

Se siguió la metodología previamente empleada por Costa et al. Las hojas de *P.quadrangularis* recolectadas fueron secadas en un horno a 40 ºC por 72 horas, luego fueron molidas empleando un molino de cuchillas. Seguidamente se realizó la extracción por infusión, con agua destilada a ebullición por 10 minutos en una proporción planta:solvente 1:10 (p/v). Posteriormente, el extracto fue filtrado, congelado y liofilizado (Costa et al., 2013). Se realizaron tres replicas, partiendo de aproximadamente 1 Kg de material vegetal seco y molido.

3.1.4 Desarrollo y validación de metodología analítica para la cuantificación de flavonoides totales y vitexina en un extracto acuoso de hojas de *P. quadrangularis* por CLAE-DAD

Con base en los objetivos planteados inicialmente en el trabajo investigativo, se eligió el CLAE-DAD como metodología para la cuantificación de flavonoides totales y vitexina en el

extracto acuoso de hojas de *P. quadrangularis*, ya que esta técnica permite evidenciar el perfil de flavonoides contenidos en el extracto y de esta manera contribuir al conocimiento de su comportamiento al obtener un sistema microparticulado y luego de ser sometido a las condiciones de estrés propuestas.

Como se describe en el marco teórico del presente trabajo, Costa logró identificar algunos flavonoides presentes en el extracto acuoso de hojas de *P. quadrangularis*, por un lado, los flavonoides diglicosidados: vitexina 2”-*O*-glucósido, vitexina 2” -*O*-xilósido, orientina 2”-*O*-glucósido, orientina 2”-*O*-xilósido y por otro lado, el monoglicósido vitexina (Costa, 2013). De los flavonoides previamente identificados en el extracto de las hojas, apenas el flavonoide vitexina está disponible comercialmente como estándar. En ese orden de ideas, para llevar a cabo la cuantificación de los compuestos de interés en ese trabajo, se eligió la vitexina como estándar externo debido a su disponibilidad y asequibilidad.

Inicialmente, se aplicaron los parámetros cromatográficos de la metodología analítica desarrollada en el trabajo previo por Costa et al., en el que se realizaba la cuantificación del flavonoide mayoritario en el extracto de hojas de *P. quadrangularis* (Costa et al., 2013). Sin embargo, considerando que el presente trabajo requería evaluar aspectos relacionados con la estabilidad del extracto, fue necesario realizar cambios significativos en cuanto a la fase móvil, el gradiente y el flujo del sistema para lograr una separación adecuada de los flavonoides contenidos en el extracto y los posibles productos de degradación generados por hidrólisis ácida y básica.

3.1.4.1 Preparación de muestras

Solución Madre

Se preparó una solución madre de vitexina en metanol:agua (1:1, v/v) disolviendo 3 mg del estándar y completando a un volumen de 10 mL con solvente, siendo sometida a un baño de ultrasonido por 5 minutos.

Soluciones de Trabajo

Cada solución de trabajo fue preparada mediante las diluciones pertinentes de las solución madre, obteniendo concentraciones de 1a 120 µg/mL.

Soluciones de Extracto.

Cada solución de extracto acuoso de hojas de *P. quadrangularis*, fue preparada disolviendo 25 mg de extracto liofilizado en 25 mL de metanol:agua (1:1) y puestas en un baño de ultrasonido por 5 minutos.

Todas las soluciones inyectadas al sistema cromatográfico fueron previamente filtradas através de una membrana de PVDA hidrofílico con un tamaño de poro de 0,45 µm (Millipore®).

3.1.5 Validación de la metodología analítica

A continuación se describe cada uno de los parámetros que fueron evaluados durante la validación de la metodología analítica, la cual requería ser validada para su utilización en tres ámbitos:

- ✓ para el control cualitativo y cuantitativo del extracto, por medio de su perfil cromatográfico y del contenido de flavonoides totales y vitexina, respectivamente.
- ✓ para realizar la caracterización de las microparticulas en cuanto a eficiencia de encapsulación se refiere.
- ✓ para el uso durante los estudios preliminares de estabilidad en los que pueden surgir productos de degradación.

Todos los parámetros de validación fueron determinados de acuerdo a la guía ICH (ICH, 2005).

3.1.5.1 Linealidad y Rango

La linealidad fue evaluada por la cuantificación de 11 soluciones de estándar de vitexina en concentraciones de 1 a 120 µg/mL, cada una por triplicado. Se construyó una curva de calibración graficando las áreas de pico y las concentraciones de las soluciones. La linealidad fue evaluada utilizando una regresión lineal,calculando los parámetros de intercepto, pendiente y coeficiente de determinación.

Cabe resaltar que el rango evaluado fue amplio debido a que se buscó que fuera posible la cuantificación de flavonoides totales (sumando las áreas de todos los picos) y además se pudiera cuantificar la vitexina individualmente (contenido en el extracto crudo y como un posible producto de degradación de algunos de los flavonoides contenidos en la muestra).

3.1.5.2 Exactitud

La exactitud fue determinada adicionando soluciones de estándar a tres niveles de concentración a las soluciones de extracto, por triplicado. La exactitud se expresó como porcentaje de recuperación (% de recuperación).

3.1.5.3 Precisión

La precisión fue estimada por medio de evaluación de la repetibilidad (precisión intradía) y precisión intermedia (precisión interdía), analizando las soluciones estándar por triplicado en un mismo día y en tres días diferentes por triplicado en cada uno, respectivamente. La precisión fue expresada como el porcentaje de la desviación estándar relativa (%DER o % RSD por sus siglas en inglés).

3.1.5.4 Influencia de la matríz

Con el fin de evaluar la influencia de la matriz, las soluciones de trabajo (estándar de vitexina) en todas las concentraciones de la curva de calibración fueron enriquecidas con una solución de extracto de concentración determinada (0,5 mg/mL) en una proporción

1:1(Método de Adicion de Estándar). Posteriormente, se construyó una nueva curva de calibración del área de pico de vitexina obtenido y las concentraciones de soluciones de trabajo enriquecidas y se realizó una regresión lineal verificando que esta curva se ajustara a un modelo lineal. Una comparación entre las pendientes de las dos curvas de calibración obtenidas (soluciones de estándar y soluciones de estándar enriquecidas) fue llevada a cabo mediante una prueba de hipótesis t-student, con el objetivo de verificar si la respuesta debida a la matriz (extracto 0,5 mg/mL) es aditiva en todas las concentraciones de estándar, cabe resaltar que una prueba de verificación de intercepto no es necesaria por el hecho que el efecto debido a la matriz se considera constante y aditivo (si la hipótesis es que las pendientes de las dos curvas de calibración son estadísticamente iguales) y los errores sistemáticos se transfieren en igual proporción a todos los puntos debido a que el procedimiento de preparación de la muestra es el mismo, se considera que la diferencia hallada en los interceptos corresponde al efecto de la matríz y que por tanto este valor es constante a través de las concentraciones estudiadas (Cardone, 1986; Miler, 1991). Esta estrategia ha sido utilizada por Oliveira y Oliveira para evaluar la influencia de la matriz en la cuantificación de ácido rosmarínico en *Salvia Officinalis* (Oliveira y Oliveira, 2013).

3.1.5.5 Límite de detección (LDD) y límite de cuantificación (LDC)

El límite de detección y límite de cuantificación fueron matemáticamente calculados, basados en la curva de calibración construida con las 5 concentraciones de estándar más bajas, según la Ecuación 3-1 y la Ecuación 3-2. Donde Sa quiere decir la desviación estándar del intercepto y b la pendiente hallada.

Ecuación 3-1 Cálculo de Limite de Detección

$$\boldsymbol{LDD = 3\frac{Sa}{b}}$$

Ecuación 3-2 Cálculo de Limite de Cuantificación

$$\boldsymbol{LDC = 10\frac{Sa}{b}}$$

Adicionalmente, con el objetivo de corroborar los datos obtenidos mediante los cálculos, se realizaron diluciones descendentes de la concentración más baja del rango evaluado, por triplicado y se realizó la cuantificación hasta hallar el punto más bajo donde se pudiese

realizar la valoración con la precisión adecuada (%RSD<5%), siendo esta concentración considerada el Límite de Cuantificación.

3.2 Resultados y discusión

3.2.1 Obtención de los extractos

La preparación del extracto se realizó según lo descrito anteriormente con la misma metodología de reportes previos (Costa, 2013; Costa et al., 2013), obteniéndose después de la liofilización un polvo de color amarillo a café, de aroma característico de tono dulce, de flujo difícil, con tendencia a formar aglomerados de partículas. El rendimiento de extracción fue calculado obteniéndose valores entre 1,90 % y 2,35% (Tabla 3-1).

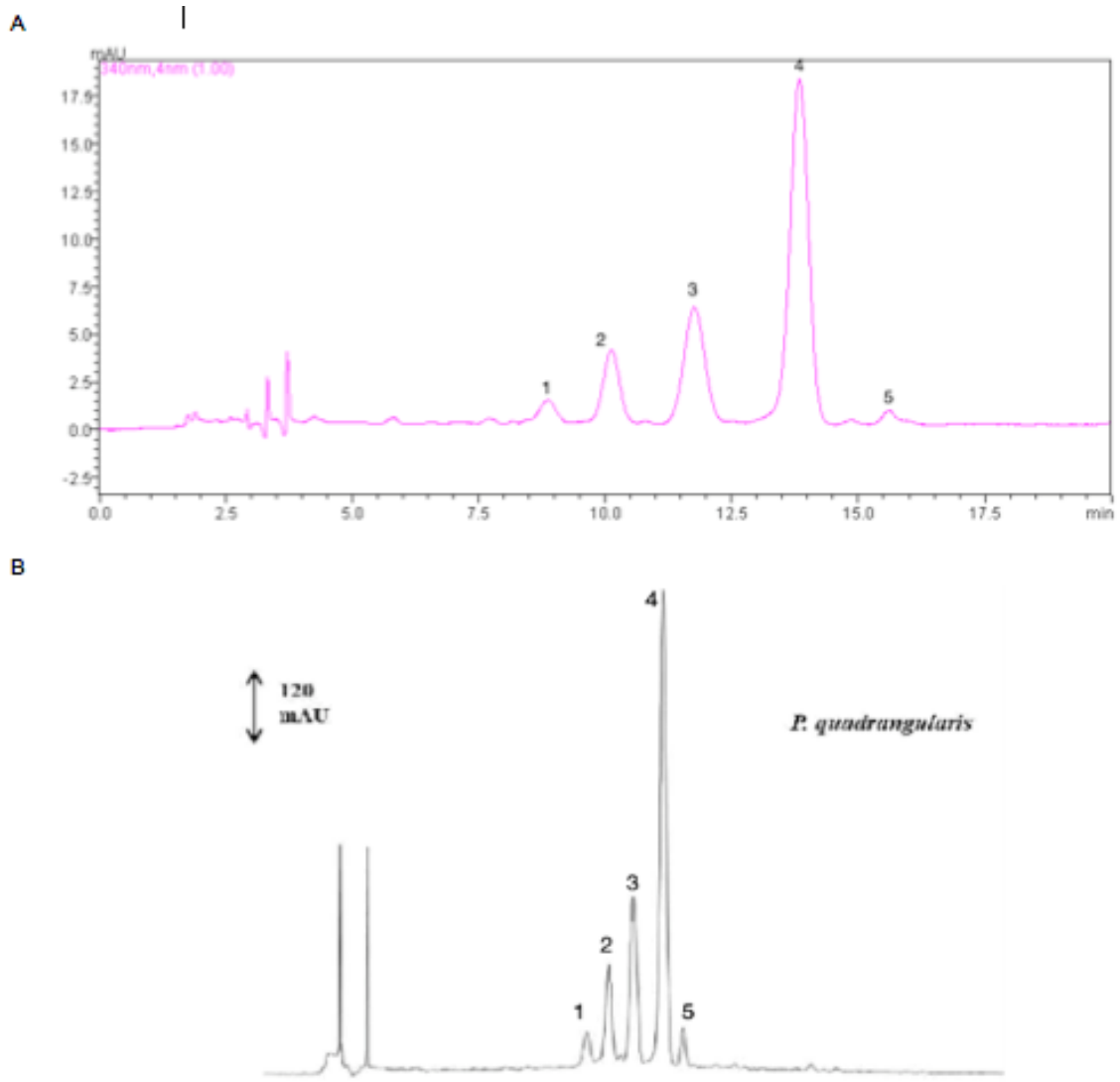
Tabla 3-1 Rendimiento de obtención del extracto acuoso de hojas de *Passiflora quadrangularis*.

Extracción	Peso Material Vegetal (g)	Peso del extracto liofilizado (g)	Rendimiento (%)
1	990	21,6	2,18
2	1020	19,4	1,90
3	1010	23,7	2,35
		Promedio	2,14
		DE	0,22

Para evaluar el perfil cromatográfico del extracto obtenido de manera comparativa al previamente reportado, se realizó un análisis por CLAE, utilizando la metodología analítica previamente descrita en la literatura (Costa, 2013). El resultado mostró que el perfil

cromatográfico del extracto obtenido en ese trabajo era similar al reportado, como se observa en la Figura 3-1.

Figura 3-1 Análisis comparativo de los perfiles cromatográficos de extractos de *P. quadrangularis*



A) Perfil cromatográfico del extracto obtenido, B) Perfil cromatográfico del Reportado en la literatura. Picos 1) orientina 2”-*O*-glucósido 2) orientina 2”-*O*-xilósido 3) vitexina 2”-*O*-glucósido 4) vitexina 2”O-xilósido 5) vitexina

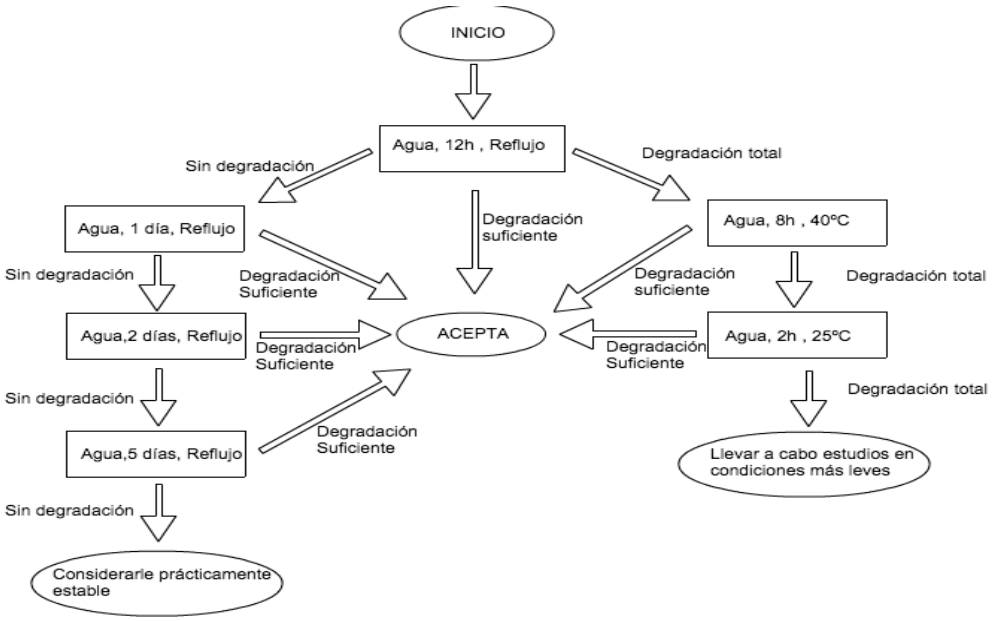
Condiciones cromatogáficas: Fase Estacionaria: Columna C_{18} Phenomenex Luna® (250 mm x 4,6 mm i.d. 5 µm) Fase Móvil: Fase [A] Agua Fase [B] acetonitrilo: ácido acético 1%, el gradiente linear de 15% a 35% en . 15 minutos Flujo de la fase móvil: 1,2 mL/min; volumen de inyección: 10 µL; longitud de onda de detección (λ): 340 nm;

3.2.2 Desarrollo de una metodología analítica por CLAE

El desarrollo de una metodología analítica es indispensable para la realización de un gran número de investigaciones y de ella depende la fiabilidad de los resultados derivados de la misma (Sección de Laboratorio y Asuntos Cientificos de la ONU, 2010). En el presente trabajo se buscó que esta metodología permitiera la caracterización del extracto, basado en la cuantificación de los flavonoides totales y vitexina contenidos en el mismo, de tal forma que fuese útil para su uso en la caracterización de las micropartículas en cuanto a la carga y la eficiencia de encapsulación. Además, el método desarrollado debió permitir la evaluación de la estabilidad del extracto y del sistema microparticulado que lo contiene en condiciones de estrés y de almacenamiento controladas.

Para desarrollar la metodología analítica y de acuerdo con los objetivos planteados, en los que se incluyó una evaluación comparativa de la estabilidad del extracto libre versus el extracto en el sistema microparticulado bajo condiciones de estrés, se sometió el extracto a condiciones de degradación forzada, según el flujograma que se muestra en la figura 3-2, árbol de decisión.

Figura 3-2 Árbol de decisión para estudios de estrés de fármacos



Adaptado de (Singh y Bakshi, 2000)

Para la elección de las condiciones adecuadas de degradación forzada, se consideró seguir el árbol de decisión propuesto por Singh y Bakshi, de acuerdo con la propuesta de los autores, la evaluación sistemática de la estabilidad en condiciones de estrés debe considerar que cada sustancia a evaluar puede ser estable o lábil a determinadas condiciones. Por esta razón, se debe tener en cuenta que si no existe una degradación significativa (menor al 20%), el compuesto debe ser sometido a condiciones de evaluación más drásticas, en caso contrario es decir si la degradación es completa (mayor al 80%) deberá someterse a condiciones menos drasticas. Con base en lo anterior se proponen árboles de decisión con las condiciones de degradación forzada más comunes reportadas en publicaciones científicas (Singh y Bakshi, 2010).

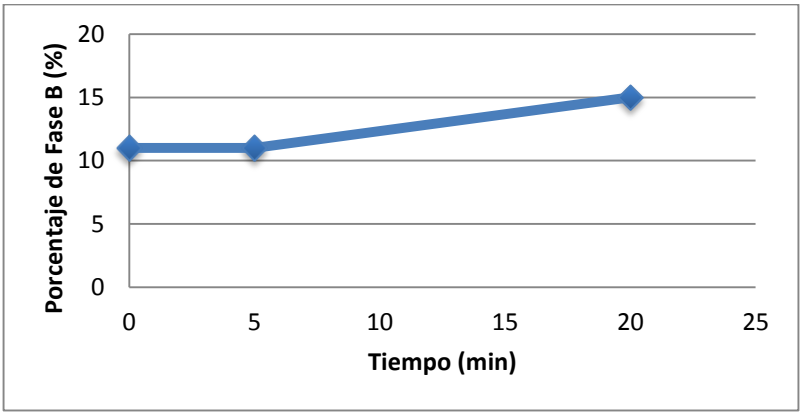
Para el caso particular del extracto de las hojas de *P. quadrangularis* durante la hidrólisis ácida y básica, se encontró que la primera condición evaluada (reflujo con HCl 1 N y NaOH 1 N por 8 horas) fue adecuada para obtener una degradación significativa (superior al 20%). En la figura 3-5 se presenta el cromatograma obtenido para el extracto acuoso de hojas de *P. quadrangularis* hidrolizado en condiciones ácidas HCl 0,1 N y reflujo de 8h.

Las muestras degradadas fueron evaluadas en diferentes sistemas cromatográficos iniciando por el previamente reportado. Sin embargo, se observó que los cromatogramas de las muestras de extracto hidrolizado, presentaban picos sobrepuestos, a diferencia de los cromatogramas de las muestras de extracto original. Por lo tanto, se realizaron modificaciones al sistema cromatográfico, en flujo, en gradiente, en composición de las fases móviles y en temperatura, hasta lograr que el nuevo pico resultante de la hidrólisis se separara adecuadamente, lo anterior fue evaluado mediante criterio visual.

El sistema cromatográfico elegido consistió en:

Fase Estacionaria: Columna C_{18} PhenomenexLuna® (250 mm x 4,6 mm i.d. 5 µm), Fase Móvil: Fase [A] contiene agua:acetonitrilo:ácido acético (90:10:1); Fase [B] compuesta de acetonitrilo:agua:ácido acético (90:10:1); el gradiente inicia en 11% de la fase B de 0 a 5 minutos, 11% a 15% de la fase B de 5 a 20 min en gradiente linear (Figura 3-3). Flujo de la fase móvil: 1 mL/min; temperatura del horno de la columna: 25 ºC; volumen de inyección: 10 µL; longitud de onda de detección (λ): 340 nm.

Figura 3-3 Gradiente de elución de la fase móvil organica (Fase B) para la cuantificación de flavonoides totales (FT) y vitexina en extracto acuoso de hojas de *P. quadrangularis*



Las fases móviles fueron acidificadas con el fin de obtener una separación más eficiente por parte de la fase estacionaria. Lo anterior, dado que los compuestos a eluir estarán de forma no ionizada y esto permite que los picos obtenidos en la detección sean más delgados (Loo et al., 2008). También se incluyó una proporción (10%) de fase orgánica en la fase acuosa y de igual modo, una porción de fase acuosa en la orgánica, con el objetivo de que cuando se desarollara el gradiente, el cambio en la polaridad fuese menos drástico y de esta manera obtener una mejor separación y resultados más reproducibles.

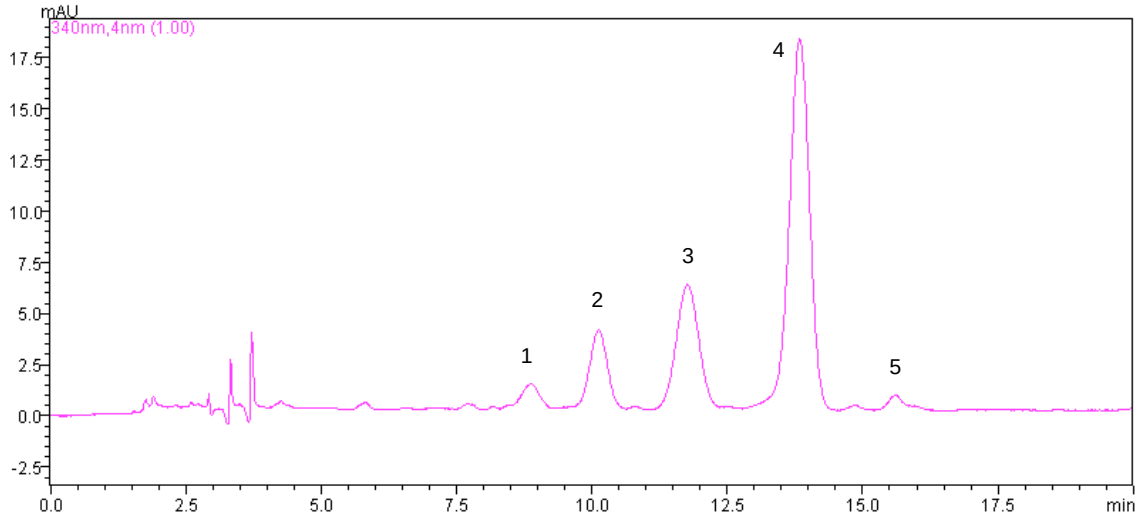
En cuanto a la temperatura, se observó que aumentar la temperatura a 30°C, inducía una elución más rápida de los compuestos debido a que la viscosidad de los solventes disminuye, aumentando la velocidad linear de la fase móvil, aunque a su vez llevaba a una menor resolución entre los picos disminuyendo de esta forma la selectividad del método. Sin embargo, no tener control en la temperatura podría ocasionar problemas en la reproducibilidad del método, una vez que el sistema se vería afectado por los cambios de temperatura del ambiente (Harris, 2003). Por lo tanto, se fijó 25 °C como la temperatura de análisis, de esta forma se debe evaluar la robustez del método frente a cambios de temperatura ya que con los experimentos y datos reportados no es posible inferir que el método es robusto.

Respecto al gradiente construido, una composición isocrática inicial seguida de un aumento de proporción de la fase orgánica, fue el sistema que permitió una mejor

resolución entre los componentes de la muestra. Cabe resaltar que posterior a este gradiente se realizó una aumento a 35% de Fase B durante 2,5 minutos en un gradiente lineal y luego un descenso a 11% durante 2,5 minutos. Posterior a este último paso, se mantuvo la proporción de B constante por 5 min. Esos pasos adicionales se realizaron con dos objetivos: eliminar los posibles contaminantes de menor polaridad de la muestra y estabilizar la columna para la siguiente inyección (durante estos últimos 10 minutos no se realizó adquisición de datos).

Los perfiles cromatográficos del extracto crudo y del extracto hidrolizado (en condiciones acidas HCl 0,1 N) obtenidos con la metodología desarrollada se pueden observar en la Figura 3-4 y la Figura 3-5 respectivamente.

Figura 3-4 Cromatograma obtenido para el extracto acuoso de hojas de *P. quadrangularis* crudo

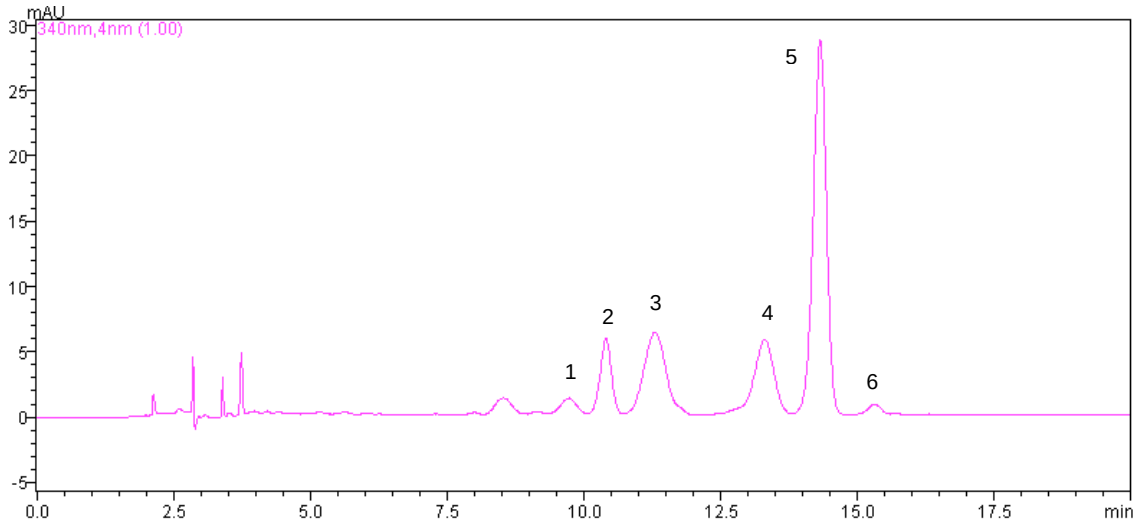


;

Picos 1) orientina 2”-*O*-glucósido 2) orientina 2”-*O*-xilósido 3) vitexina 2”-*O*-glucósido 4) vitexina 2”O-xilósido 5) vitexina.

Condiciones cromatogáficas: Fase Estacionaria: Columna C_{18} Phenomenex Luna® (250 mm x 4,6 mm i.d. 5 µm) Fase Móvil: Fase [A] contiene agua:acetonitrilo:ácido acético (90:10:1); Fase [B] compuesta de acetonitrilo:agua:ácido acético (90:10:1), el gradiente inicia en 11% de la fase B de 0 a 5 minutos, 11% a 15% de la fase B de 5 a 20 min en gradiente linear .Flujo de la fase móvil: 1 mL/min; temperatura del horno de la columna: 25 º C; volumen de inyección: 10 µL; longitud de onda de detección (λ): 340 nm

Figura 3-5 Cromatograma obtenido para el extracto acuoso de hojas de *P. quadrangularis* hidrolizado (Condiciones acidas HCl 0,1 N Reflujo 8h)



Picos 1) orientina 2”-*O*-glucósido 2) orientina 2”-*O*-xilósido 3) orientina 4) vitexina 2”-*O*-glucósido 5) vitexina 2”O-xilósido 6) vitexina.

Condiciones cromatogáficas: Fase Estacionaria: Columna C_{18} Phenomenex Luna® (250 mm x 4,6 mm i.d. 5 µm) Fase Móvil: Fase [A] contiene agua:acetonitrilo:ácido acético (90:10:1); Fase [B] compuesta de acetonitrilo:agua:ácido acético (90:10:1), el gradiente inicia en 11% de la fase B de 0 a 5 minutos, 11% a 15% de la fase B de 5 a 20 min en gradiente linear .Flujo de la fase móvil: 1 mL/min; temperatura del horno de la columna: 25 º C; volumen de inyección: 10 µL; longitud de onda de detección (λ): 340 nm;

Los cromatogramas obtenidos indican que el extracto crudo evaluado contiene los flavonoides previamente reportados, lo anterior dado que al seguir la misma metodología el perfil cromatográfico es muy similar, así como los espectros UV observados para cada pico corresponden a los reportados. Cabe resaltar que el orden de elución no cambia al realizar la corrida cromatográfica con las nuevas condiciones elegidas para aumentar la selectividad en el extracto crudo. De esta manera, es posible afirmar que los flavonoides contenidos en el extracto crudo corresponden en su orden de elución a orientina-2”-*O*-xilósido, orientina-2”-*O*-glucósido, vitexina-2”-*O*-xilósido, vitexina-2”-*O*-glucósido y vitexina.

Basados en los resultados obtenidos en el ensayo de degradación, en los que se llevó a cabo una hidrólisis ácida y una hidrólisis básica como se describió anteriormente, se observa que los picos correspondientes a los compuestos orientina 2”-*O*-xilósido, orientina 2”-*O*-glucósido, vitexina 2”-*O*-xilósido y vitexina 2”-*O*-glucósido, disminuyeron de manera considerable, observando el aumento y surgimiento de otros picos en el cromatograma.

En la literatura se ha reportado que los flavonoides del tipo glicósidos son susceptibles de sufrir hidrólisis, en especial los flavonoides cuya glicosilación ocurre por formación del enlace del tipo *O*-glicósido, por medio de la ruptura del enlace éster (Seikel et al., 1966; Rommel y Wrolstad, 1993). Por tanto, es de esperarse que los flavonoides orientina 2”-*O*-xilósido y orientina 2”-O-glucósido pierdan su segunda unidad glicosídica, generando orientina como producto de degradación y de este mismo modo los flavonoides vitexina 2”-*O*-xilósido y vitexina 2”-*O*-glucósido se degraden a vitexina, los respectivos monoglicósidos tipo *C*-glicósidos.

Para comprobar la suposición anterior, una muestra de extracto hidrolizado, fue enriquecida con estándares disponibles de orientina y vitexina. Como resultado se observó que el nuevo pico formado después de las hidrólisis corresponde a orientina. De igual forma, se confirmó la presencia de vitexina en el extracto hidrolizado ya que el área del último pico de los cromatogramas aumentó al añadir este estándar a la muestra analizada.

De esta forma se pudo observar que el método es selectivo a los productos de degradación generados por hidrólisis ácida y básica, ya que aun cuando se generan nuevos picos en el cromatograma, estos son suceprtibles de valoración respecto sin interferir en la cuantificación tanto de flavonoides totales como de vitexina.

Por otro lado, aunque la idoneidad no es un parámetro de validación de los métodos analíticos su evaluación es importante debido a que la mismo evalúa si el método (en su conjunto) es adecuado para llevar a cabo la determinación y/o cuantificación para la cual se ha establecido (AEFI, 2001). A continuación se presentan algunos parámetros de evaluación de la idoneidad obtenidos directamente de la integración realizada por el software Lab Solutions ® LC, la Tabla 3-2 muestra el factor de capacidad (k’) y la tabla 3-3 muestra la resolución de cada flavonoide de la muestra respecto al compuesto que ha eluido previamente durante el análisis cromatografico, en ambos casos los resultados se muestran para una muestra de extracto crudo y una muestra de extracto enriquecido con

estándares de vitexina y orientina (extracto 1 mg/mL + vitexina 100 µg/mL + orientina µg/mL).

Tabla 3-2. Factor de capacidad para cada uno de los flavonoides en el método propuesto para el extracto acuoso de hojas de *P. quadrangularis* crudo y enriquecido con estándares de vitexina y orientina

	Factor de capacidad (k')	
Compuesto	Extracto Crudo	Extracto enriquecido
Orientina 2"-*O*- xilósido	6.628	6.669
Orientina 2"-*O*- glucósido	7.886	7.923
Orientina	NA	8.599
Vitexina 2"-*O*- xilósido	9.521	9.553
Vitexina 2"-*O*- glucósido	11.596	11.631
Vitexina	12.606	12.627

Tabla 3-3. Resolución para cada uno de los flavonoides en el método propuesto para el extracto acuoso de hojas de *P. quadrangularis* crudo y enriquecido con estándares de vitexina y orientina

		Resolución (Rs)	
Compuesto	Resolucion calculada frente al compuesto	Extracto Crudo	Extracto enriquecido
Orientina 2"-*O*- xilósido	Orientina 2"-*O*- glucósido	1.997	1.629
Orientina	Orientina 2"-*O*- xilósido	NA	1.304
Vitexina 2"-*O*- glucósido	Orientina	2.847*	1.606
Vitexina 2"-*O*- xilósido	Vitexina 2"-*O*- glucósido	1.759	1.763
Vitexina	Vitexina 2"-*O*- xilósido	1.822	1.649

*calculado frente al compuesto orientina 2"-*O*- xilósido

Respecto a los resultados, se puede observar que en todos los picos el factor de capacidad es mayor de 2, que se considera el valor óptimo de este parámetro. Para el caso de la

resolución (Rs) los valores en el extracto crudo son mayores a 1.5 lo que significa una adecuada sepración entre los picos. Para el extracto enriquecido solo el cálculo de resolución entre orientina y orientina 2”-*O*- xilosido presenta un valor inferior sin embargo puede considerarse adecuada debida a que hay una buena resolución de los picos a línea base (AEFI, 2001).

3.2.3 Validación de la metodología analítica

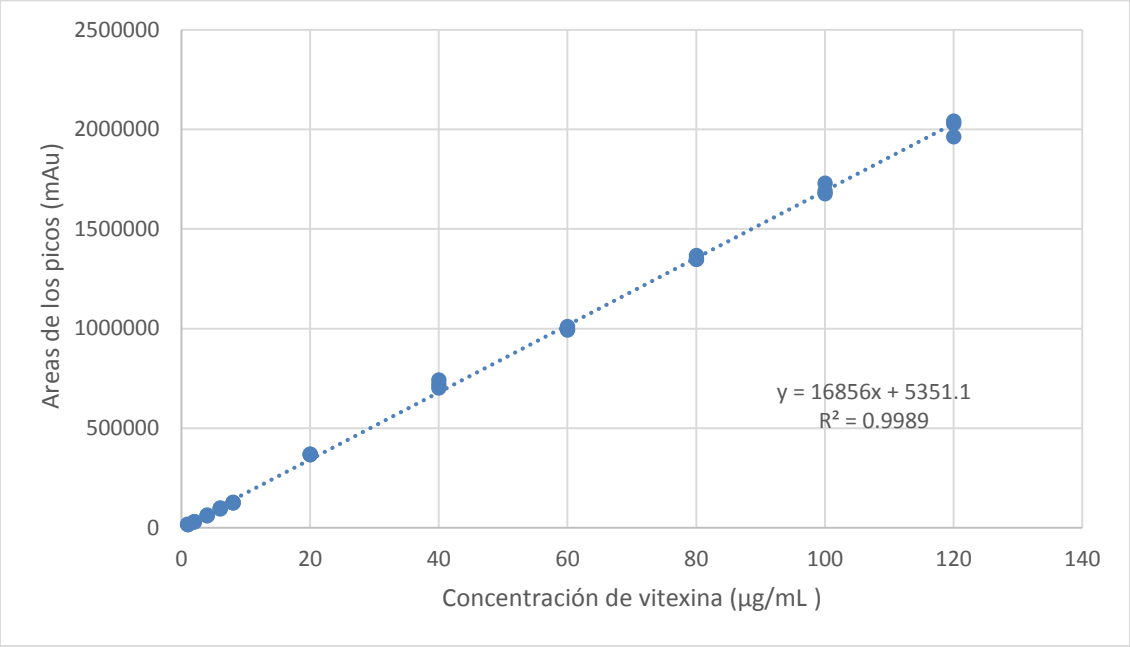
3.2.3.1 Linealidad del método y rango

Para determinar la linealidad del método se realizó una curva de calibración de vitexina con 11 concentraciones diferentes, por triplicado. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 3-4 y la figura 3-6. La pendiente fue sometida a una prueba de hipótesis de t student, con el obejetivo de verificar que es estadísticamente diferente de 0, y el intercepto a través de un ANOVA con la prueba de hipótesis de una distribución F de Fisher para probar que es diferente al origen.

Tabla 3-4 Parámetros estadísticos determinados para evaluar la linealidad del sistema cromatográfico para la cuantificacion de flavonoides totales y vitexina en el extracto acuoso de hojas de *P. quadrangularis*

Parámetro	Valor	Desviación Estándar	Hipótesis Nula	p-valor
Coeficiente de Determinación	0,9989			
Pendiente (b)	16856,2	98,97	b=0	1,24E-47
Intercepto (a)	5351,1	5703,1	a=0	1,49E-4

Figura 3-6 Curva de calibración del estándar externo de vitexina para la cuantificación de Flavonoides Totales y vitexina en el extracto acuoso de hojas de *P. quadrangularis*.



De los resultados obtenidos se puede observar que el método es lineal en el rango de 1 a 120 µg/mL.

Estos resultados concuerdan con los reportados para vitexina por Wang et al. quienes hallaron linealidad en concentraciones de 1.74 a 87 µg/mL, en la validación llevada a cabo para la cuantificación simultanea de vitexina-2″-O-glucósido, vitexina-2″-O-rhamnósido, rutina, vitexina, e hiperósido, usando la metodología de estándar externo, en CLAE-FR (Wang et al., 2011).

3.2.3.2 Precisión

La precisión fue evaluada a dos niveles, la repetibilidad y la precisión interdía. Para el primer caso la repetibilidad se evaluó en las 11 concentraciones diferentes, por triplicado,

en el mismo día la respuesta del área obtenida. Los resultados de la desviación estándar relativa (% DER) para la repetibilidad se observan en la tabla 3-5.

Tabla 3-5 Evaluación de la repetibilidad del método propuesto para la cuantificación de flavonoides totales y vitexina en el extracto acuoso de hojas de *P. quadrangularis.* (Estándar: vitexina)

Concentración (µg/mL)	Promedio	%DER
1	16576,3	2,33
2	30689,0	1,89
4	62763,3	3,29
6	97873,3	2,38
8	126609,7	1,60
20	369255,0	0,46
40	721897,3	2,83
60	1000985,7	0,93
80	1354706,3	0,83
100	1699607,0	1,65
120	2011500,7	2,11
Parámetro de aceptación según ICH%DER < 5%		

Para la precisión intermedia, se evaluaron 11 concentraciones diferentes del estándar, por triplicado, en inyecciones realizadas en tres días diferentes. Los resultados de la desviación estándar relativa (% DER) para la precisión intermedia se presentan en la tabla 3-6.

Tabla 3-6 Evaluación de la precisión Intermedia del método propuesto para la cuantificación de flavonoides totales y vitexina en el extracto acuoso de hojas de *P. quadrangularis*.(Estándar: vitexina)

Concentración (µg/mL)	Promedio	%DER
1	16267	3,62
2	30960	2,53
4	63809	2,86
6	101460	4,62
8	129342	3,90
20	369764	1,01
40	739553	3,99
60	1035032	4,64
80	1402236	4,04
100	1704927	2,96
120	2002668	1,89
Parámetro de aceptación según ICH %DER <5 %		

El método presentó una adecuada precisión, una vez que los valores de %DER tanto para la repetibilidad como para la precisión intermedia son adecuados según las guías ICH, ya que se encuentran todos por debajo del 5%.

3.2.3.3 Exactitud

Para la evaluación de la exactitud, se realizó una comparación entre el área obtenida para una muestra del extracto crudo y el área de tres muestras de extracto (de la msima concentración) enriquecidas con tres concentraciones distintas de vitexina. Los datos obtenidos se presentan en la tabla 3-7.

Tabla 3-7 Evaluación de la exactitud del método propuesto para la cuantificación de flavonoides totales y vitexina en el extracto acuoso de hojas de *P. quadrangularis* (Estándar: vitexina)

Concentración (µg/mL)	Área	Conc. (µg/mL)	Área
0	7046	8	136546
0	6483	8	142013
0	6582	8	133333
1	22738	120	2029536
1	24381	120	2060282
1	23167	120	2037799

De ese modo, se calculó el porcentaje de recuperación, basados en la respuesta esperada según la curva de calibración obtenida, los resultados se reportan en la tabla 3-8

Tabla 3-8 Porcentajes de recuperación calculados del sistema propuesto para la cuantificación de flavonoides totales y vitexina en el extracto acuoso de hojas de *P. quadrangularis* (Estándar: vitexina)

Concentración (µg/mL)	Promedio	Promedio de área de debida al estándar	Interpolación según curva de calibración (µg/mL)	Porcentaje de recuperación (%)
0	6703,7			
1	23428,7	16725	0,992	99,22
8	137297,3	130593,7	7,74	96,84
120	2042539	2035835,3	120,78	100,65

Los porcentajes de recuperación se encuentran entre el 95% y el 105 % por lo que se puede inferir que el método cuenta con adecuada exactitud de acuerdo a las guias ICH.

La estrategia utilizada para la evaluación de la exactitud que fue escogida es la más utilizada cuando no se cuenta con una matriz idéntica a la de la muestra libre del analito de interés, es conocida como adición de estándar. En nuestro caso, fue necesario enriquecer muestras de extracto con estándar a diferentes niveles de concentración y de esta manera comparar los resultados contra los resultados esperados en la curva de calibración (Araujo, 2009). Es decir, en los resultados (áreas) obtenidos de las muestras enriquecidas se debe restar el efecto debido a la muestra de extracto y de esta manera interpolar la concentración de éstandar de acuerdo a la curva de calibración (utilizando la ecuación de recta lineal), esta valor es comparado con la concentración teorica de estandar calculando el porcentaje de recuperación (AEFI, 2001).

3.2.3.4 Límite de detección y límite de cuantificación

Los límites de cuantificación y de detección se calcularon con base en los datos obtenidos. Los resultados se resumen en la tabla 3-9. Para verificar experimentalmente el limite de cuantificación del método, se realizó un análisis de vitexina a una concentración de 0,5 µg/mL por triplicado.

Tabla 3-9 LDD y LDC Calculados para el sistema propuesto para la cuantificación de flavonoides totales y vitexina en el extracto acuoso de hojas de *P. quadrangularis*

Límite calculado	(µg/mL de vitexina)
LDD	0,19
LDC	0,62

Los resultados de los límites son comparables con los estudios de Salvador et al. quienes realizaron una determinación cuantitativa simultanea por CLAE-FR de acacetina, vitexina 2”-*O*-α-l-ramnopiranósido, vitexina 2”-*O*-d-glucopiranósido, vitexina y quercetina, en

extractos etanolicos de *Alternanthera tenella*; los autores utilizaron naringenina como estandar interno, reportando un valor de límite de cuantificación de 0,32 µg/mL (Salvador et al., 2006).

A su vez el presente reporte es equiparable con los resultados descritos por Zeraik y Yariwake quienes realizaron la validación de una metodología analítica por CLAE para la cuantificación de flavonoides totales (usando la metodología de estándar externo con rutina como flavonoide estándar) e isoorientina (usando la metodología de adición de estándar) en la pulpa del fruto de *Passiflora edulis*. El límite de cuantificación de rutina fue de 0,57 mg/L. En este mismo modo los valores de desviación estándar relativa presentados por los autores son inferiores al 5% en la evaluación de la repetibilidad y la precisión interdía y los porcentajes de recuperación durante la estimación de la exactitud están entre 84,10% y 91,13 % (Zeraik y Yariwake, 2010)

3.2.3.5 Influencia de la matríz

La evaluación de la influencia de la matríz (extracto crudo de *P. quadrangularis*) fue llevada a cabo siguiendo la metodología descrita previamente. Se encontró que la matríz cambia de forma estadísticamente significativa la respuesta del estándar, ya que aumenta el área cuando se enriquece la muestra en todos los niveles de concentración.

Los resultados de la prueba de comparación de pendientes de las curvas de calibración realizadas con estándar de vitexina y estándar de vitexina enriquecida con extracto se observan a continuación (tabla 3-10 y tabla 3-11).

Tabla 3-10 Parámetros de las curvas de calibración para la Influencia de la matriz.

Parámetros Estándar de Vitexina			Parámetros Estándar +Extracto	
n	33		n	33
Pendiente (b)	16856,2		Pendiente (b)	17219,7
Intercepto (a)	5351,1		Intercepto (a)	23205,1
s_2xy	553726032,2		s_2xy	1315815977,0
s_2b	9796,5		s_2b	23279,5
s_2a	32525337,2		s_2a	77289771,3

Tabla 3-11 Prueba de t-student para las pendientes de las curva de calibración

PRUEBA t PARA PENDIENTES		Ho: Las pendientes son iguales
gl	62	
Tcal	1,999	Se acepta la Ho
p value	0,0500	

Este resultado demuestra que las pendientes no son estadísticamente diferentes, lo que significa que la respuesta debida al extracto es aditiva y constante en todas las concentraciones de estandár y que corresponde a la diferencia entre los interceptos de las dos curvas de calibración. La diferencia encontrada es debida a la prescencia de vitexina en la matriz. Este hallazgo nos permite concluir que es posible usar la metodología de estándar externo para los objetivos planteados.

Este abordaje también ha sido empleado en otros estudios en la literatura que han realizado cuantificaciones de flavonoides totales por CLAE (Zeraik & Yariwake, 2010). Algunos autores reportan el uso de este método denominado adición de estándares para la evaluación de la influencia de la matriz. Algunos ejemplos se describen a continuación: Fucina et al. han reportado la influencia de la matriz mediante comparación de pendientes en un trabajo que buscaba la validación de una metodología analitica por CLAE para la cuantificación de acido kaurenóico en extractos de *Sphagneticola trilobata* obtenidos mediante secado por aspersión, siendo ésta estadísticamente no significativa (Fucina et al., 2012). Pereira et al. reportaron la validación de una metodología para 25 compuestos fenólicos contenidos en el jugo de uva, para su control de calidad, hallando que la matriz no afecta significativamente los resultados en la cuantificación de estos (Pereira et al., 2013).

En este trabajo, se demuestra que la matriz no afecta la linealidad del método, manteniéndose la pendiente en los niveles de concentración evaluados, por tanto el método de estándar externo puede ser usado tanto para la cuantificación de los flavonoides totales expresados en equivalentes de vitexina, como para la propia vitexina presente en el extracto acuoso de hojas de *P. quadrangularis*.

3.2.4 Cuantificación del contenido de flavonoides totales y vitexina en el extracto acuoso de *P. quadrangularis*

Finalmente, en la tabla 3-12 se resumen los resultados para la cuantificación de los compuestos de interés en el extracto acuoso de hojas de *P. quadrangularis.* Cabe resaltar que los flavonoides totales están expresados en equivalentes de vitexina ya que este fue el estándar utilizado para la construcción de la curva de calibración.

Tabla 3-12 Resultados de la cuantificación de flavonoides totales y vitexina en el extracto acuoso de *P. quadrangularis*

Tipo	Concentración (mg/g de extracto liofilizado)
Flavonoides Totales*	55,1
Vitexina	0,57

*Expresados como equivalentes de vitexina

A modo comparativo, en el estudio realizado por Abourashed et al. queienes en 115 especies diferentes de Passifloras encontraron concentraciones de vitexina entre 0,01 y 0,86 g de vitexina/ 100 mL de extracto metanólico, usando una metodología de extracción acelerada y posterior cuantificación por HPLC (Abourashed et al., 2002).

Por su parte para el caso de flavonoides totales de hojas de *Pasiiflora incarnata*, la farmacopea Helvetica señala que la determinación de determinación de flavonoides a través de hidrolisis acida, extracción con acetato de etilo y complejación con cloruruo de aluminio, para lectura a 422 nm mediante espectroscopia UV expresado en términos de hiperosido, debe ser superior a 0,3%. La Farmacopea Britanica en su lugar propone una extracción con etanol 60% y una complejación con una solución oxalo-borica y determinación UV a 401 nm con un límite para esta planta de 1,5% exprasdo en términos

de vitexina (Muller et al., 2005). En este sentido *P. quadrangularis* se encuentra por debajo de los limites farmacopeicos mencionados ya que el resultado de la Tabla 3-12 al ser multiplicado por el rendimiento de extracción originan un contenido de 0,12 % en las hojas objeto de este trabajo.

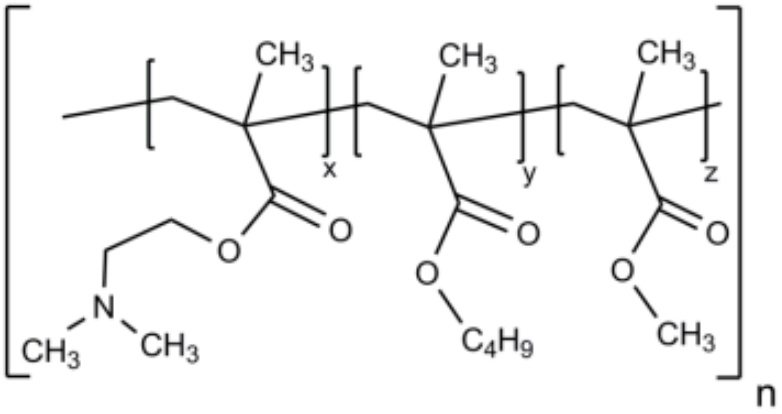
4. Diseño de micropartículas poliméricas cargadas con extracto acuoso de hojas de *P. quadrangularis*

Como se describió en el marco teórico del presente documento, el extracto acuoso de hojas de *P. quadrangularis* ha demostrado actividad sedante cuando este se administra vía oral en algunos modelos animales (Gazola, 2012). Por lo tanto, los materiales que se usen para la elaboración del sistema microparticulado, deben ser aptos para la administración oral. Como material polimérico se eligió Eudragit ® E PO basado en que es un polimero ampliamente usado en aplicaciones farmacéuticas y ha demostrado ser apto para la administración oral de diversas sustancias.

Eudragit ® es una marca comercial de polímeros basados en poliacrilatos diseñados para aplicaciones farmacéuticas. Eudragit ® E PO (nombre IUPAC Poli(butil metacrilato-co-(2-dimetilaminoetil) metacrilato-co-metil metacrilato) 1:2:1) es un copolímero catiónico cuyos monómeros son dimetil amino etil metacrilato, butil metacrilato y metil metacrilato. Estos monómeros se encuentran aleatoriamente distribuidos en la cadena del copolímero (Figura 4-1). Este copolímero es útil para el desarrollo de aplicaciones en las que se requiera proteger el activo de las condiciones ambientales, sin alterar la liberación del mismo y para aplicaciones en las cuales se busque enmascarar el sabor (Nikam et al., 2011; Evonik Industries AG , 2014).

El peso molecular medio del polímero es de 47000 g/mol, es prácticamente insoluble en éter de petróleo y agua pero soluble en soluciones acuosas por debajo de pH 5, metanol, etanol, isopropanol y acetona (Evonik Industries AG , 2014).

Figura 4-1 Fórmula estructural de Eudragit E PO



Basado en lo anterior se propuso un sistema microparticulado que permitiese proteger al extracto de las condiciones medio ambientales al encontrarse incorporado en una red de Eudragit E ® PO, lo que serviría para aumentar la estabilidad del extracto. Adicionalmente también podría mejorar las características organolépticas del mismo (Evonik Industries AG, 2014). Algunos autores han usado este polímero con el fin de proteger diversas sustancias contra las condiciones ambientales.

Algunos autores han realizado estudios basados en Eudragit ® E PO, utilizando diferentes estrategias para su incorporación con el objetivo de enmascarar el sabor de ingredientes activos farmacéuticos (Cerea et al., 2004; Yan, et al., 2010) o incrementar su estabilidad (Lorenzo-Lamosa et al., 1997; Six, et al., 2003; Pereira de Souza et al., 2007)

El sistema microparticulado, basado en este copolímero probablemente liberará su contenido a nivel gástrico debido a su solubilidad pH dependiente, lo cual es conveniente para el extracto utilizado en el presente trabajo debido a que hasta el momento no se han determinado aspectos farmacocineticos del mismo, desconociendo si la actividad sedante es debida a los flavonoides presentes en el extracto o a productos del metabolismo de los mismos, además de desconocer el sitio de absorcíon. De este modo microencapsular el extracto de *P. quadrangularis* en Eudragit ® E PO protegería al extracto de algunas condiciones ambientales que pudiesen afectar la estabilidad del mismo, así mismo lograría una liberación inmediata que le permita ejercer su efecto terapéutico (sedante).

4.1 Metodología

4.1.1 Generalidades

Las microparticulas fueron elaboradas en un Mini Spray Dryer Buchi B – 290, la configuración utilizada fue la recomendada por el fabricante del equipo, configuración abierta para el uso de solventes acuosos.

La elaboración de las micropartículas estuvo enmarcada en dos fases: durante la primera fase se realizó un diseño experimental para evaluar la influencia de algunos factores sobre dos variables respuesta: eficiencia de encapsulación y rendimiento; durante la segunda fase se planteó un diseño experimental basado en los resultados de la fase anterior con el objetivo de evaluar niveles adicionales de los factores para la elaboración de micropartículas y de este modo seleccionar las condiciones más adecuadas para obtenerlas.

4.1.2 Evaluación inicial de factores operacionales y composicionales en la obtención de microparticulas de Eudragit ® E PO cargadas con un extracto acuoso de hojas *P. quadrangularis.*

Con el fin de evaluar la influencia de algunas variables en la elaboración de micropartículas de Eudragit ® E PO cargadas con extracto acuoso de hojas de *P. quadrangularis*; se planteó un diseño experimental asimétrico de $3^{(3-1)}\ 2^{(2-1)}$ tratamientos, obteniendo un total de 18 experimentos a realizar con diferentes combinaciones de variables de entrada. Las variables respuesta fueron el rendimiento y eficiencia de encapsulación. Las variables de entrada estudiadas fueron: temperatura de entrada (100°C, 120°C, 140°C), velocidad de aspersión (10%, 15%, 20%), caudal de aire (80%, 100%), concentración de sólidos (2%, 6%, 10% (p/v)) y proporción copolímero: extracto (2:1 y 3:1) (Tabla 4-1). Estas variables y sus niveles se eligieron de acuerdo a los reportes previamente citados (Tabla 1-2), las posibilidades propias del equipo y la cantidad de extracto disponible, las tres variables

operacionales se pueden controlar en el equipo usado, y las variables composicionales se evaluaron basándose en la cantidad de extracto disponible para los experimentos.

Este diseño experimental permite usar los resultados derivados del mismo, para la construcción de un modelo que describa el comportamiento de la muestra de datos. Es importante destacar que el diseño experimental es no balanceado y por tanto la elección del orden de los factores se realizó de manera aleatoria, para eliminar el error debido a la elección sesgada de los mismos. Es de realzar que este diseño experimental se escogió para obtener la mayor cantidad de información posible, con el menor número de ensayos, teniendo en cuenta la limitación en la cantidad de extracto.

Tabla 4-1 Diseño experimental utilizado para la evaluacion inicial de factores en elaboración de micropartículas de Eudragit ® E PO cargadas con un extracto acuoso de hojas de *P. quadrangularis*.

Ensayo	Temperatura de entrada (°C)	Velocidad de aspersión (%)	Caudal de aire (%)	Concentración de sólidos (%p/v)	Proporción copolímero:extracto
1	100	10	80	2	2
2	100	10	80	10	3
3	100	15	100	2	2
4	100	15	100	10	3
5	100	20	80	2	2
6	100	20	80	10	3
7	120	10	100	6	3
8	120	10	100	10	2
9	120	15	80	6	3
10	120	15	80	10	2
11	120	20	100	6	3
12	120	20	100	10	2
13	140	10	80	2	3
14	140	10	80	6	2
15	140	15	100	2	3
16	140	15	100	6	2
17	140	20	80	2	3
18	140	20	80	6	2

4.1.3 Evaluación adicional de factores operacionales y composicionales en la obtención de micropartículas de Eudragit ® E PO cargadas con un extracto acuoso de *P. quadrangularis.*

Con base en los resultados obtenidos en el diseño experimental anterior, se planteó un nuevo diseño experimental del tipo factorial completo sin repeticiones (2^3), el cual tuvo como objetivo profundizar en el conocimiento del comportamiento de las variables respuesta (Tabla 4-2).

Tabla 4-2 Diseño experimental utilizado para la evaluación adicional de variables de entrada en la elaboración de micropartículas de Eudragit ® E PO cargadas con un extracto acuoso de hojas de *P. quadrangularis*

Ensayo	Temperatura de entrada (°C)	Velocidad de aspersión (%)	Caudal de aire (%)	Concentración de solidos (%w/v)	Proporción copolimero:extracto
1 N	100	10	100	1	2
2 N	100	10	100	1	3
3 N	100	10	100	5	2
4 N	100	10	100	5	3
5 N	100	5	100	1	2
6 N	100	5	100	1	3
7 N	100	5	100	5	2
8 N	100	5	100	5	3

4.1.4 Elaboración de micropartículas

Se preparó una solución de copolímero y extracto en medio ácido. Para la elaboración de las micropartículas se utilizaron 2 g de extracto liofilizado, la cantidad necesaria de polímero (4 ó 6 g) dependiendo de la proporción copolimero:extracto requerida y se realizó la disolución con agitacion magnetica en la cantidad de solvente (ácido acético 1%), según el diseño experimental variando de este modo la concentración de sólidos (1, 2, 5, 6, ó 10 %). A continuación, se realizó la aspersión en el equipo Spray Dryer según las condiciones propias de cada diseño experimental (temperatura de entrada, caudal de aire, y velocidad

de aspersión). El rotámetro se ajustó a una altura de 35 mm en todos los ensayos lo que equivale a un flujo volumetrico de 414 L/h.

Cabe aclarar que las variables caudal de aire y velocidad de aspersión estan expresadas en porcentaje, dado que el controlador del equipo asi lo reporta. Estos porcentajes se basan en la capacidad máxima del equipo, así la capacidad del aspirador permite modular el caudal de aire y la capacidad de la bomba peristáltica modula la velocidad de aspersión.

4.1.5 Caracterización de micropartículas

Se determinó la humedad del sólido obtenido luego de la aspersión, mediante el uso de la balanza de humedad Radwag MAC series IR.
Se realizaron cálculos de rendimiento (R%) mediante el cociente del peso inicial de sólidos contenidos en la solución que fue asperjada (Mo) y la masa seca (Mf) final de micropartículas obtenidas (Ecuación 4-1)

Ecuación 4-1 Rendimiento del proceso de aspersión

$$\boldsymbol{R}(\%) = \frac{\boldsymbol{Mf}\ (\boldsymbol{g})}{\boldsymbol{Mo}\ (\boldsymbol{g})} * \mathbf{100}\%$$

Se realizaron cálculos de la Eficiencia de Encapsulación (EE%), mediante la cuantificación de extracto que no se encapsuló o quedo adsorbido en la superficie en el sólido después de la aspersión (mc) y realizando el calculo con base en la masa de extracto inicial contenido en la solución a asperjar (mo) según la Ecuación 4-2.

Ecuación 4-2 Eficiencia de encapsulación

$$EE(\%) = \frac{mo - mc}{mo} * 100\%$$

La cuantificación se realizó de la siguiente manera: una muestra de aproximadamente 0,9 g de microparticulas se suspendió en 3 mL de agua destilada, la suspension obtenida fue sometida a agitación durante 1 minuto en un vortex. A continuación la suspensión fue filtrada a través de una membrana de 0,22 µm, 1 mL de la solución filtrada fue diluida con 1 mL de metanol y analizada mediante el sistema cromatográfico, obteniendo así la cantidad libre de extracto, que por diferencia permite calcular la cantidad de extracto contenido en las microparticulas (Lamprecht et al., 2000; Martins et al., 2007).

Se realizó la determinación de tamaño de particula, mediante microscopia óptica através del Software Motic Imagen Plus, debidamente calibrado, en el cual se determinó el tamaño de mas de 500 particulas por muestra. Posteriormente, se determinó el tamaño de partícula y la distribución de tamaño de las micropartículas obtenidas.

Adicionalmente se realizó un estudio de disolución como parte de la caracterización de las micropartículas. Brevemente, a tres muestras de 50 mg de micropartículas elaboradas con las mejores condiciones seleccionadas se les adicionaron 5 mL de ácido clorhídrico 0,1 N y se sometieron a agitación orbital en tubos Falcon manteniendo una temperatura de 37 ºC, se tomó un muestra de 1 mL de cada tubo y se diluyó con 1 mL de metanol a los 15, 30, 60 120 y 180 minutos. Cada solución fue analizada por triplicado con la metodología previamente validada y filtrada por una membrana de 0,22 µm, previo a la inyección en el CLAE.

4.1.6 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos correspondientes se realizaron utilizando Microsoft Excel y el paquete estadístico Software Libre R (El código utilizado se encuentra en el anexo A).

.

4.2 Resultados y discusión

Se determinó el tamaño de partícula mediante el uso de microscópia óptica como se describe en la metodología, por cada lote se realizó la medida de más de 500 partículas (n) y con base en estos datos se construyeron las distribuciones de tamaño de partícula y se determinó su diámetro medio y el diámetro volumen superficie (dvs), los resultados se resumen en la Tabla 4-3.

Tabla 4-3 Parámetros de tamaño y distribución de tamaño de partícula de las micropartículas de Eudragit ® E PO, cargadas con un extracto acuoso de *P. quadrangularis*, obtenidas por secado por aspersión.

LOTE	n	Diámetro medio (µm)	Des. Est.	Min. (µm)	Max. (µm)	Rango(µm)	Nº Clases	Amplitud	dvs
1	968	6,17	3,3	0,2	40	39,8	11	3,6	1,96
2	1084	6,17	2,37	2,4	30,4	28	11	2,5	1,44
3	1053	4,61	1,37	0,8	13,6	12,8	11	1,2	0,91
4	890	6,88	2,44	1,6	24	22,4	11	2	1,51
5	854	4,55	1,21	0,1	9,6	9,5	11	0,9	0,86
6	1170	6,67	3,41	2,4	37,6	35,2	11	3,2	1,92
7	929	7,98	5,61	1,6	36,8	35,2	11	3,2	2,64
8	1001	7,4	5,28	0,8	56,8	56	11	5,1	3,08
9	973	7,09	4,23	1,2	22,4	21,2	11	1,9	1,95
10	889	10,16	6,4	2,4	55,2	52,8	11	4,8	3,57
11	531	12,51	6,52	6,4	44,8	38,4	10	3,8	3,54
12	467	8,36	4,76	1,5	33,6	32,1	10	3,2	2,47
13	876	5,91	2,47	1,6	16,8	15,2	11	1,4	1,32
14	364	15,47	6,61	4	48,8	44,8	9	5	3,64
15	1058	5,61	2,49	1,6	11,2	9,6	11	0,9	1,25
16	1002	11,7	6,01	8	60,8	52,8	11	4,8	3,36
17	1104	10,19	4,56	3,4	22,2	18,8	11	1,7	2,35
18	1010	13,09	6,96	2,4	29	26,6	11	2,4	3,27

En el Anexo B se presentan los histogramas y las tablas de distribución de clases para cada uno de los lotes obtenidos. Los resultados de la determinación de tamaño de partícula, permiten observar que los sistemas microparticulados sí cuentan con los tamaños micrométricos esperados para el proceso llevado a cabo a pesar de que se observaron algunas partículas aglomeradas en las muestras (los cuales fueron observados en la evaluación de tamaño de partícula, pero que no fueron tenidos encuenta en la recolección de datos). Por otra parte, se puede observar en los histogramas mencionados que las muestras presentan una distribución normal y que estan centradas en el diámetro promedio reportado. En la mayoría de lotes, se encontraron particulas de tamaño muy grande y no reportan particulas de tamaño muy pequeño, lo que ocasiona que las distribuciones tenga un alto número de clases con frecuencias muy bajas en las clases superiores. Adicionalmente en el anexo B se presenta un analisis estadístico que muestra los resultados de comparaciones multiples entre los diámetros medios, utilizando el Test de Tukey.

De otra parte, se evaluaron las variables respuesta: rendimiento y eficiencia de encapsulación y su comportamiento al modificar los factores (variables de entrada) temperatura de entrada, velocidad de aspersión, caudal de aire, concentración de sólidos y proporción copolímero: extracto. Es de resaltar que los niveles de las variables a evaluar fueron escogidos con base en los reportes existentes para los casos presentados en el primer capitulo de este trabajo (Tabla 1-2). La temperatura de entrada evaluada fue 100°C, 120 °C y 140 °C; la velocidad de aspersión fue 10%, 15% y 20%; el caudal de aire usado fue 100% y 80%; el contenido de sólidos estudiados fue de 2%, 6% y 10%(p/v); y finalmente la evaluación de ñla proporción copolímero:extracto fue de 2:1 y 3:1. En los cuales se usó la metodología de secado por aspersión para la obtención de micropartículas poliméricas cargadas con diferentes extractos vegetales. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 4-4.

Tabla 4-4 Rendimiento y eficiencia de encapsulación de micropartículas poliméricas de *P. quadranqularis* obtenidas por secado por aspersión. Fase I

Ensayo	Temperatura de entrada (ºC)	Velocidad de aspersión (%)	Caudal de Aire (%)	Contenido de sólidos (%p/v)	Proporción copolimero:extracto	Contenido de agua (%p/p)	Rendimiento (%)	Eficiencia de encapsulación (%)
1	100	10	80	2	2	3,65	64,21	92,44
2	100	10	80	10	3	2,797	69,88	90,89
3	100	15	100	2	2	3,884	70,83	91,81
4	100	15	100	10	3	2,794	67,69	78,23
5	100	20	80	2	2	5,298	49,12	95,89
6	100	20	80	10	3	7,034	53,60	80,05
7	120	10	100	6	3	1,786	75,90	92,37
8	120	10	100	10	2	2,362	70,46	84,98
9	120	15	80	6	3	3,297	58,95	93,03
10	120	15	80	10	2	3,614	57,28	87,04
11	120	20	100	6	3	2,655	77,43	72,62
12	120	20	100	10	2	4,094	69,73	70,44
13	140	10	80	2	3	0,855	73,90	94,52
14	140	10	80	6	2	4,255	62,60	91,17
15	140	15	100	2	3	2,206	54,44	85,37
16	140	15	100	6	2	1,802	52,29	87,58
17	140	20	80	2	3	2,198	34,62	85,51
18	140	20	80	6	2	3,106	46,11	91,19

Para la evaluación de los datos, en primera instancia se verificó la normalidad de los resultados obtenidos para rendimiento y eficiencia de encapsulación por medio del software R, empleando la prueba de Shapiro-Wilk. Para la variable rendimiento se obtiene un valor p igual a 0,4 por lo que se acepta la hipótesis de normalidad (la hipótesis nula es que los datos provienen de una muestra distribuida normalmente por ende un p valor mayor

a 0,05 es apto para aceptar la hipótesis). Por otro lado para la variable eficiencia se obtiene un valor p cercano a 0 por lo que se concluye que los datos no se distribuyen normalmente y se hace necesario realizar una transformación, se prefiere buscar la transformacvion de las variables para luego utilizar pruebas y modelos paramétrico donde uno de los requisitos indispensables es la normalidad . Por esta razón, en lugar de trabajar con la variable en su escala normal, se trabaja con la variable eficiencia elevada a la cuarta potencia y luego de la transformación se obtiene un valor p igual a 0,2 por lo que se tiene normalidad para la variable transformada. Es de tener en cuenta, que la normalidad se evalúa porque es uno de los supuestos estadísticos que se deben verificar para garantizar que el modelo a construir tiene validez matemática en la descripción de los datos presentados. El test de Shapiro-Wilk prueba el supuesto de los datos provienen de una población que se distribuye normalmente (Smith, 1998).

Posterior a la verificación de la normalidad de las variables, se realizaron las centralizaciones propuestas por Cristancho y Melo (2005) para la optimización de una respuesta dual, para las respuestas rendimiento y eficiencia. De esta forma se usa la Ecuación 4-3 y la Ecuación 4-4

Ecuación 4-3 Centralizacion de la variable respuesta rendimiento para la obtención de micropartículas poliméricas obtenidas, cargadas con extracto de hojas de *P. quadrangularis*.

$$Rend.1 = \frac{Rend - \left(\frac{\max(rend) + \min(rend)}{2}\right)}{\frac{\max(rend) - \min(rend)}{2}}$$

Ecuación 4-4 Centralización de la variable respuesta eficiencia de encapsulación de las micropartículas poliméricas obtenidas, cargadas con extracto de hojas de *P. quadrangularis*

$$Efi.1 = \frac{Efi - \left(\frac{\max(efi) + \min(efi)}{2}\right)}{\frac{\max(efi) - \min(efi)}{2}}$$

El modelo planteado por Cristancho y Melo aplica a los resultados obtenidos, ya que existen dos variables respuesta (eficiencia de encapsulación y rendimiento) que pueden ser explicadas mediante un conjunto de variables controlables (temperatura de entrada,

velocidad de aspersión, caudal de aire, concentración de sólidos y proporción copolímero:extracto) y que los datos obtenidos por medio del diseño experimental se ajustan a dos modelos empiricos, uno para cada una de las variables respuesta. En nuestro caso, los resultados de la variable respuesta eficiencia de encapsulación fueron elevados a la cuarta potencia para normalizarlos de acuerdo a las transformaciones de box-cox. Ahora, como es necesario que las variables respuesta sean maximizadas dualmente, es decir que se obtengan los resultados mas altos simultáneamente, se deben eliminar los efectos de escala y localización. Por tanto los autores Cristancho y Melo han propuesto la utilización de una función lineal en la centralización que tiene en cuenta los máximos y mínimos obtenidos en cada una de las variables respuesta y de esta manera tener una escala no natural, que permite la visualización de los efectos de las variables controlables sobre las variables respuesta, comprendida entre -1 y 1 (la centralización es llevada a cabo mediante la Ecuación 4-3 y la Ecuación 4-4) (Cristancho y Melo, 2005).

Se modeló cada una de las respuestas por medio del software R con la función *lm* y con un procedimiento de selección hacia adelante y hacia atrás “Step Wise” se determinó cuáles factores e interacciones fueron significativas para el modelo y se realizó la regresión de donde se obtiene el modelo matemático que describe las variables repuesta de la muestra que se evaluó, en este caso la Ecuacion 4-5 y la Ecuación 4-6. Es importate resaltar que las variables estudiadas se suelen tomar como variables de tipo discreto siendo (-1) (0) y (1), los tres posibles niveles de evaluación, durante el análisis de resultados. Esta interpretación es correcta siempre y cuando las conclusiones sean de carácter cualitativo, en caso de requerirse un analisis de carácter cuantitativo debe considerarse que las variables controlables también se han centralizado para la construcción del modelo y por tanto los estimadores de la regresión lineal deben ser recalculados para la obtención de respuestas cuantitativas (Cristancho y Melo, 2005). En el presente trabajo el análisis es cualitativo, no se presentan los resultados de factores de corrección necesarios para el un entendimiento cuantititativo.

Ecuación 4-5 Modelo para la descripción de la variable rendimiento

$$Rend = 0.2879 - 0.2T - 0.2498VA + 0.2411CA + 0.2591VA * CA$$

Ecuación 4-6 Modelo para la descripción de la variable eficiencia de encapsulación

$$Efi = 0.45022 - 0.15119T - 0.37825VA - 0.28362CA - 0.37178VAG - 0.10054P - 0.16049VA - 0.32287VAG * VAG - 0.06759T * VA - 0.18017VA * CA$$

Se puede observar para el modelo empírico que describe el comportamiento del rendimiento, que ésta variable respuesta solo se afecta de manera estadísticamente significativa por las variables temperatura (T), velocidad de aspersión (VA), caudal de aire (CA), con una interacción de velocidad de aspersión (VA) y caudal de aire (CA) mientras que las variables proporción copolimero:extracto y concentración de sólidos no interfieren en la respuesta.

Como se observa en la Ecuación 4-5 el término T, es decir la temperatura está acompañado de un signo negativo, esto indica que temperaturas más bajas favorecen el rendimiento total como ha sido descrito por algunos autores, cuyos experimentos también se han llevado a cabo con polímeros del tipo Eudragit ® (Rassu et al., 2008). Se observó adicionalmente que el término CA (caudal de aire) está acompañando por un signo positivo, indicando que un caudal de aire (CA) alto aumenta el rendimiento del proceso de secado por aspersión, esto debido a que un flujo mayor de aire favorece el intercambio de agua entre la gotícula y el medio secante, produciendo polvos más secos y reduciendo de esta manera la adherencia a las partes del equipo. Resultados similares han sido reportados en estudios llevados a cabo tanto con Eudragit como con otros materiales de recubrimiento (Lorenzo- Lamosa et al., 1998; Ribeiro y Pereira, 2007).

Sin embargo, para la velocidad de aspersión (VA) el efecto se encuentra en dos elementos de la ecuación con signos contrarios, lo que manifiesta que este factor afecta en dos vías opuestas el rendimiento. Por tanto, se requiere una exploración más profunda de los resultados, esta exploración se puede realizar mediante los diagramas de superficie respuesta que se presentan más adelante.

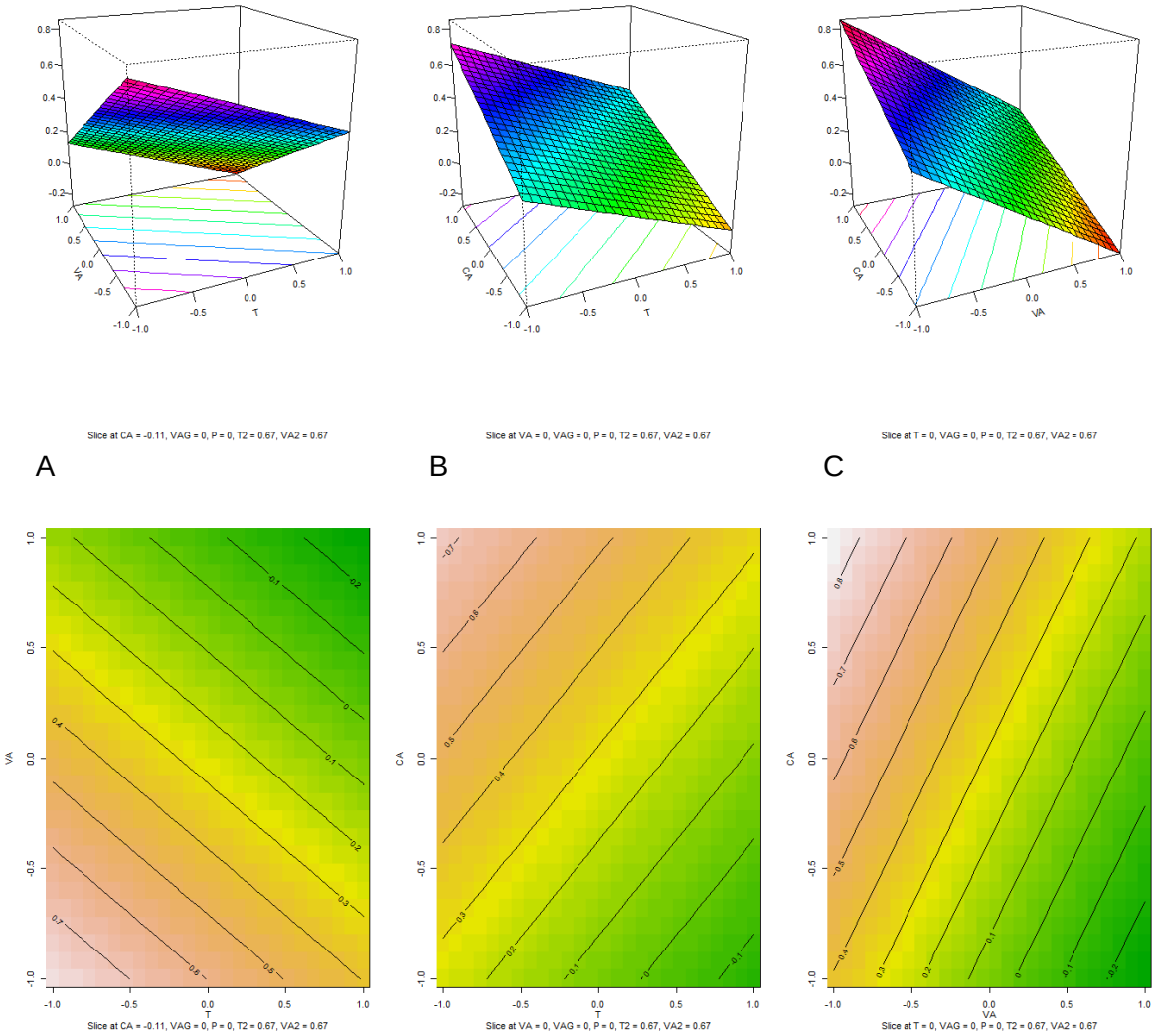
Respecto a la variable respuesta eficiencia de encapsulación, esta se ve estadisticamente influenciada por todas las variables estudiadas temperatura (T), velocidad de aspersión (VA), caudal de aire (CA), proporción de copolímero:extracto (P) y el contenido de sólidos

(VAG). Adicionalmente, se presentan varias interacciones en las variables evaluadas, como se expresa en la ecuación 4-6, en general la respuesta no se considera aditiva. De esta ecuación se puede deducir que temperaturas bajas favorecen la eficiencia de encapsulación, este comportamiento ha sido observado y reportado previamente (Rassu et al., 2008).

En todos los casos, dentro de los términos de la ecuación en los que está presente la velocidad de aspersión (VA) y el caudal de aire (CA) se aprecia que un caudal de aire bajo y una velocidad de aspersión baja, generan eficiencias de encapsulación más altas. Las interacciones presentes en el modelo hacen el análisis de resultados especialmente difícil para las variables: proporción copolímero:extracto (P) y contenido de sólidos (VAG). En términos generales, es posible inferir que la proporción de copolímero baja favorece la eficiencia de encapsulación, sin embargo el efecto de la variable de contenido de sólidos no se encuentra bien definido dentro del modelo.

Luego de obtener los anteriores modelos, se realizaron los gráficos de superficie de respuesta para determinar cuáles niveles de los factores maximizan las variables rendimiento y eficiencia, mediante las funciones *contour* y *persp* de R, obteniéndose la Figura 4-2.

Figura 4-2 Influencia de algunos factores sobre el rendimiento de microencapsulación por técnica de secado por aspersión de un extracto acuoso de hojas de *P. quadrangularis*.



A Influencia de los factores temperatura y velocidad de aspersión B Influencia de los factores temperatura y caudal de aire C Influencia de los caudal de aire y velocidad de aspersión

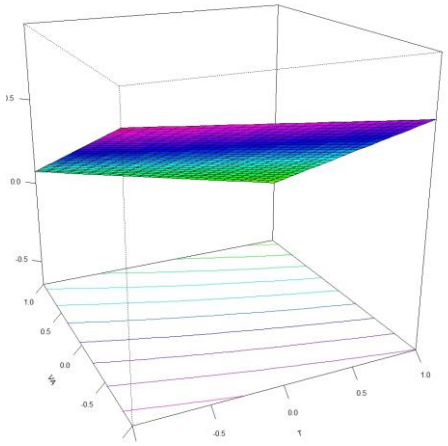
En la parte superior de la Figura 4-2 se observan los diagramas de superficie respuesta en tres dimensiones, se tiene la misma información en dos dimensiones en la parte inferior

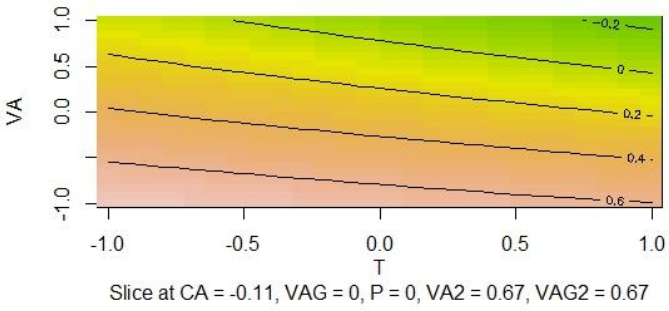
de la figura. En esta última los colores dan un indicio de los valores en dónde se maximiza la variable rendimiento, los colores cálidos son los lugares donde se favorece la respuesta.Teniendo en cuenta que solamente 3 variables de entrada resultaron significativas para este modelo (temperatura, caudal de aire y velocidad de aspersión), se realizaron los tres gráficos correspondientes.

Para la eficiencia de encapsulación se observan diez gráficas que corresponden a la evaluación de los cinco factores que resultaron significativos (temperatura de entrada, velocidad de aspersión, caudal de aire, proporción copilimero:extracto y contenido de solidos), en cada grafica se evalua la respuesta eficiencia para dos factores. Figura 4-3.

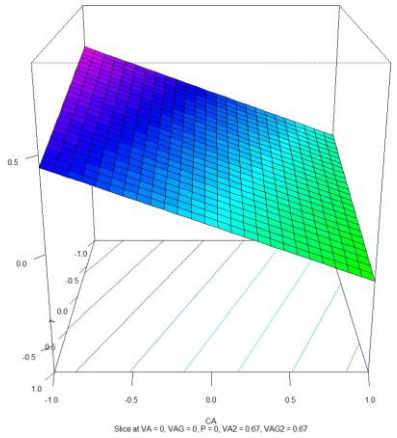
Figura 4-3 Influencia de algunas variables sobre la eficiencia de microencapsulación de micropartículas de Eudragit E PO cargadas con un extracto acuoso de hojas de *P. quadrangularis* elaboradas por técnica de secado por aspersión.

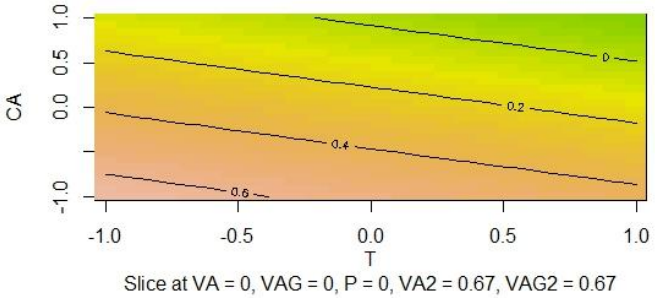
A



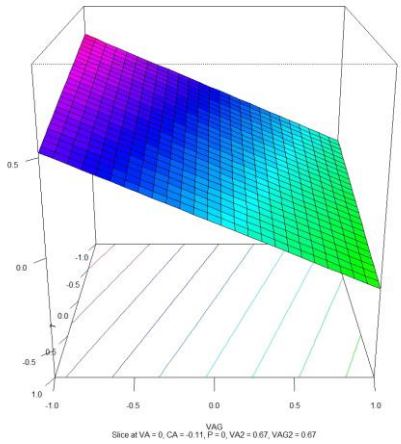


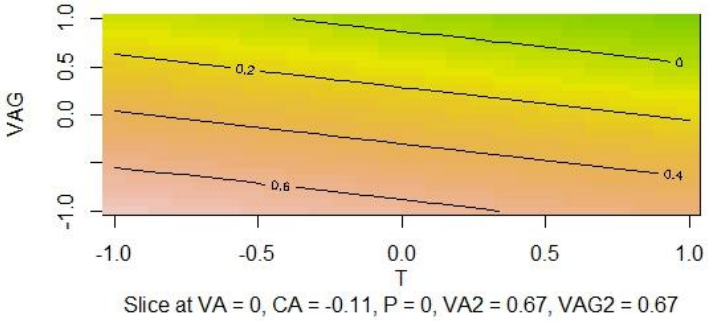
B


CA
Slice at VA = 0, VAG = 0, P = 0, VA2 = 0.67, VAG2 = 0.67

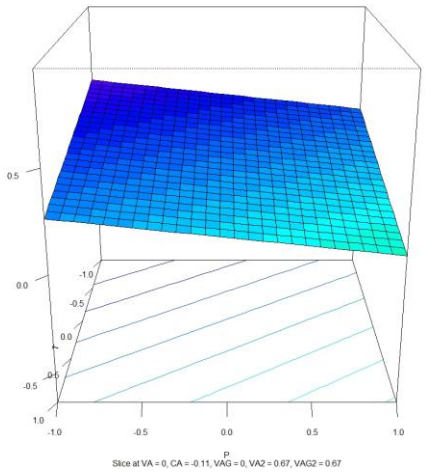

CA
T
0
0.2
0.4
0.6
Slice at VA = 0, VAG = 0, P = 0, VA2 = 0.67, VAG2 = 0.67

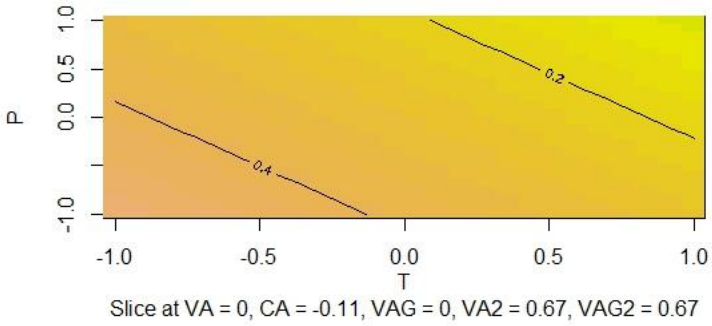
C


VAG
Slice at VA = 0, CA = -0.11, P = 0, VA2 = 0.67, VAG2 = 0.67

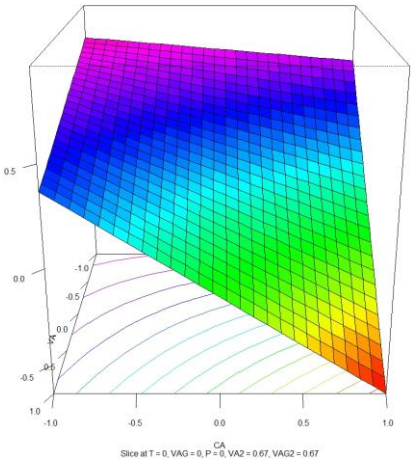

VAG
T
0
0.2
0.4
0.6
Slice at VA = 0, CA = -0.11, P = 0, VA2 = 0.67, VAG2 = 0.67

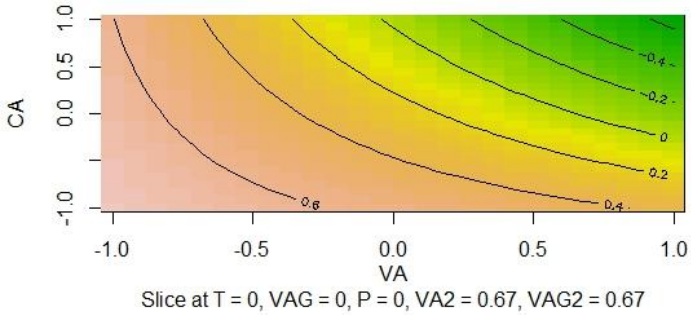
D


P
Slice at VA = 0, CA = -0.11, VAG = 0, VA2 = 0.67, VAG2 = 0.67

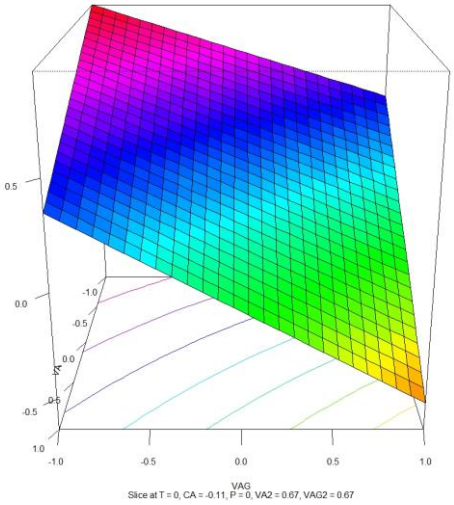

P
T
0.2
0.4
Slice at VA = 0, CA = -0.11, VAG = 0, VA2 = 0.67, VAG2 = 0.67

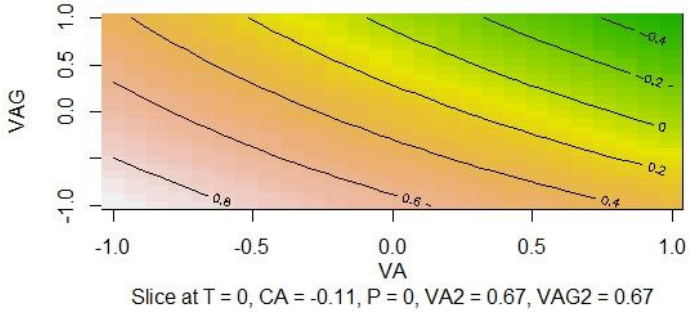
E


CA
Slice at T = 0, VAG = 0, P = 0, VA2 = 0.67, VAG2 = 0.67

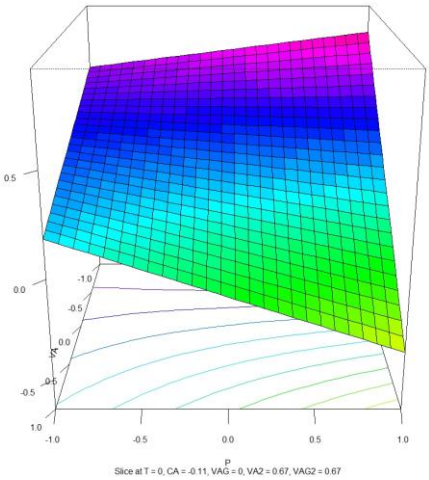

CA
VA
0.6
0.4
0.2
0
Slice at T = 0, VAG = 0, P = 0, VA2 = 0.67, VAG2 = 0.67

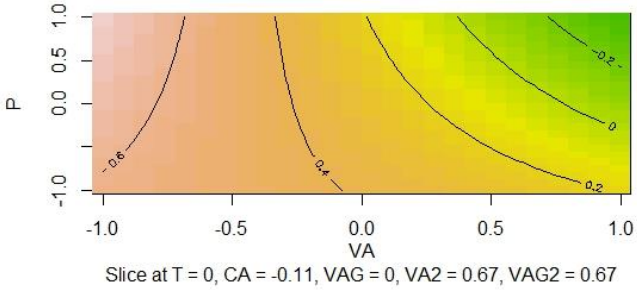
F


VAG
VA
Slice at T = 0, CA = -0.11, P = 0, VA2 = 0.67, VAG2 = 0.67

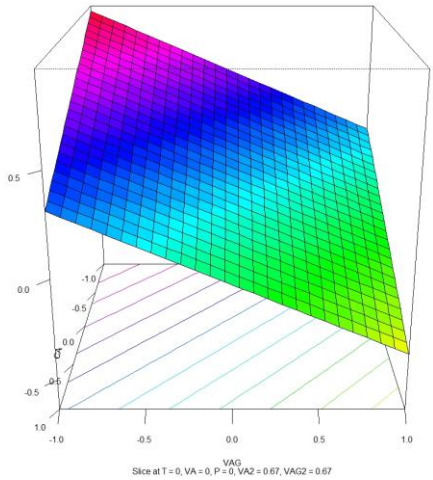

VAG
VA
Slice at T = 0, CA = -0.11, P = 0, VA2 = 0.67, VAG2 = 0.67

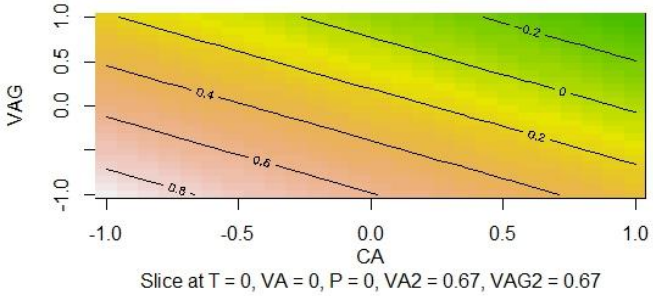
G


P
VA
Slice at T = 0, CA = -0.11, VAG = 0, VA2 = 0.67, VAG2 = 0.67

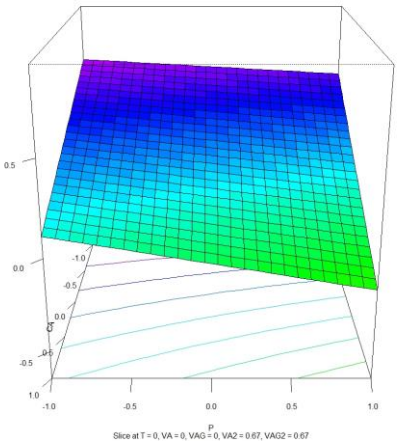

P
VA
Slice at T = 0, CA = -0.11, VAG = 0, VA2 = 0.67, VAG2 = 0.67

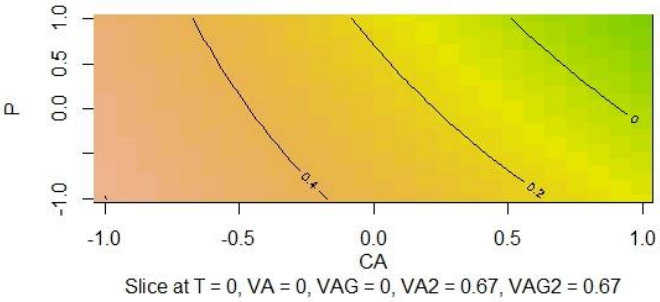
H


VAG
Slice at T = 0, VA = 0, P = 0, VA2 = 0.67, VAG2 = 0.67

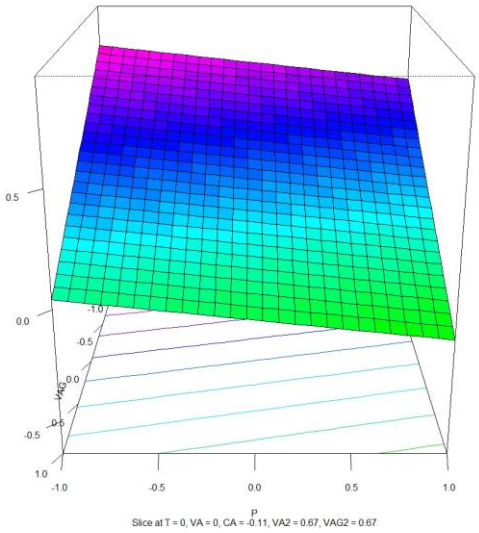

VAG
CA
Slice at T = 0, VA = 0, P = 0, VA2 = 0.67, VAG2 = 0.67

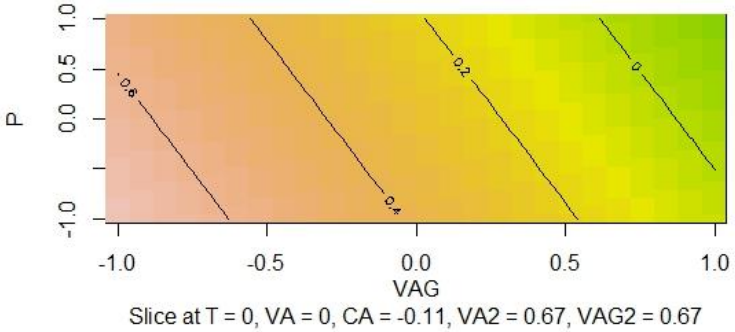
I


P
Slice at T = 0, VA = 0, VAG = 0, VA2 = 0.67, VAG2 = 0.67


P
CA
Slice at T = 0, VA = 0, VAG = 0, VA2 = 0.67, VAG2 = 0.67

J





A) Influencia de los factores temperatura y velocidad de aspersión. B) Influencia de los factores temperatura y caudal de aire. C) Influencia de los factores temperatura y contenido de sólidos. D) Influencia de los factores temperatura y proporción copolímero: extracto. E) Influencia de los factores caudal de aire y velocidad de aspersión. F) Influencia de los factores velocidad de aspersión y contenido de solidos. G) Influencia de los factores velocidad de aspersión y proporción polimero:extracto. H) Influencia de los factores caudal de aire y contenido de sólidos. I) Influencia de los factores caudal de aire y proporción polimero:extracto. J) Influencia de los factores proporción polimero:extracto y contenido de sólidos

Finalmente, como no fue posible explicar la influencia de todos los factores sobre la eficiencia de encapsulación se decidió realizar un nuevo diseño experimental que permitiese una exploración más exhaustiva del comportamiento de las variables respuesta respecto a las variables proporción copolímero:extracto, velocidad de aspersión y concentración de sólidos.

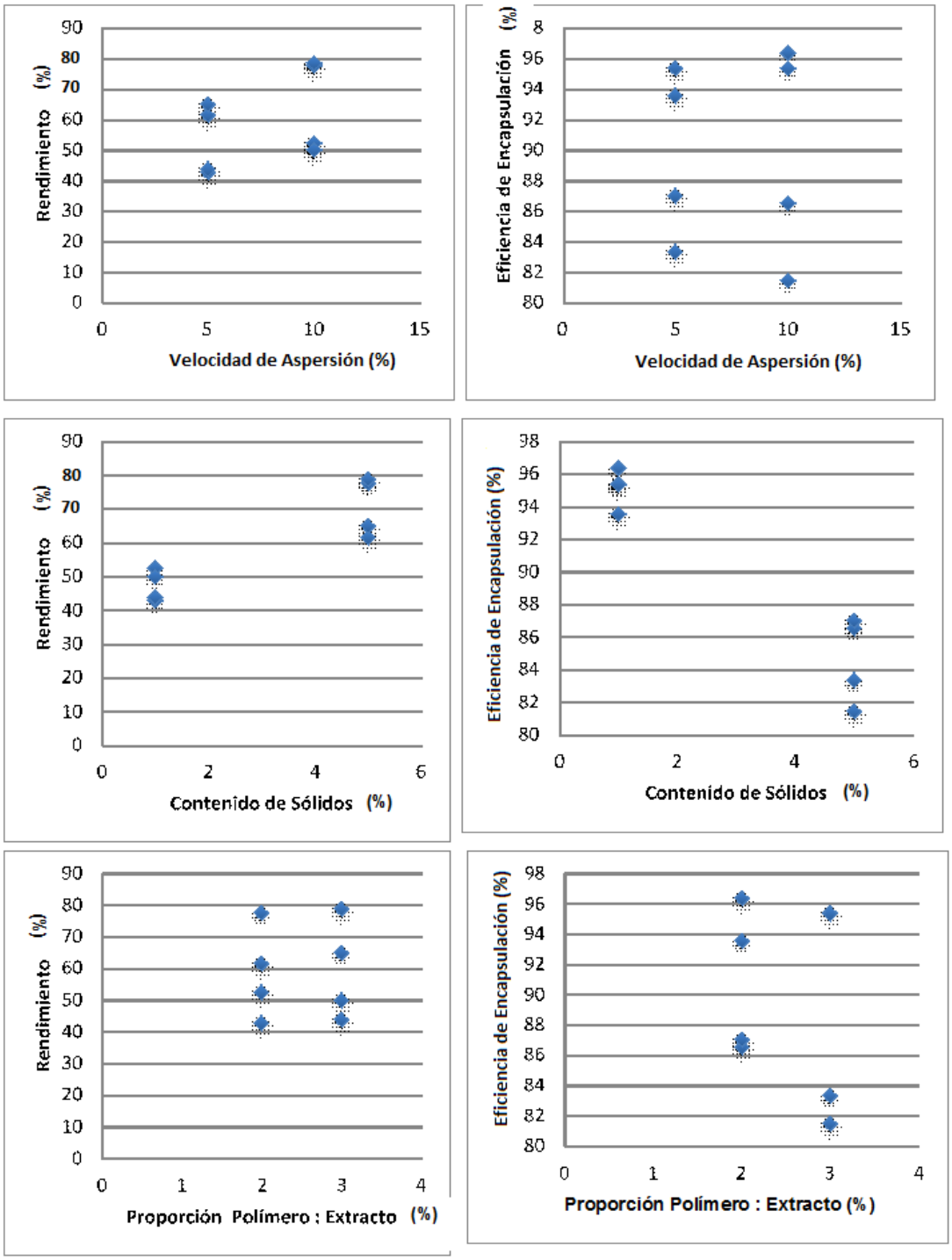
En este nuevo diseño las variables temperatura de entrada y caudal de aire fueron fijadas en los valores en donde se obtuvo la mejor respuesta de rendimiento y eficiencia de encapsulación: temperatura de entrada 100°C y caudal 100%. Por otro lado, para la proporción copolímero:extracto se evaluaron los mismos niveles del primer diseño experimental, por considerar que evaluar niveles superiores no era pertinente debido a la cantidad de polímero que se requería. La concentración de solidos y la velocidad de aspersión fueron evaluadas en niveles diferentes, en ambos casos los niveles evaluados fueron más bajos que los usados en el primer diseño experimental. Los resultados derivados se resumen en la tabla 4-5.

Tabla 4-5 Rendimiento y eficiencia de encapsulación de micropartículas de Eudragit ® E PO cargadas con un extracto acuoso de *P. quadrangularis*, obtenidas por secado por aspersión. Fase II

Lote	Temperatura de Entrada (°C)	Velocidad de Aspersión (%)	Caudal de Aire (%)	Concentración de sólidos (%w/v)	Proporción Polimero:Extracto	Contenido de agua (%p/p)	Rendimiento (%)	Eficiencia de Encapsulación (%)
1N	100	10	100	1	2	2,985	52,31	96,32
2N	100	10	100	1	3	3,856	49,87	95,34
3N	100	10	100	5	2	2,847	77,52	86,51
4N	**100**	**10**	**100**	**5**	**3**	**3,698**	**78,52**	**81,43**
5N	100	5	100	1	2	3,957	42,65	93,54
6N	100	5	100	1	3	2,957	43,75	95,32
7N	100	5	100	5	2	2,621	61,45	86,98
8N	100	5	100	5	3	2,564	64,87	83,32

Estos resultados se pueden visualizar mejor con los diagramas de puntos construidos para la revisión de las tres variables que se evaluaron en dos niveles diferentes cada una (Figura 4-4).

Figura 4-4 Diagrama de puntos de la influencia de la velocidad de aspersión, contenido de sólidos y proporción copolímero: extracto sobre el rendimiento y la eficiencia de encapsulación de micropartículas de Eudragit E PO, cargadas con un extracto acuoso de *P. quadrangularis.*



Cada punto representa el valor medio de la eficiencia de encapsulación, o el valor de rendimiento evaluado en cada uno de los ensayos (según corresponde).

Cada uno de los diagramas muestra el comportamiento de la variable respuesta (rendimiento ó eficiencia de encapsulación, según corresponde) en cada uno de los niveles para los factores evaluados, sin embargo estos diagramas no tienen en cuenta interacciones entre las variables y en su lugar representan comportamientos puntuales sin tener en cuenta la influencia de cada factor en la respuesta final.

Como ha sido reportado previamente en la literatura, las bajas velocidades de aspersión favorecen los altos rendimientos debido a que al realizar una aspersión lenta la cantidad de gotículas asperjadas es menor y el secado se ve favorecido en estas condiciones. Este comportamiento se ve reflejado en los resultados del primer diseño experimental, pero en este nuevo diseño al disminuir aún más la velocidad de aspersión el rendimiento no mejora y en su lugar decae, por ende el valor de 10% se considera un valor adecuado para asperjar las soluciones en los niveles evaluados. Adicionalmente y como se puede observar en el diagrama, la eficiencia de encapsulación no es afectada por la velocidad de aspersión. Por otro lado, al tener un contenido de sólidos menor, se mejora la respuesta de la eficiencia de encapsulación. Sin embargo, un contenido bajo de sólidos resulta en rendimientos bajos y al igual que en el primer diseño experimental, el control de esta variable es fundamental para mejorar la respuesta dual de eficiencia y rendimiento. Asi mismo, se evidenció que el factor proporción de copolímero:extracto no influye en ninguna de las dos variables respuesta estudiadas.

Los lotes derivados del segundo diseño experimental también fueron caracterizados en cuanto al tamaño de particula. El resumen de los resultados obtenidos está en la Tabla 4-6. Al igual que en los lotes 1 a 18, elaborados en el primer diseño experimental, los lotes 1N a 8N, presentan tamaños micrométricos y distribuciones centradas en el promedio, con un alto número de clases con bajas frecuencias absolutas en las clases altas. En el anexo B se incluyen los histogramas de distribución de frecuencias y se presentan los resultados de comparaciones múltiples realizados mediante el test de Tuckey.

.

Tabla 4-6 Parámetros de tamaño y distribución de tamaño de partícula de las micropartículas de Eudragit ® E PO, cargadas con un extracto acuoso de *P. quadrangularis*, obtenidas por secado por aspersión Fase II

	Lote							
Parámetro	**1N**	**2N**	**3N**	**4N**	**5N**	**6N**	**7N**	**8N**
N	1040	1043	671	804	660	686	780	786
Diámetro medio (µm)	7,3	7,3	11,7	7,8	13,6	11,4	6,1	10,7
Desv Est.	4,9	4,9	6,0	3,8	8,5	5,7	4,8	6,2
Min	1,6	0,2	3,2	0,4	8,0	3,2	1,0	8,0
Max	50,4	50,4	34,4	28	52	36	36,8	45,6
Rango	48,8	50,2	31,2	27,6	44	32,8	35,8	37,6
No. De Clases	11	11	10	11	10	10	11	11
Intervalo	4,4	4,6	3,1	2,5	4,4	3,3	3,3	3,4
dvs	2,9	2,9	3,1	2,0	4,3	3,1	2,9	3,5

De acuerdo a los resultados obtenidos, se consideró que la mejor combinación de factores para obtener micropartículas con mayores rendimientos y eficiencias de encapsulación, son lo siguientes:

- Temperatura de entrada: 100 ºC
- Velocidad de Aspersión: 10%
- Caudal de Aire: 100%
- Concentración de Sólidos: 5%
- Proporción de copolímero:extracto: 3:1

A modo de confirmación, se realizaron ensayos adicionales para verificar que los datos de rendimiento y eficiencia de encapsulación obtenidos en el ensayo 4N se debieron a la influencia de las variables operacionales y composicionales elegidas y no al azar en la adquisicion de los datos. Lo anterior debido a que por motivos de disponibilidad de la cantidad de extracto no fue posible realizar réplicas en los diseños experimentales planteados. Estos resultados se resumen en la Tabla 4-7.

Tabla 4-7 Rendimiento y eficiencia de encapsulación de microparticulas elaboradas con Eudragit ® E PO cargadas con un extracto acuoso de hojas de *P. quadrangularis,* bajo las condiciones seleccionadas

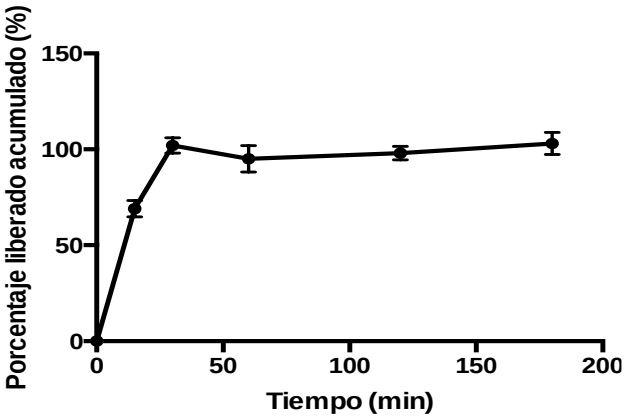
Réplica	Rendimiento (%)	Eficiencia de Encapsulación (%)
1	**78,52**	**81,43**
2	71,32	83,45
3	72,45	82,76
Promedio	73,43	81,55
DER	4,68	1,85

Condiciones:Temperatura de entrada: 100 ºC, velocidad de aspersión: 10%, caudal de aire: 100%, concentración de solidos: 5%, proporción de copolimero:extracto: 3:1.

Aunque la comparación directa con resultados de otras investigaciones no es posible debido a que la composición, metodología y equipos utilizados son diferentes, se pueden enumerar hallazgos comunes en los resultados de otros autores. Lorenzo- Lamosa et al. hallaron tamaños de partícula entre 18 y 2,9 µm para núcleos de Eudragit L-100, usados en la elaboracion de un sistema de liberación modificada, que usa adicionalmente Eudragit S-100 (Lorenzo - Lamosa et al., 1998). Estos tamaños son inferiores a los obtenidos para las microparticulas de Eudragit EPO cargadas con un extracto de *P. quadrangularis* elaboradas en este trabajo. Esta diferencia puede ser atrubuible a dos factores: el material de recubrimiento usado y los equipos diferentes en cuanto a sistema de aspersión se refiere. Garekani et al., elaboraron microparticulas de Eudragit RS mediante dos metodologías dispersión acuosa y orgánica, para la liberación sostenida de teofilina, los rendimientos variaron entre 33 y 74 %. Adicionalmente, hallaron que al aumentar la proporción polímero:extracto el tamaño de partíicula es mayor debido al aumento de la viscosidad de la suspensión a asperjar y la formación de goticulas más grandes (Garekani et al., 2013). Esos reportes concuerdan con los resultados obtenidos en este trabajo ya que el rendimiento varía ente 38,62 y 78,52%. Adicionalmente, en el primer diseño experimental los resultados de tamaño de partícula muestran diámetros medios inferiores cuando la proporción de copolimero es 2:1. En este mismo sentido, Kristmundsdottir et al. en la elaboración de micropartículas cargadas con diltiazem, encontraron tamaños medios de partícula alrededor de 4 µm, tamaños similares a los encontrados en la realización del presente trabajo (Kristmundsdottir et al., 1996).

Además, un ensayo de disolución fue llevado a cabo en medio ácido en pH 1,2; 5 mL de una suspensión de 50 mg de micropartículas fueron sometidos a agitación orbital a temperatura de 37ºC, muestreando en tiempos de 15, 30, 60, 120, y 180 minutos. Los resultados se presentan en la figura 4-5.En donde se observa que a los 30 minutos ya se ha liberado el 100% del extracto, lo que era de esperarse considerando la solubilidad pH dependiente del polímero empleado.

Figura 4-5 Perfil de liberación de microparticulas cargadas con un extracto acuoso de *P. quadrangularis* (pH 1,2)



Los resultados mostrados en este capítulo, nos permiten observar que es posible obtener un sitema microparticulado para el extracto acuoso de hojas de *P. quadrangularis* L., mediante la metodología de secado por aspersión. Adicionalmente, se realizó una contribución al evaluar algunas de las variables operacionales y composicionales y su influencia en las variables respuesta eficiencia de encapsulación y rendimiento.

5. Ensayos preliminares de estabilidad para el extracto acuoso de hojas de *P. quadrangularis* libre y microencapsulado

5.1 Introducción

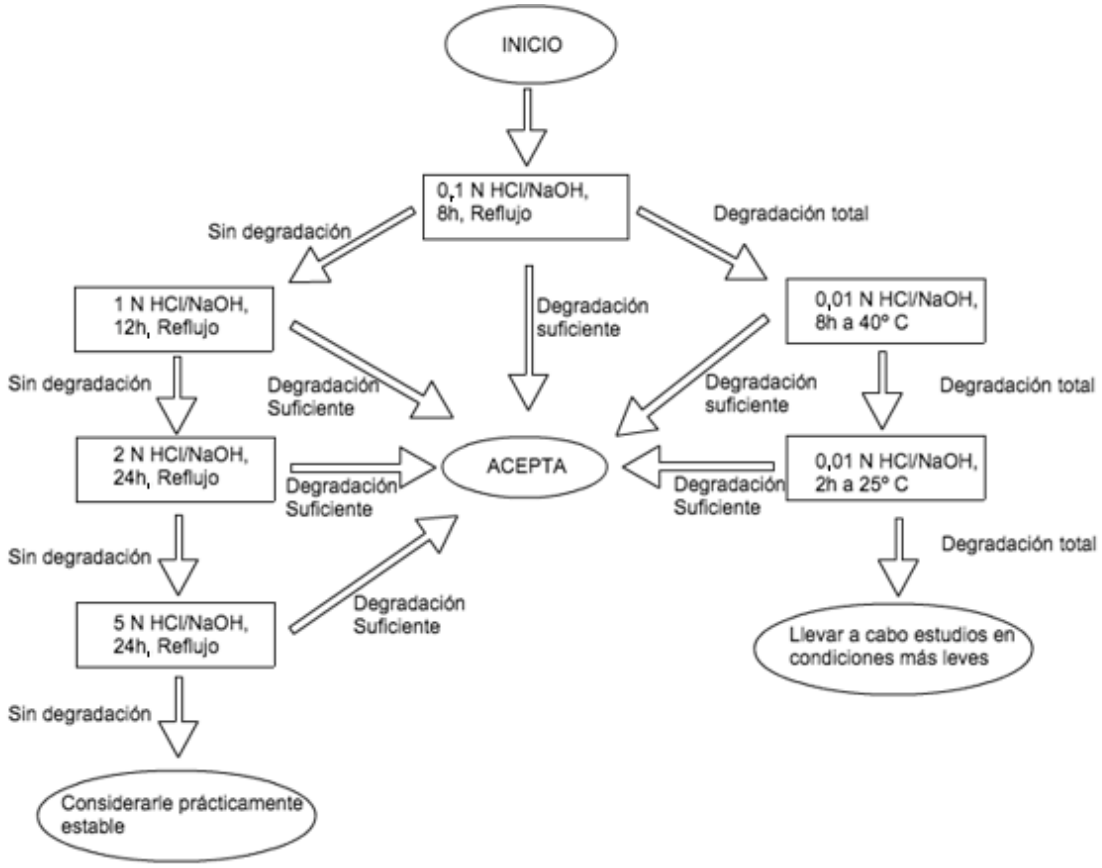
La estabilidad es un atributo de calidad y eficacia crítico para el desarrollo de productos farmacéuticos y debe ser controlado para lograr un apropiado desempeño del producto desarrollado (Guo et al., 2013). En este capítulo se describen los resultados de los ensayos preliminares de la evaluación de la estabilidad del extracto libre y microencapsulado como un aporte para el desarrollo de un sistema microparticulado para el extracto de hojas de *P. quadrangularis*. Estos ensayos se realizaron en dos etapas, en primer lugar se describen los resultados de la evaluación en condiciones de estrés y en segundo los resultados de la evaluación en condiciones de almacenamiento controladas.

5.1.1 Ensayos de estabilidad en condiciones de estrés

Singh y Bakshi realizaron una revisión muy amplia de los escenarios bajo los cuales se han realizado las investigaciones correspondientes a ensayos de estabilidad en condiciones de estrés en el campo del desarrollo de fármacos (Singh y Bakshi, 2000) . De acuerdo con estos autores la ausencia de procedimientos para este tipo de estudios es una de las dificultades a las cuales se enfrentan los investigadores en el momento de decidir las condiciones de estrés que serán utilizadas, adicionalmente afirman que es poca la información disponible en guías de armonización o guías ampliamente aceptadas para su utilización en torno a ensayos en extractos herbales. Estos autores han recopilado información de los ensayos de estabilidad de fármacos en condiciones de estrés

reportados en publicaciones científicas y han propuesto una evaluación sistemática para las ensayos de estabilidad en estas condiciones. En ella se propone que si el compuesto no se degrada significativamente se deben buscar condiciones de evaluación más drásticas, en cambio si la degradación es total se deben establecer condiciones menos drásticas, entendiendo degradación significativa como una degradación entre el 20 y 80% y una degradación total una degradación superior al 80%. Los autores proponen árboles de decisión para llevar a cabo la mencionada evaluación sistemática, en los cuales se parte de las condiciones más ampliamente utilizadas y se siguen caminos dependiendo de si hay o no degradación significativa o total. Así entonces, se siguieron los árboles de decisión propuestos por estos autores en los cuales se llevan a cabo 4 tipos de ensayos, hidrólisis ácida, hidrólisis básica, hidrólisis a pH neutro y oxidación. Los árboles de decisión respectivos se encuentran en las Figuras 5-1, 5-2 y 5-3. Cabe resaltar que adicionalmente estos autores proponen una clasificación cualitativa de la estabilidad de las sustancias evaluadas en condiciones de estrés dependiendo de la condición en la cual se encuentre una degradación significativa al seguir los árboles de decisión; las categorías son prácticamente estable, muy estable, estable, lábil, muy lábil, extremadamente lábil, la forma de clasificación se observa en las tablas 5-1, 5-2, y 5-3.

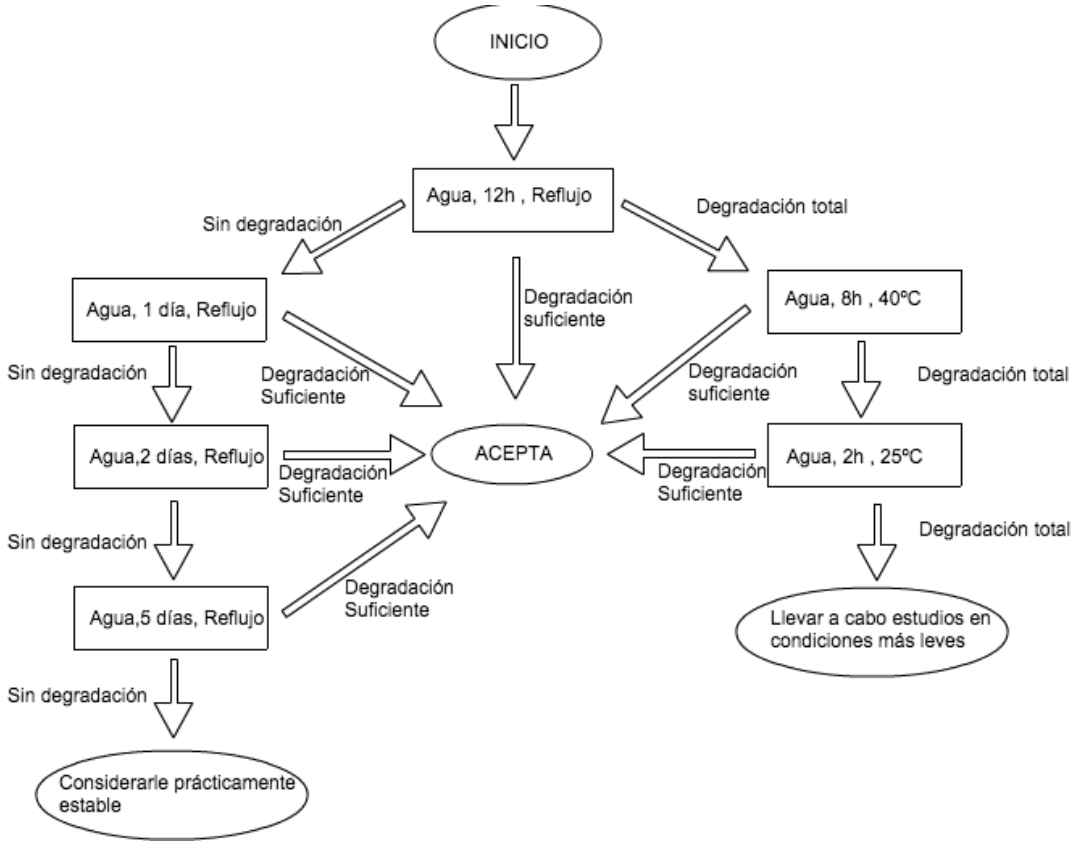
Figura 5-1 Árbol de decisión para ensayos de estabilidad en condiciones de estrés: hidrólisis ácida y básica



Adaptado de (Singh y Bakshi, 2000)

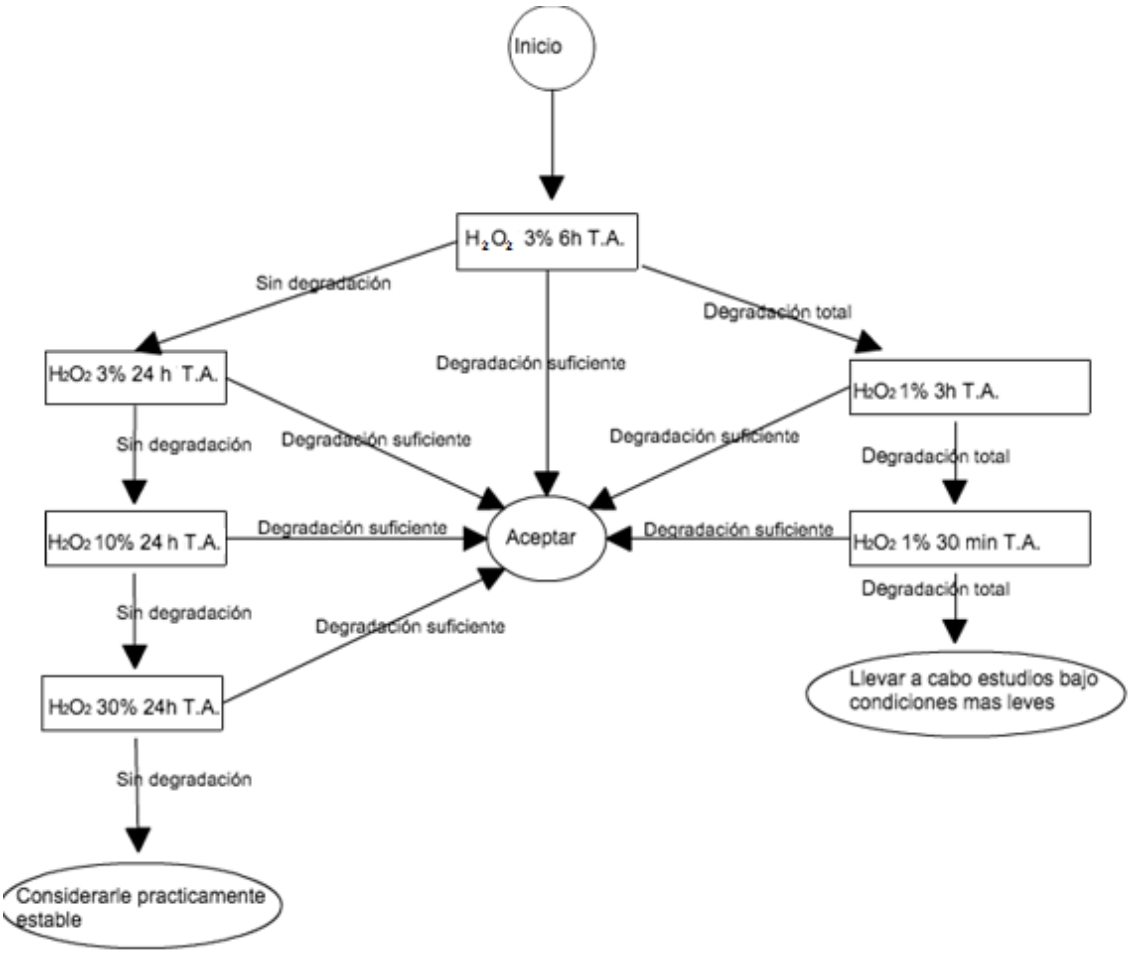
La hidrólisis es una de las degradaciones químicas más comunes, es un proceso que incluye la degradación de un compuesto al reaccionar con agua. Los tipos de enlaces susceptibles de sufrir hidrólisis son los éteres, ésteres, amidas, y anhidros (Morcillo, 1989).

Figura 5-2 Árbol de decisión para ensayos de estabilidad en condiciones de estrés: hidrólisis



Adaptado de (Singh y Bakshi, 2000)

Figura 5-3 Ensayos de estabilidad en condiciones de estrés: oxidación



(T.A.: Temperatura Ambiente)

Adaptado de (Singh y Bakshi, 2000)

Tabla 5-1 Clasificación cualitativa de estabilidad para hidrólisis ácida y básica

Categoría	Concentración de ácido ó base	Tiempo	Temperatura	Tipo de degradación
Prácticamente estable	5 N	2 días	Reflujo	Ninguna
Muy estable	2 N	1 día	Reflujo	Suficiente
Estable	1 N	12 horas	Reflujo	Suficiente
Lábil	0,1 N	8 horas	Reflujo	Suficiente
Muy lábil	0,01N	8 horas	40ºC	Suficiente
Extremedamente Lábil	0,001 N	2 horas	25ºC	Suficiente

Tabla 5-2 Clasificación cualitativa de estabilidad para hidrolisis (agua)

Categoría	Tiempo	Temperatura	Tipo de degradación
Prácticamente estable	5 días	Reflujo	Ninguna
Muy estable	2 días	Reflujo	Suficiente
Estable	1 día	Reflujo	Suficiente
Lábil	12 horas	Reflujo	Suficiente
Muy lábil	8 horas	40ºC	Suficiente
Extremedamente Lábil	2 horas	25ºC	Suficiente

Tabla 5-3 Clasificación cualitativa de estabilidad para degradación oxidativa

Categoría	Concentración de peróxido de hidrógeno	Tiempo	Temperatura	Tipo de degradación
Prácticamente estable	30%	2 días	Ambiente	Ninguna
Muy estable	10%	1 día	Ambiente	Suficiente
Estable	3%	1 día	Ambiente	Suficiente
Lábil	3%	6 horas	Ambiente	Suficiente
Muy lábil	1%	3 horas	Ambiente	Suficiente
Extremedamente Lábil	1%	0,5 horas	Ambiente	Suficiente

5.1.2 Ensayos de estabilidad en condiciones de almacenamiento controladas

Los estudios de estabilidad en condiciones de almacenamiento controladas fueron llevados a cabo en dos condiciones diferentes, la primera a una temperatura de 30º C ± 2°C y 70% HR ± 5 %y la segunda consistió en una temperatura de 40ºC ± 2°C y 75% HR ± 5%.

Las condiciones de almacenamiento fueron escogidas de acuerdo a los parámetros fijados en las guías ICH y las condiciones de almacenamiento definidas para Colombia, según lo cual se proponen que los estudios de estabilidad natural de medicamentos deben ser llevados a cabo en la zona climática calida conocida en las guias de estabilidad de ICH como la zona IV, y que por ende se debe aplicar un almacenamiento controlado de 30ºC y

70% HR. Así mismo, los estudios de estabilidad acelerados se deben llevar a cabo a 40ºC y 75% HR (ICH, 2003) .

5.2 Metodología

5.2.1 Ensayos de estabilidad en condiciones de estrés

5.2.1.1 Hidrólisis ácida

Una muestra de 100 mg de extracto se disolvió en 50 mL de HCl 0,1 N, posteriormente se transfirió a un balón de boca esmerilda que se acoplo a un montaje de reflujo. Una vez se alcanzó el reflujo se realizó un muestreo de 1 mL cada 2 horas hasta completar el tiempo requerido de acuerdo a los arboles de decisión, cada solución fue neutralizada con NaOH 0,1 N hasta pH 7 y diluida con un volumen de metanol igual al volumen final obtenido.

Por otro lado una muestra de 200 mg de micropartículas elaboradas con las mejores condiciones seleccionadas (lote 4N) fue disuelta en 50 mL de ácido clorhídrico 0,1 N, posteriormente se transfirió a un balón de boca esmerilda que se acoplo a un montaje de reflujo. Una vez se alcanzó el reflujo se realizo un muestreo de 1 mL cada 2 horas hasta ocho horas, cada muestra fue filtrada por una membrana de 0,22 µm y luego fue neutralizada con NaOH 0,1 N hasta pH 7.

Cada muestra fue filtrada por una membrana hidrofílica de 0,22 µm, previo a la inyección. Cada solución obtenida fue analizada por triplicado con la metodología previamente validada.

5.2.1.2 Hidrólisis básica

Una muestra de 100 mg de extracto se disolvió en 50 mL de NaOH 0,1 N, posteriormente se transfirió a un balón de boca esmerilda que se acopló a un montaje de reflujo. Una vez

se alcanzó el reflujo se realizó un muestreo de 1 mL cada 2 horas hasta completar el tiempo requerido de acuerdo a los arboles de decisión, cada solución fue neutralizada con HCl 0,1 N hasta pH 7 y diluida con un volumen de metanol igual al volumen final obtenido.

Por otro lado una muestra de 200 mg de micropartículas elaboradas con las mejores condiciones seleccionadas (lote 4N) fue disuelta en 50 mL de NaOH 0,1 N, posteriormente se transfirió a un balón de boca esmerilda que se acoplo a un montaje de reflujo. Una vez se alcanzó el reflujo se realizo un muestreo de 1 mL cada 2 horas hasta ocho horas, cada muestra fue filtrada por una membran de 0,22 µm y luego fue neutralizada con HCl 0,1 N hasta pH 7.

Cada muestra fue filtrada por una membrana hidrofílica de 0,22 µm, previo a la inyección. Cada solución obtenida fue analizada por triplicado con la metodología previamente validada.

5.2.1.3 Hidrólisis

Una muestra de 100 mg de extracto se disolvió en 50 mL de agua destilada, posteriormente se transfirió a un balón de boca esmerilda que se acopló a un montaje de reflujo. Una vez se alcanzó el reflujo se realizó un muestreo de 1 mL cada 2 horas hasta completar 24 horas, cada muestra se diluyó con 1 mL de metanol y fue filtrada con filtrada por una membrana hidrofílica de 0,22 µm previo al análisis con la metodología previamente validada.

Asi mismo 400 mg de micropartículas se disolvieron en 50 mL de agua destilada, posteriormente se transfirió a un balón de boca esmerilda que se acopló a un montaje de reflujo. Una vez se alcanzó el reflujo se realizó un muestreo de 1 mL cada 2 horas hasta completar 24 horas, cada muestra se diluyó con 1 mL de metanol y fue filtrada con filtrada con una membrana de 0,22 µm previo al análisis con la metodología CLAE.

5.2.1.4 Degradación Oxidativa

Una muestra de 200 mg de extracto se disolvió en 200 mL de H2O2 30%, se sometió a agitación magnética durante 24 horas tomando una muestra de 1 mL cada dos horas. cada

muestra se diluyó con 1 mL de metanol y fue filtrada por una membrana hidrofílica de 0,22 µm previo al análisis con la metodología previamente validada.

5.2.2 Ensayos de estabilidad en condiciones de almacenamiento controladas

Ocho muetras del extracto de *P. quadrangularis* liofilizado de 0,5 g fueron colocadas en tubos de eppendorf, cuatro de ellos fueron colocados en un cuarto de estabilidad de un laboratorio farmacéutico a 30º C ± 2°C 70% HR ± 5 % y los cuatro restantes en el cuarto a temperatura de 40ºC ± 2°C y 75% HR ± 5%.

Por otro lado, ocho muestras de micropartículas elaboradas con las mejores condiciones seleccionadas (lote 4N) de aproximadamente 0,5 g fueron colocadas en tubos de eppendorf, cuatro de ellos fueron colocados en un cuarto de estabilidad de un laboratorio farmacéutico a 30º C ± 2°C 70% HR ± 5 % y los restantes en el cuarto a temperatura de 40ºC ± 2°C y 75% HR ± 5%.

Un tubo de cada uno de los cuartos de estabilidad correspondientes a extracto y de microparticulas fue extraido a los 2, 30, 60, y 90 días y sometido a análisis cuantitativo de acuerdo a la metodología analítica validada,máximo 24 horas después de ser extraida.

Para las muestras de extracto se pesaron tres muestras de 100 mg, cada muestra pesada se diluyó en 100 mL de metanol:agua 1:1 y sonicada por 10 minutos, cada una de las soluciones obtenidas fue analizada por triplicado.

Para las muestras de micropartículas se pesaron tres muestras 100 mg, cada pesada se diluyó en 10 mL de metanol y sonicadas por 10 minutos, posteriormente se diluyeron con 10 mL de agua y se completo a volumen con agua:metanol 1:1 a un volumen de 25 mL. Cada uno de las tres soluciones de obtenidas fue analizada por triplicado.

Cada muestra fue filtrada por una membrana hidrofílica de 0,22 µm, previo a la inyección.

5.2.3 Expresión de resultados

El seguimiento de la estabilidad del extracto libre y microencapsulado se realizó mediante la cuantificación de flavonoides totales y vitexina. Sin embargo, considerando que el contenido de flavonoides totales puede permanecer constante (debido a lo encontrado en el primer capitulo del presente trabajo) pero pueden presentarse cambios en el contenido de cada uno de los flavonoides evaluados, se decidió evaluar la abundancia relativa de cada uno de los flavonoides con la siguiente ecuación (Ecuación 5-1).

Ecuación 5-1. Calculo de abundancia relativa

$$Abundancia\ Relativa\ (\%) = \frac{Area\ de\ pico\ de\ flavonoide}{Suma\ de\ area\ de\ todos\ los\ picos\ de\ flavonoides}\ x\ 100\%$$

5.2.4 Análisis estadístico

Las gráficas y pruebas estadísticas fueron relizadas en el Software GraphPad Prism ® 6.0

5.3 Resultados y discusión

5.3.1 Ensayos de estabilidad en condiciones de estrés

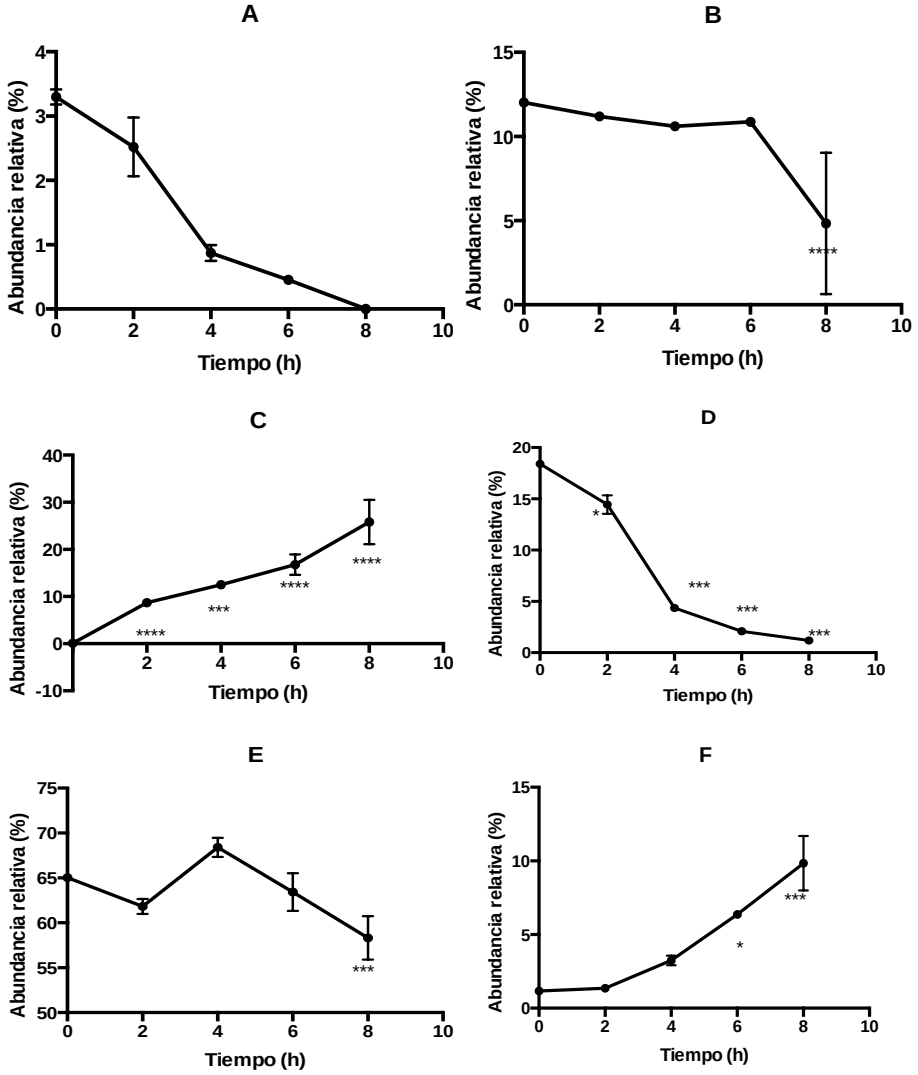
Los resultados de los ensayos preliminares de estabilidad en condiciones de estrés se presentan a continuación, en primer lugar los resultados de la degradación ácida, luego los resultados de la degradación básica, luego los resultados de la hidrólisis en pH neutro, y finalmente los resultados de degradación oxidativa.

5.3.1.1 Hidrólisis ácida

Al seguir los diagramas de flujo, se encontró que es posible obtener una degradación significativa para la hidrólisis ácida en la primera condición evaluada, de acuerdo con el árbol de decisión respectivo el extracto libre se puede clasificar en la categoria lábil a la hidrólisis ácida.

Para el caso de la hidrólisis ácida, los ensayos permiten realizar una monitorización de la abundancia relativa de cada flavonoide en el extracto de *P. quadrangularis* libre y microencapsulado, la abundancia relativa refiere a el cociente del área del pico correspondiente a cada flavonide y el área total de todos los picos de flavonoides encontrados en el cromatograma, los resultados de esta monitorización se observan en las Figuras 5-4 y 5-5, respectivamente.

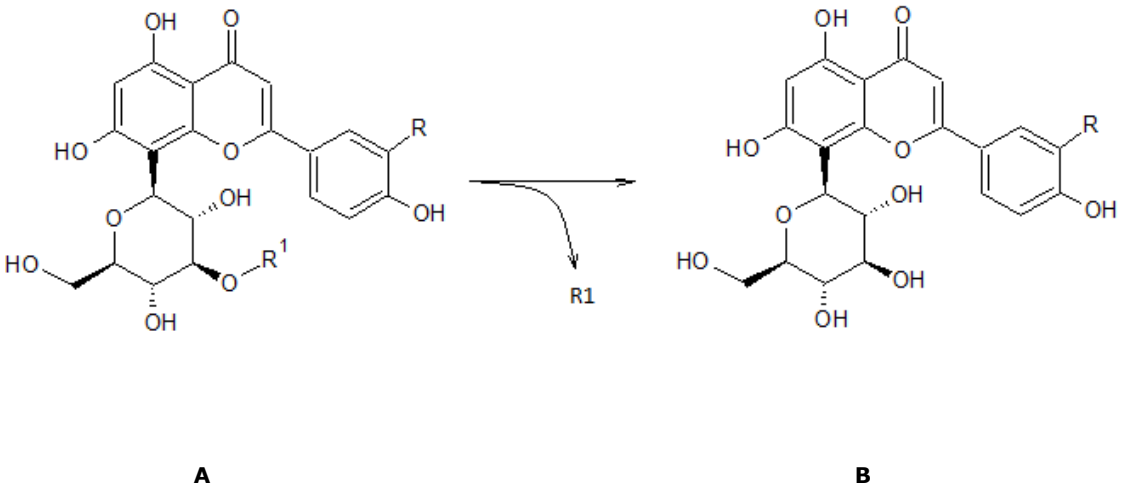
Figura 5-4 Abundancia relativa de flavonoides del extracto libre de *P. quadrangularis* durante la hidrólisis acida (HCl 0,1 N)



A) orientina 2”-*O*-glucósido. B) orientina 2”-*O*-xilósido. C) Orientina. D) vitexina 2”-*O*-glucósido. E) vitexina 2”-O-xilósido. F) vitexina

Los datos están expresados como la media ± D.E. (n=3) Test de Dunnet Respecto al t=0 (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001)

Figura 5-5. Eliminación de la segunda unidad de azúcar de los flavonoides C-O diglicosidados para convertirse en flavonoides C-glicosidados



A) Para vitexina 2”-*O*-glucósido R1= Glucosa R=H, para vitexina 2”-O-xilósido R1= Xilosa R=H, para orientina 2”-*O*-glucósido glucósido R1= Glucosa R=OH, para orientina 2”-*O*-xilósido glucósido R1= Xilosa R=OH

B) Para vitexina R=H, para orientina R=OH

Los resultados de la Figura 5-4 demuestran que las vías de degradación que se siguen corresponden a aquellas en las que los flavonoides de tipo *C-O* diglicosilados pierden la segunda unidad de azúcar y de esta manera se convierten en flavonoides C monoglicosilados. Lo anterior se evidencia ya que las áreas de los picos de los diglucósidos de orientina y vitexina (vitexina 2”-*O*-glucósido, vitexina 2”-O-xilósido, orientina 2”-*O*-glucósido, orientina 2”-*O*-xilósido) decrecen mientras se observa un aumento de la altura de orientina y vitexina. De acuerdo con reportes anteriores los flavonoides del tipo glicósidos son susceptibles de presentar hidrólisis, en especial los flavonoides del tipo *O*-glicósidos y *C-O*-diglicósidos por medio de la ruptura del enlace éster (Seikel et al., 1966; Rommel y Wrolstad, 1993) . La reacción puede ser observada en la Figura 5-5.

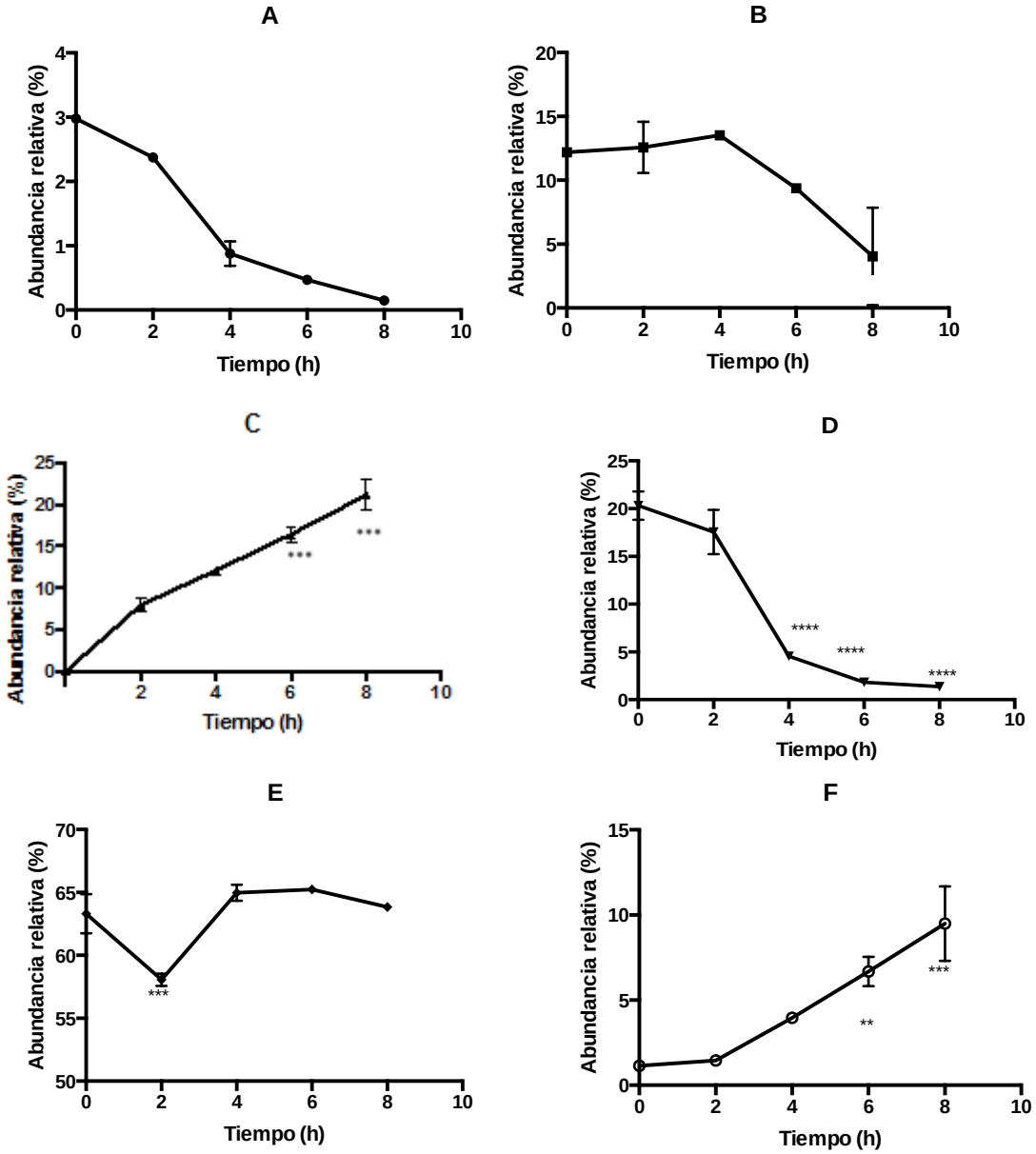
Adicionalmente se realizó un ANOVA de dos vías, seguidamente una prueba estadística de comparaciones múltiples conocida como el test de Dunnett, este test busca evaluar si

hay diferencias significativas entre la abundancia relativa de cada flavonoide al compararse en cada tiempo de muestreo con el tiempo cero. Los resultados permiten deducir que si hubo cambios en la abundancia relativa de todos los flavonoides evaluados al comparar el tiempo cero y el tiempo final, como se puede observar en la Figura 5-4.

Al observar los resultados de la Figura 5-6 que corresponden a la monitorización de la abundancia relativa de los flavonoides en el extracto microencapsulado, no difiere en los resultados de la degradación del extracto libre, lo anterior se puede explicar debido a que el polímero usado para la elaboración del sistema microparticulado es soluble en pH ácido, y por ende existe una liberación rápida del extracto desde las micropartículas al seno de la solución, sin afectar la forma en la que se degrada el extracto. La prueba de Dunnet, muestra que sí hay cambios significativos entre el tiempo cero y el tiempo final para los flavonoides evaluados exceptuando los flavonoides diglicosidados cuya segunda unidad de azúcar es glucosa (orientina 2”-O-glucósido y vitexina 2”-O-glucósido), lo que sugiere que estos dos compuestos son más estables en comparación a aquellos que contienen xilosa.

Con el objetivo de observar si el sistema microparticulado permite mejorar la estabilidad del extracto cuando este se sometió a hidrólisis ácida se realizaron gráficas comparativas para cada uno de los flavonoides (Figura 5-7).

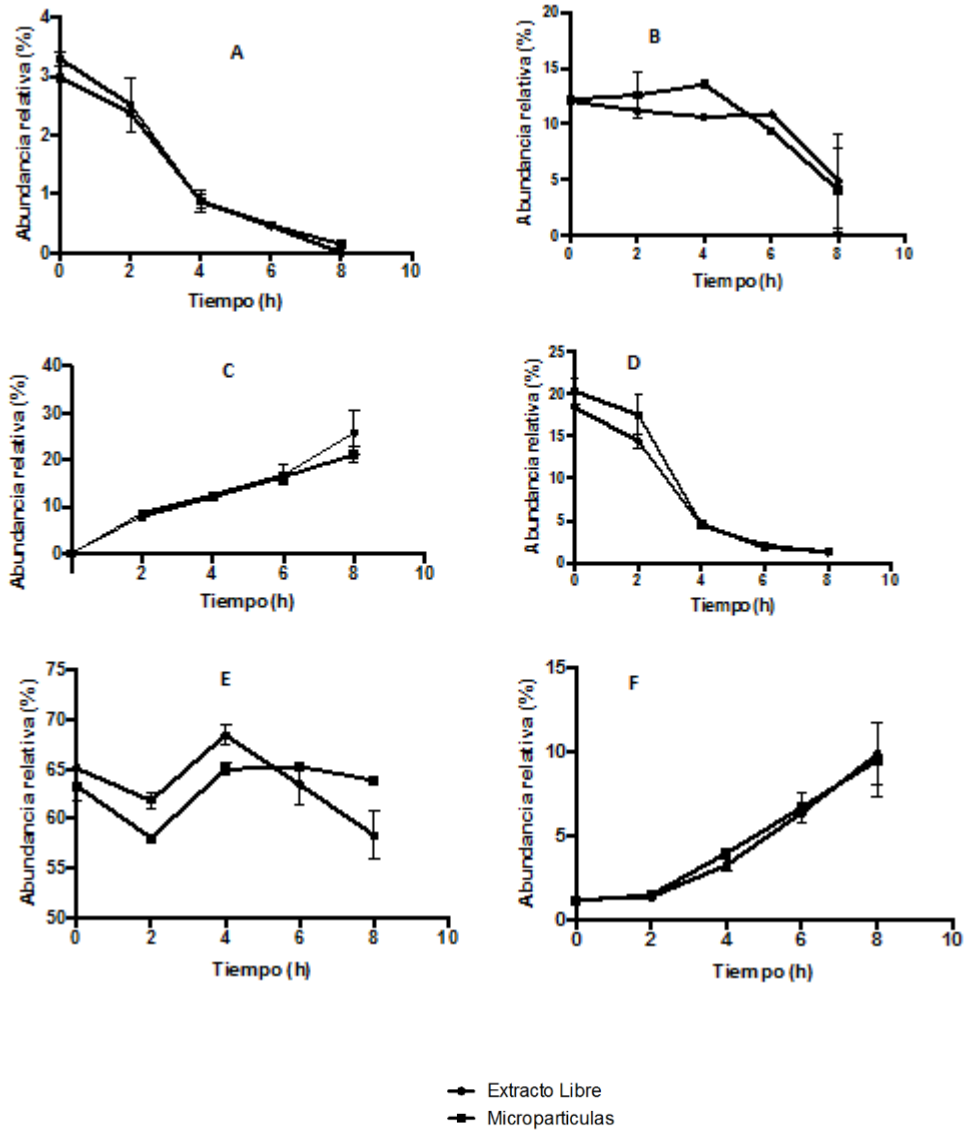
Figura 5-6. Abundancia relativa de flavonoides del extracto microencapsulado de *P. quadrangularis* durante la hidrólisis ácida (HCl 0,1 N)



A) orientina 2”-*O*-glucósido. B) orientina 2”-*O*-xilósido. C) Orientina. D) vitexina 2”-*O*-glucósido. E) vitexina 2”-O-xilósido. F) vitexina.

Los datos están expresados como la media ± D.E. (n=3) Test de Dunnet Respecto al t=0 (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001)

Figura 5-7 Comparación entre el extracto libre y microencapsulado de *P. quadrangularis* en hidrólisis ácida HCl 0,1 N (abundancia relativa de cada flavonoide)



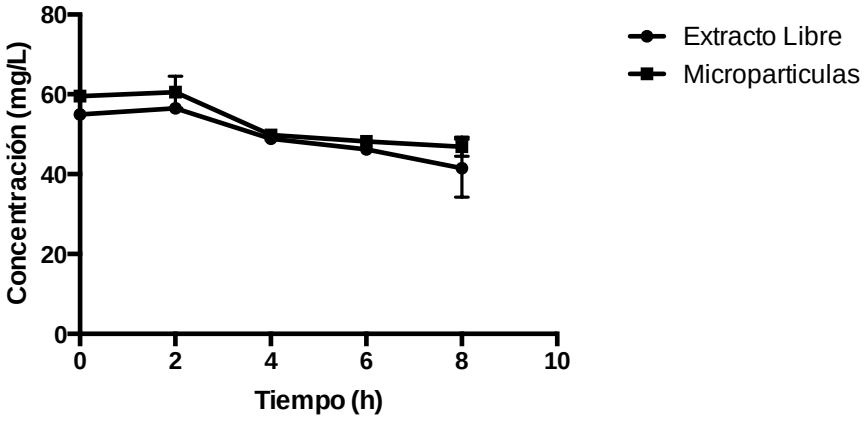
A) orientina 2”-*O*-glucósido. B) orientina 2”-*O*-xilósido. C) Orientina D) vitexina 2”-*O*-glucósido. E) vitexina 2”-O-xilósido. F) vitexina

Los datos están expresados como la media ± D.E. (n=3) Test de Sidak comparando los grupos Extracto libre y Extracto microencapsulado en todos los tiempos de muestreo (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001)

La única gráfica de la Figura 5-7 en la que se observan diferencias entre el sistema microparticulado y el extracto libre es aquella que corresponde a vitexina 2”-*O*-xilósido, en donde el extracto libre sufrió una degradación mayor a las 8 horas. Con el fin de verificar esta información se realizó una prueba de Sidak de comparaciónes múltiples, los resultados muestran que entre los dos sistemas a la hora 8, no existen diferencias significativas, excepto por el compuesto vitexina 2”-*O*-xilósido, confirmando la evaluación visual de las gráficas.

Finalmente, además de los cambios en las abundancias relativas de los flavonoides, es posible conocer la concentración en la solución sometida a reflujo de flavonoides totales y vitexina, utilizando el método analítico previamente validado. A continuación, se reporta el cambio de la concentración de flavonoides totales y vitexina contenido en el extracto libre y extracto microencapsulado. (Figura 5-8 y 5-9)

Figura 5-8 Concentración de flavonoides totales (equivalentes a Vitexina) en hidrólisis ácida (HCl 0,1 N)

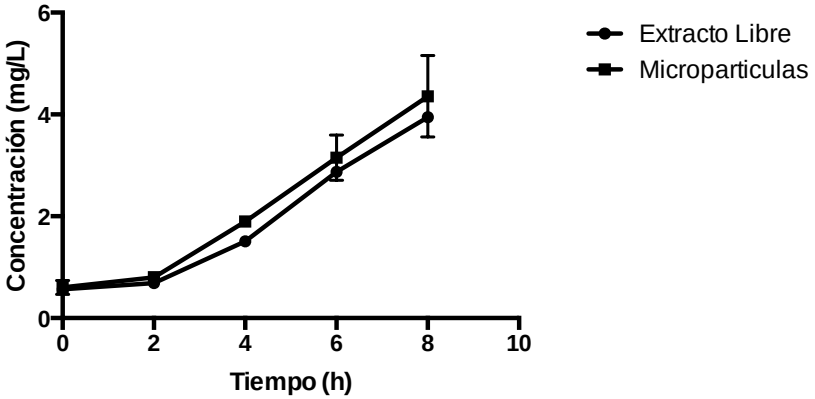


Los datos están expresados como la media ± D.E. (n=3) Test de Sidak comparando los grupos Extracto libre y Extracto microencapsulado en todos los tiempos de muestreo

Como se observa en la Figura 5-8, la concentración de flavonoides totales decae ligeramente en el tiempo pero no hay diferencia entre los dos grupos evaluados. Un test de Sidak fue aplicado encontrandose que no hay diferencia significativa entre los dos grupos en ninguno de los tiempos donde se realizó la cuantificación. El ligero descenso se

debe en principio a la degradación de los flavonoides en otros compuestos, de acuerdo a la comparación y la diferencia entre el tiempo inicial y las 8 horas de evaluación.

Figura 5-9. Concentración de Vitexina en hidrólisis ácida (HCl 0,1 N)



Los datos están expresados como la media ± D.E. (n=3) Test de Sidak comparando los grupos Extracto libre y Extracto microencapsulado en todos los tiempos de muestreo

En la Figura 5-9, se observa que la concentración de vitexina aumenta como se observa en las diferencias de concentración entre el tiempo inicial y la octava hora de evaluación, como se mencionó previamente debido a la degradación de los glicosidos de vitexina a vitexina. Este compuesto puede ser usado en el control de calidad rutinario de la planta y el sistema microparticulado, ya que su aumento puede ser entendido como una degradación del extracto original. No existe diferencia significativa en los cambios en el extracto libre y microencapsulado, de acuerdo a los resultados del test de Sidak.

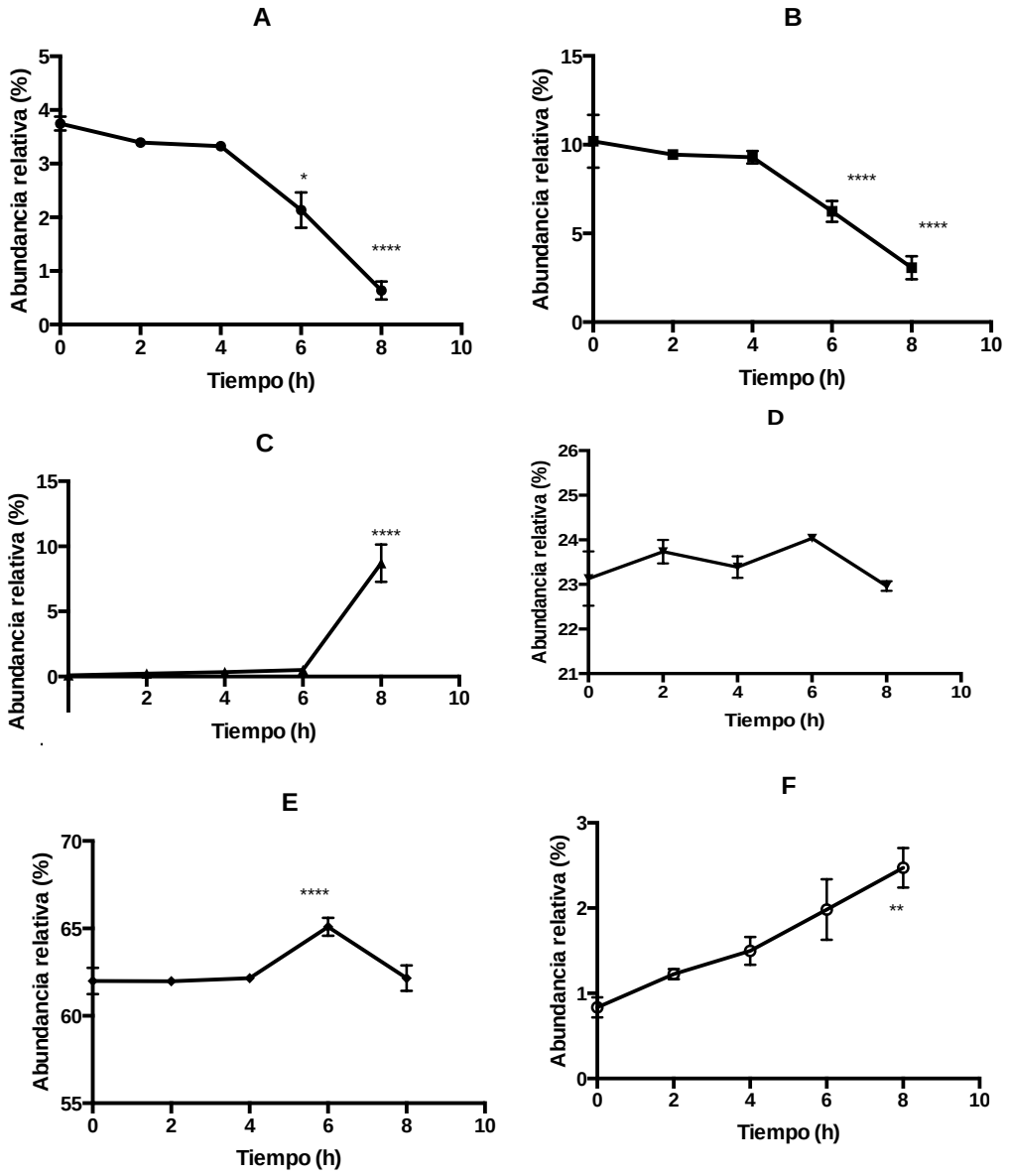
Que no existan diferencias entre los dos grupos evaluados, indica que el sistema microparticulado no aporta a mejorar la estabilidad del extracto frente a la hidrólisis catalizada por ácido, debido a que el material de recubrimiento usado (Eudragit ® E PO) es soluble a pH ácidos.

5.3.1.2 Hidrólisis básica

Para el caso hidrólisis básica y siguiendo los diagramas anteriormente citados (Figura 5-1), los resultados demuestran que las condiciones NaOH 0,1 N en reflujo durante 8 horas,

son adecuadas para degradar más del 20% de la muestra. Lo anterior clasifica el extracto como lábil a la hidrólisis básica.

Figura 5-10 Abundancia relativa de flavonoides del extracto libre de *P. quadrangularis* durante la hidrólisis básica (NaOH 0,1 N)



A) orientina 2”-*O*-glucósido. B) orientina 2”-*O*-xilósido. C) Orientina. D) vitexina 2”-*O*-glucósido. E) vitexina 2”-O-xilósido. F) vitexina

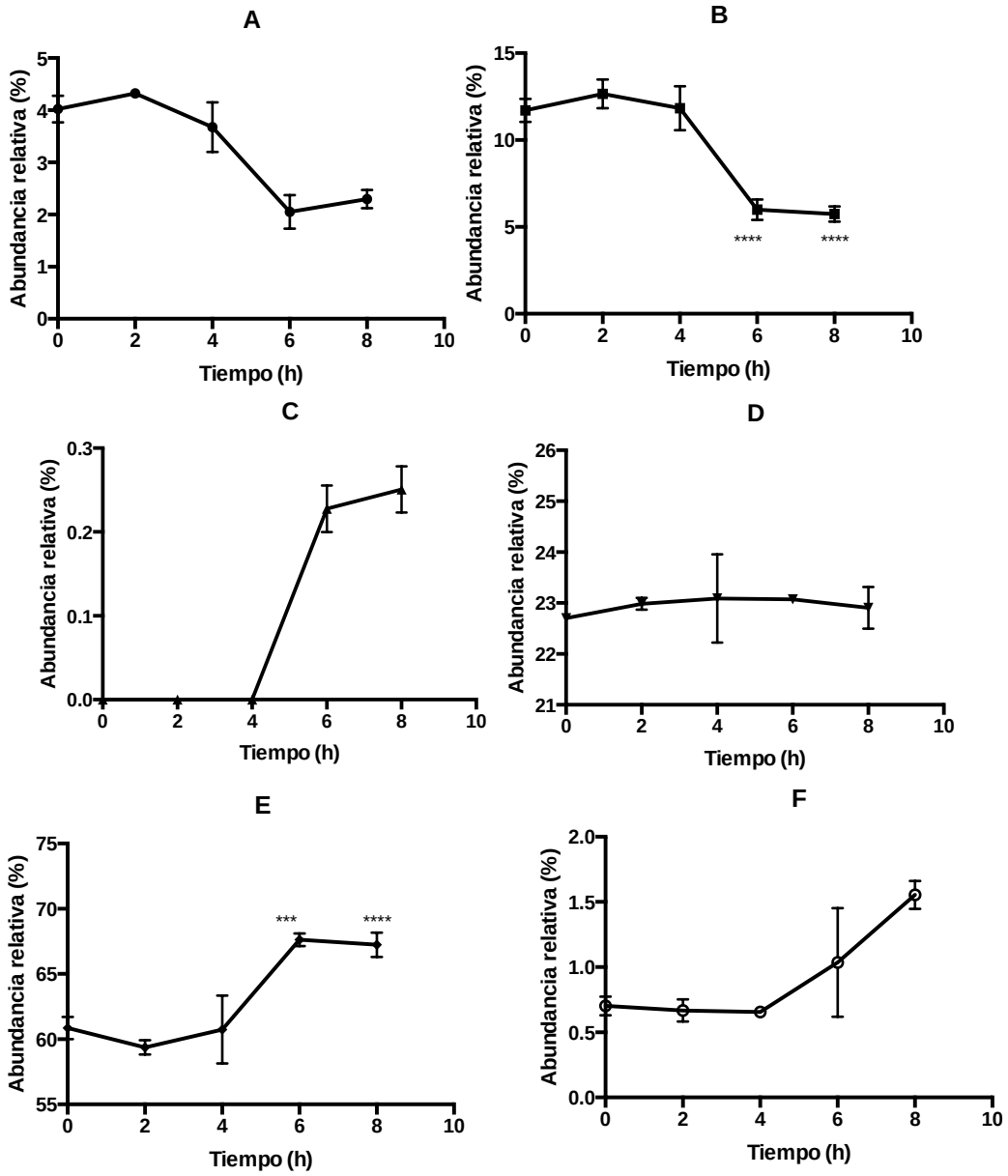
Los datos están expresados como la media ± D.E. (n=3) Test de Dunnet Respecto al t=0 (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001)

Como se puede observar en la Figura 5-10, y de manera similar a lo ya discutido en la sección de la hidrólisis ácida, los flavonoides C-glicosidados aumentan ligeramente su abundancia relativa debido a la degradación de los flavonoides C-O diglicosidados durante la hidrólisis alcalina. Este comportamiento es visible en las gráficas, y confirmado mediante el test de Dunnet que nos muestra diferencias significativas entre la abundancia relativa de cada flavonoide en la hora 8 respecto a la hora 0.

La Figura 5-11, muestra la monitorización de la abundancia relativa de los flavonoides en la muestra de micropartículas sometida a hidróxido de sodio 0,1 N en reflujo, como condición de stress. En términos generales, una evaluación visual permite inferir dos comportamientos, en primer lugar que hay un ligero descenso en la abundancia relativa de los flavonoides diglicosidados siguiendo el comportamiento hallado para el extracto libre. Sin embargo el descenso es menos drástico que para el extracto libre, esto debido a que el sistema microparticulado protege al extracto del medio de degradación. Un segundo aspecto a resaltar es que existen cambios en las abundancias relativas de los compuestos diglicosidados que contienen xilosa pero no en los compuestos de glucosa.

A pesar de los cambios que se observan visualmente debido a la escala de las gráficas, el test de Dunnet demuestra que no hay cambios significativos en las abundancias relativas en la hora 8 (respecto al tiempo 0) de los compuestos orientina, orientina 2”- O- glucósido, vitexina y vitexina 2”-O-glucósido, confirmando la evaluación previamente discutida sobre la figura 5-10, confirmando que el sistema microparticulado puede contribuir a mejorar la estabilidad del extracto frente a condiciones hidrolíticas catalizadas por álcalis.

Figura 5-11 Abundancia relativa de flavonoides del extracto microencapsulado de *P. quadrangularis* durante la hidrólisis básica (NaOH 0,1 N)

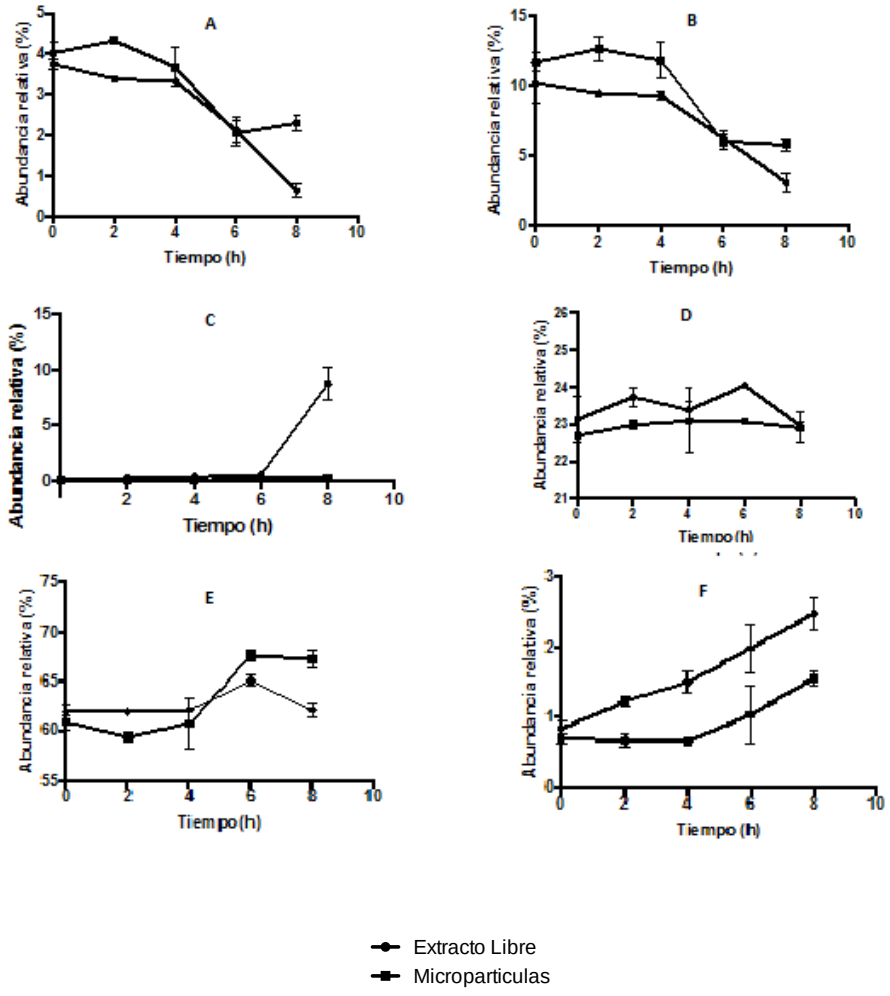


A) orientina 2”-*O*-glucósido. B) orientina 2”-*O*-xilósido. C) Orientina. D) vitexina 2”-*O*-glucósido. E) vitexina 2”-O-xilósido. F) vitexina.

Los datos están expresados como la media ± D.E. (n=3) Test de Dunnet Respecto al t=0 (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001)

Con el objetivo de verificar que el sistema microparticulado, es útil para la protección del extracto en las condiciones referidas en esta sección del documento, a continuación se reportan los comparativos de las abundancias relativas de cada flavonoide y además se muestra el monitoreo de la concentración de flavonoides totales y vitexina de forma comparativa (Figura 5-12 y 5-13)

Figura 5-12 Comparación entre el extracto libre y microencapsulado de *P. quadrangularis* en hidrólisis básica NaOH 0,1 N (abundacia relativa de cada flavonoide)



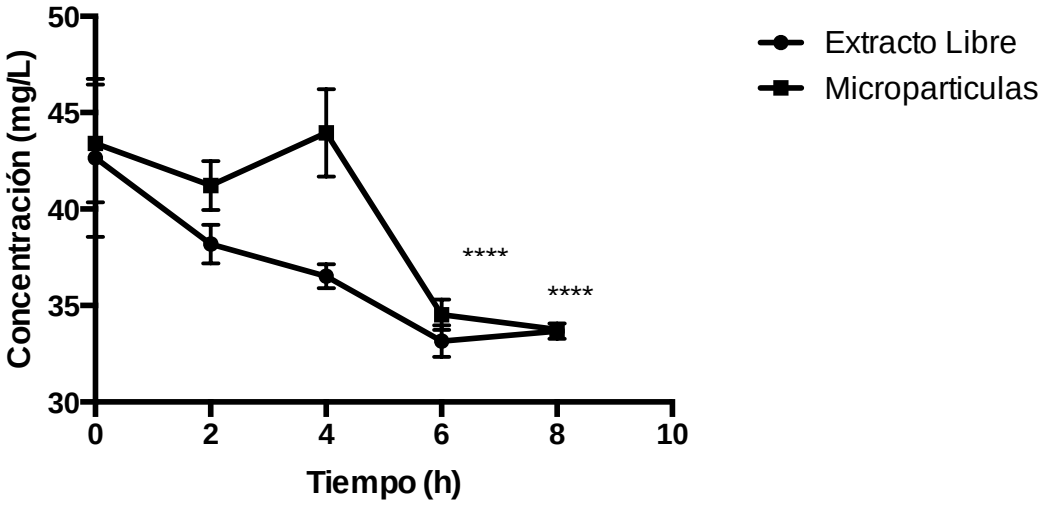
A) orientina 2”-*O*-glucósido. B) orientina 2”-*O*-xilósido. C) Orientina. D) vitexina 2”-*O*-glucósido. E) vitexina 2”-O-xilósido. F) vitexina.

Los datos están expresados como la media ± D.E. (n=3) Test de Sidak comparando los grupos Extracto libre y Extracto microencapsulado en todos los tiempos de muestreo (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001)

Como se observa y se ha confirmado mediante los test de Sidak respectivos, existen diferencias significativas entre los perfiles presentados en la Figura 5-12 que demuestran que el sistema microparticulado contribuye a proteger el extracto de la degradación hidrolítica catalizada por bases, ya que la abundancia relativa de los flavonoides totales vitexina y orientina que cuales aumentan cuando el extracto ha sufrido algún tipo de degradación, es menor cuando el extracto es microencapsulado. Además se presenta una degradación menor en todos los flavonoides diglicosidados presentes en el extracto contenido el sistema microparticulado.

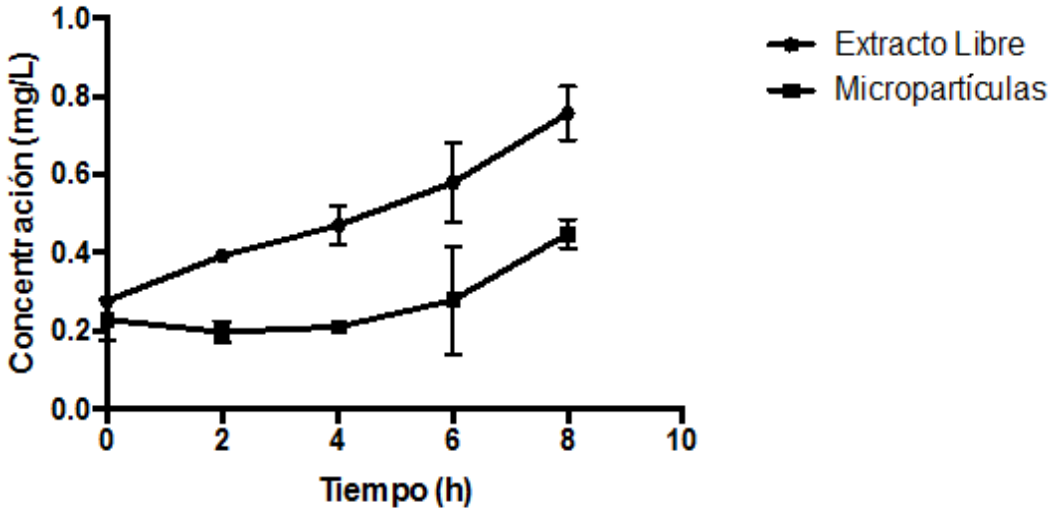
A continuación dos gráficas comparativas de la cuantificación de flavonoides totales y vitexina, se reportan en términos de concentración de la solución evaluada.

Figura 5-13 Concentración de flavonoides totales (equivalentes a vitexina) en hidrólisis basica (NaOH 0,1 N)



Los datos están expresados como la media ± D.E. (n=3) Test de Sidak comparando los grupos Extracto libre y Extracto microencapsulado en todos los tiempos de muestreo (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001)

Figura 5-14 Concentración de vitexina en hidrólisis básica (NaOH 0,1 N)



Los datos están expresados como la media ± D.E. (n=3) Test de Sidak comparando los grupos Extracto libre y Extracto microencapsulado en todos los tiempos de muestreo (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001)

Como se observa existe una disminución de los flavonoides totales (Figura 5-13) que parece ser más drástica en el extracto libre que en las micropartículas. Sin embargo la prueba de Sidak solo muestra diferencias significativas de la concentración de flavonoides en el tiempo de cuatro horas, cuando es marcada la disminución del contenido de flavonoides totales en el extracto libre mientras que en el extracto microencapsulado se mantiene cercano al inicial. Una vez pasadas las cuatro horas el sistema microparticulado no es capaz de proteger el extracto. Por otro lado la concentración de vitexina (Figura 5-14) aumenta en el tiempo, y de acuerdo a la prueba estadística existe diferencias a partir de la cuarta hora de evaluación, siendo mayor la concentración en el extracto libre que en el microencapsulado.

Si comparamos los resultados de la hidrólisis básica con la hidrólisis ácida se puede deducir que los cambios en el extracto libre y microencapsulado son más drásticos durante la hidrólisis ácida, tanto para las evaluaciones de abundancias relativas como en términos de concentración.

5.3.1.3 Hidrólisis a pH neutro

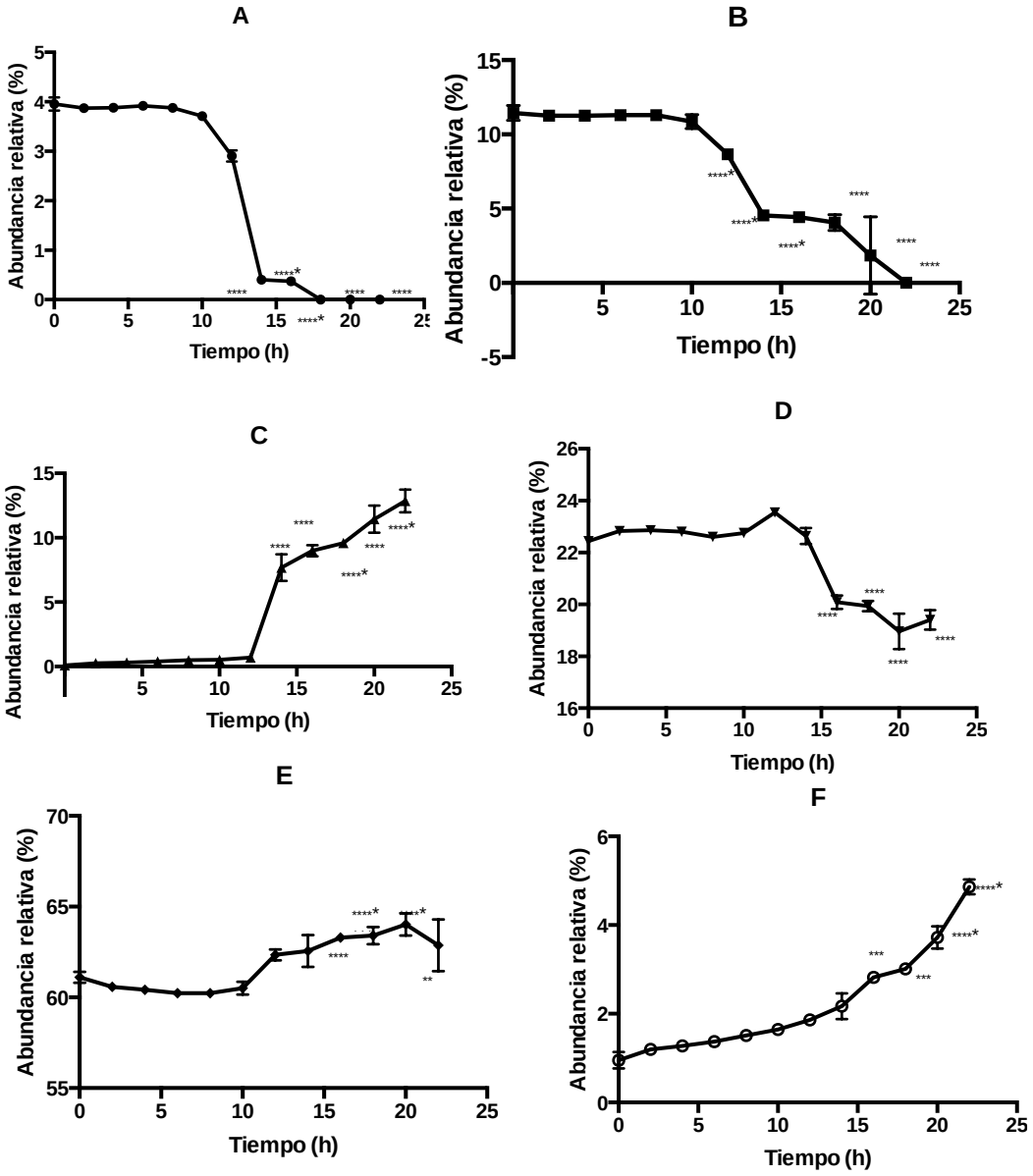
Como se ha venido reportando, los árboles de decisión seguidos han permitido dar una clasificación cualitativa de la estabilidad del extracto, en el caso de la hidrólisis a pH neutro se halló que una degradación suficiente se logró con una exposición a reflujo durante 24 horas y por tanto es estable a condiciones hidrolíticas.

A continuación se observan los cambios en las abundancias relativas de los flavonoides contenidos en el extracto tanto libre como para las microparticulas. (Figura 5-15 y Figura 5-16).

De manera similar a las degradaciones llevadas en medio acuoso y catalizadas por hidróxido de sodio y ácido clorhídrico, en el caso de la figura 5.15 se observan cambios en las abundancias relativas, en primer lugar una disminución de orientina2”-O-glucósido, orientina 2”-O-xilósido, vitexina 2”-O-glucósido, vitexina 2”-O-xilósido y en segundo lugar un aumento de las concentraciones de vitexina y orientina.

La prueba de Dunett permite observar que en todos los compuestos existen diferencias significativas entre el tiempo cero y las 24 horas de evaluación

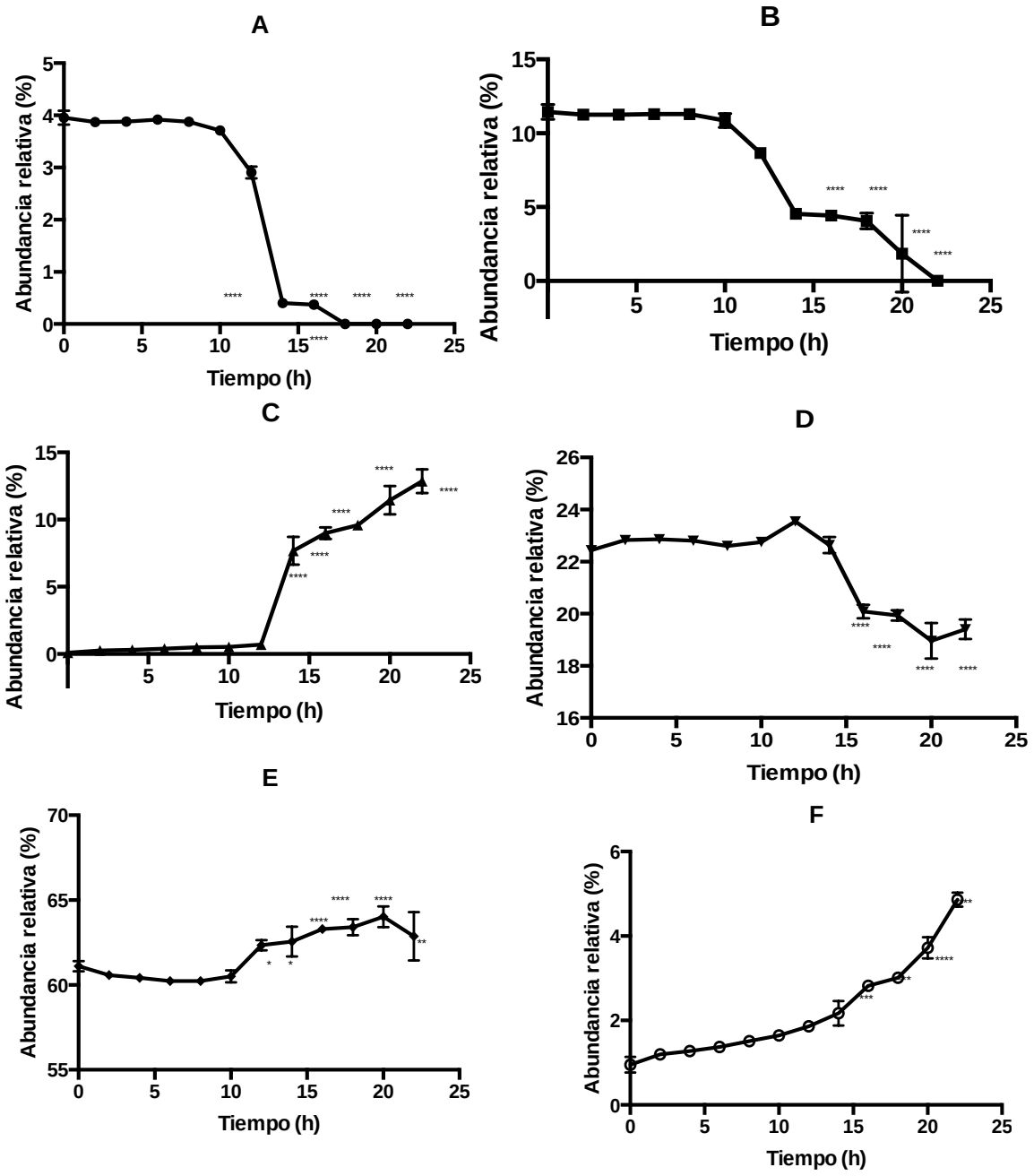
Figura 5-15 Abundancia relativa de flavonoides del extracto libre de *P. quadrangularis* durante la hidrólisis



A) orientina 2”-*O*-glucósido. B) orientina 2”-*O*-xilósido. C) Orientina. D) vitexina 2”-*O*-glucósido. E) vitexina 2”-O-xilósido. F) vitexina.

Los datos están expresados como la media ± D.E. (n=3) Test de Sidak comparando los grupos Extracto libre y Extracto microencapsulado en todos los tiempos de muestreo (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001)

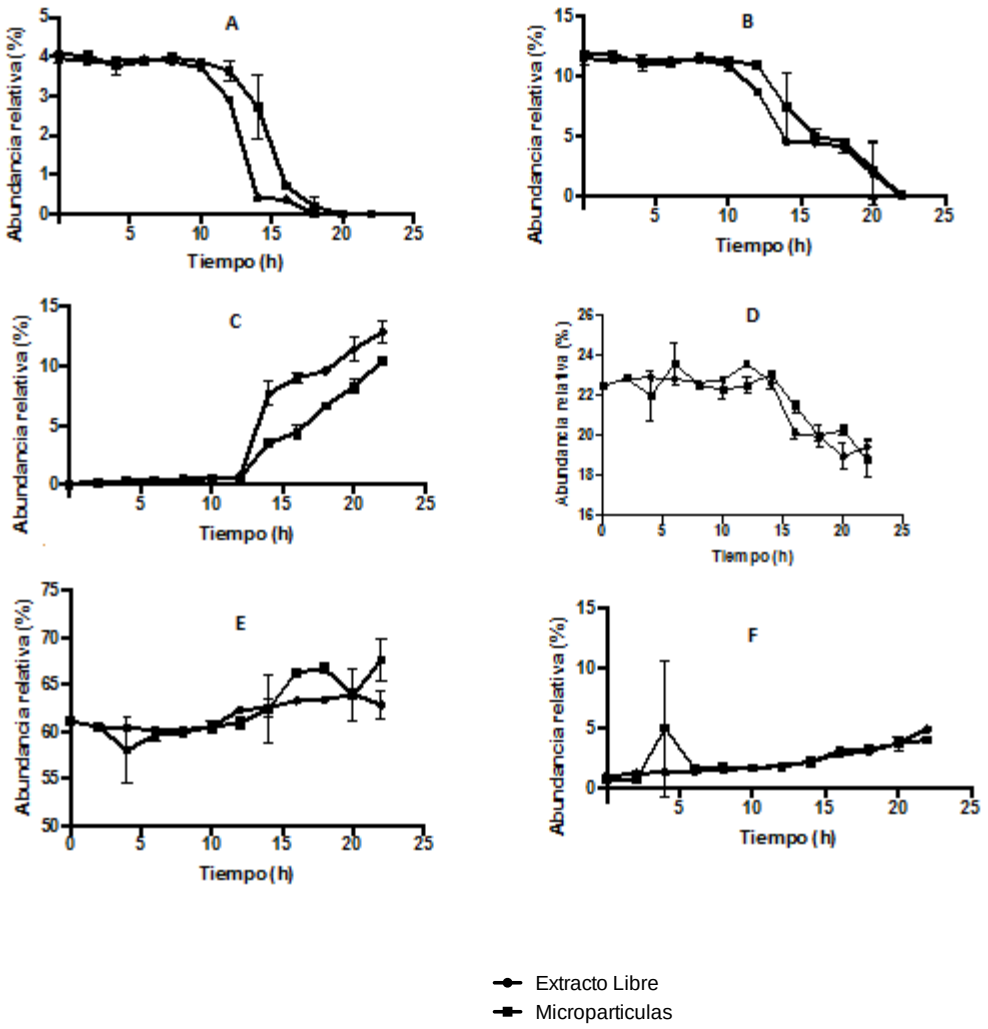
Figura 5-16 Abundancia relativa de flavonoides del extracto microencapsulado de *P. quadrangularis* durante la hidrólisis a pH neutro



A) orientina 2”-*O*-glucósido. B) orientina 2”-*O*-xilósido. C) Orientina. D) vitexina 2”-*O*-glucósido. E) vitexina 2”-O-xilósido. F) vitexina. Los datos están expresados como la media ± D.E. (n=3) Test de Dunnet comparando todos los puntos de muestreo contra el t=0 (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001)

En la figura 5-16 se observan los mismos cambios que en la figura 5-15, lo anterior fue confirmado mediante la prueba de comparaciones multiples de Dunett donde se demuestra que hay diferencias entre el tiempo final y el tiempo inicial en todos los flavonoides presentes, sin embargo visualmente es difícil realizar comparaciones entre los dos sistemas, por lo que a continuación se observan las gráficas comparativas, de la misma forma que en las dos secciones anteriores primero se observan los cambios de abundancias relativas de cada uno de los de los flavonoides y luego los cambios en las concentraciones de vitexina y flavonoides totales para la hidrólisis pH neutro de 0 a 24 horas, comparando el extracto libre y el sistema microparticulado.

Figura 5-17 Comparación entre el extracto libre y microencapsulado de P. quadrangularis en hidrólisis a pH neutro (abundacia relativa de cada flavonoide)



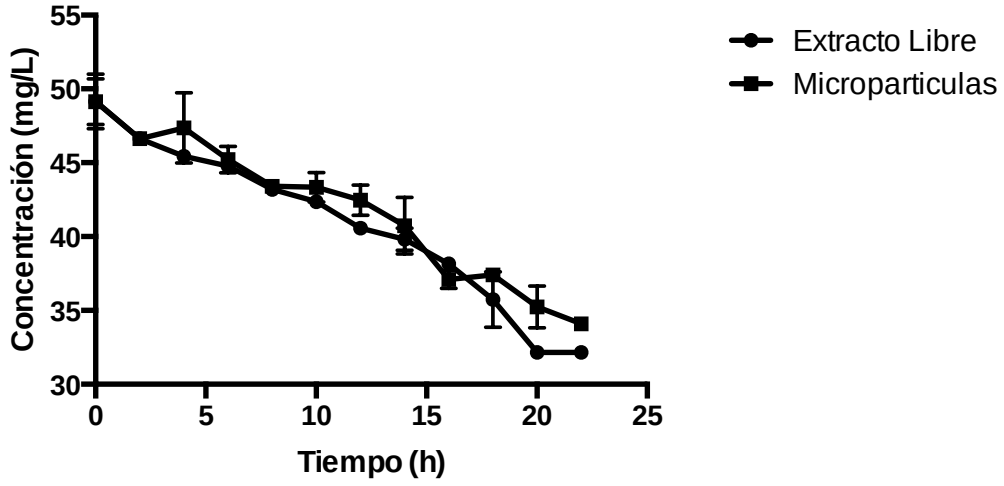
A) orientina 2”-*O*-glucósido. B) orientina 2”-*O*-xilósido. C) Orientina. D) vitexina 2”-*O*-glucósido. E) vitexina 2”-O-xilósido. F) vitexina.

Los datos están expresados como la media ± D.E. (n=3) Test de Sidak comparando los grupos Extracto libre y Extracto microencapsulado en todos los tiempos de muestreo (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001)

Para la orientina 2” -O- glucósido se observa una diferencia siendo mayor el descenso en abundancia relativa para el extracto libre que para el microencapsulado. Sin embargo la prueba de Sidak muestra que la diferencia solo es significativa en los puntos correspondientes a las 12 y 14 horas. Orientina 2”-O-xilósido presenta un comportamiento similar al observado anteriormente y la prueba estadística no muestra diferencias estadísticas en ningún tiempo evaluado. En su lugar observamos que orientina si tiene una diferencia grande en especial a partir de la 14 horas, este comportamiento es evidenciado a través de la prueba estadística. En el caso de vitexina 2”-O-glucósido no parecen existir diferencias marcadas en los dos sistemas, afirmación confirmada por el test de Sidak. De la misma forma los resultados de vitexina 2” O xilósido en donde no parecen ser significativos los cambios, se observa que sí hay diferencia en el último tiempo evaluado, donde es mayor la degradación para el extracto libre que para el microencapsulado. Finalmente la gráfica de vitexina demuestra que no hay diferencias significativas entre los dos sistemas, confirmado mediante la prueba estadística.

De manera general se puede observar que no hay una diferencia significativa respecto al cambio en la abundancias relativas de los flavonoides en el sistema microparticulado y el extracto libre, indicando que la microencapsulación con Eudragit ® E PO no protege el extracto contra este tipo de hidrólisis.

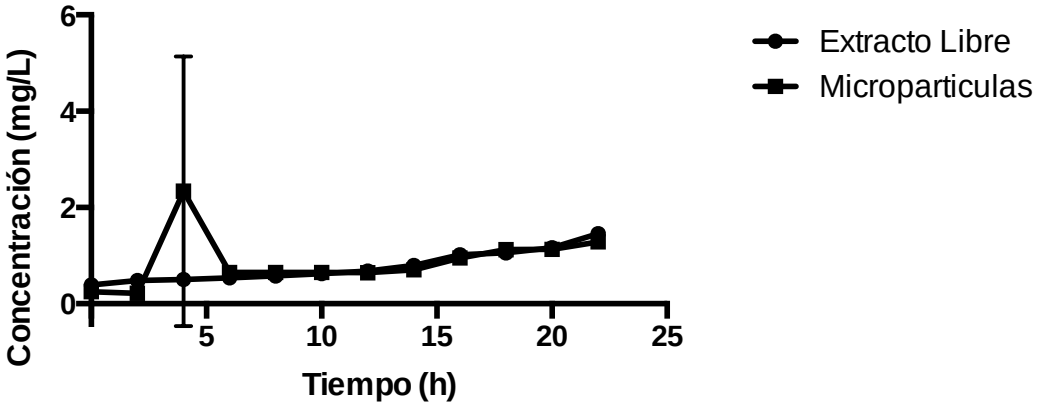
Figura 5-18 Concentración de flavonoides totales (equivalentes a vitexina) en hidrólisis a pH neutro



Los datos están expresados como la media ± D.E. (n=3) Test de Sidak comparando los grupos Extracto libre y Extracto microencapsulado en todos los tiempos de muestreo (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001)

En este mismo sentido al realizar la comparación en la concentración de vitexina, no se observan diferencias significativas (confirmado por el test de Sidak) entre los dos grupos.

Figura 5-19 Concentración de vitexina en hidrólisis a pH neutro



Los datos están expresados como la media ± D.E. (n=3) Test de Sidak comparando los grupos Extracto libre y Extracto microencapsulado en todos los tiempos de muestreo (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001)

5.3.1.4 Degradación oxidativa

Para el caso de la oxidación,siguiendo los arboles de decisión, se determinó que a pesar de someter el extracto a peróxido de hidrogeno 30% w/w no se logró una degradación suficiente al observar cambios en las abundancias relativas, por lo anterior el extracto se declara prácticamente estable a condiciones degradativas de oxidación. El comportamiento anterior se puede explicar mediante la actividad antioxidante reportada para los flavonoides, por ejemplo Praveena et al. reportaron actividad antioxidante de la vitexina contenida en R*ynchosia capitata* (Praveena et al., 2013). En otro reporte de

Zielinska-Pisklak y co-autores (Article in press) quienes realizaron un estudio bioguiado para activividad antioxidante de *Desmodium adscendens* se encontró que 4 flavonoides entre ellos vitexina y vitexina 2”O-xilosido presentan esta actividad. Algunos reportes en la literatura han mostrado que los flavonoides pueden actuar mediante la estabilización de especies reactivas de oxigeno, gracias a la estabilización de electrones. (Zielinska-Pisklak et al., Article in press). Asi mismo Torres et al. han reportado que los extractos de la planta *Bauhinia kalbreyeri* Harms tienen la capacidad de de descomponer el peróxido de hidrogeno, y este seria uno de los posible mecanismos de acción antioxidantes, en esta planta se ha descrito la prescencia de algunos flavonoides (Ortiz Torres et al., 2009)

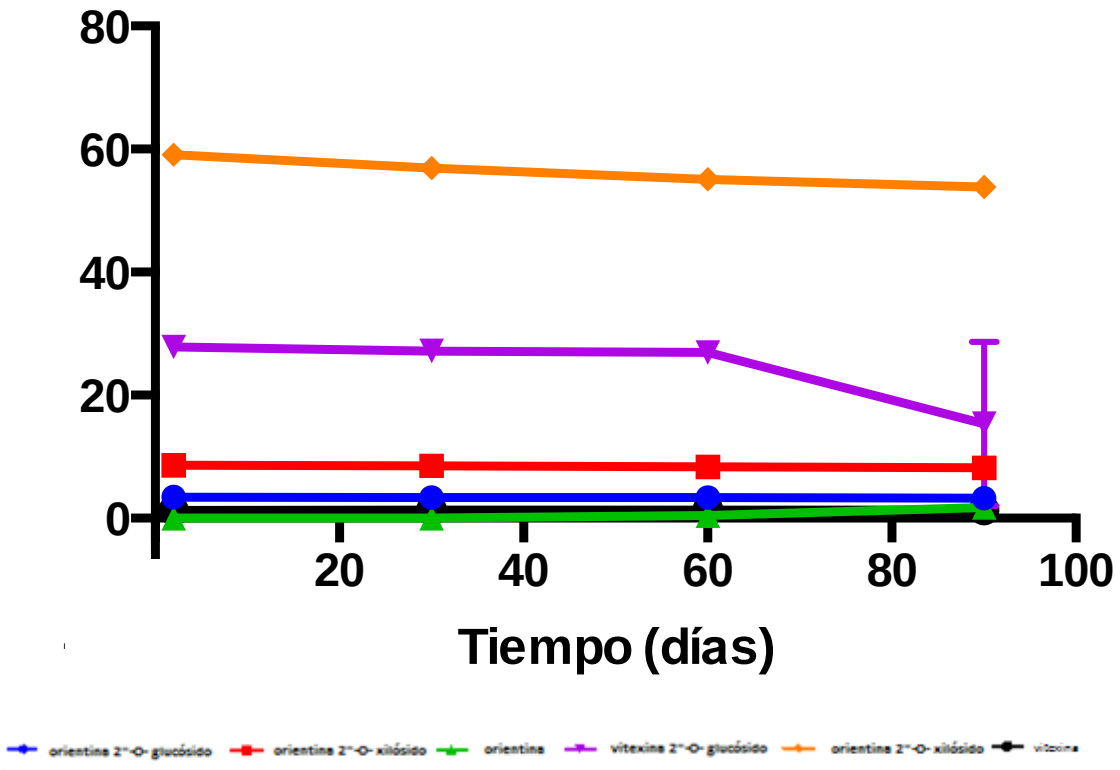
5.3.2 Ensayos de estabilidad en condiciones de almacenamiento controlada

Las muestras de extracto libre y microencapsulado almacenadas en cuartos de estabilidad donde la temperatura y la humedad son controladas, permitieron llevar a cabo la monitorización en el tiempo de la abundancia relativa cada flavonoide presente en el extracto, los resultados se presentan en las Figuras 5-20 a 5-23 respectivamente. Los resultados se reportan de acuerdo con los cambios en el área de cada pico siendo el 100% el área de los flavonoides totales.

En la Figura 5-20, durante la evaluación de la estabilidad en condiciones de almacenamiento controladas 30ºC y 70%HR se observa que, respecto a las abundancias relativas en el extracto libre, no hay cambios significativos en el tiempo , exceptuando los correspondientes a los diglicosidos vitexina 2”-O- glucósido y vitexina 2”-O- xilósido, en los que observan disminuciones que resultan ser significativas al aplicar el test de Dunett. Sin embargo, este cambio no se ve compensado con un aumento en la abundancia relativa de vitexina, indicando que la vía de degradación es diferente a la planteada en las condiciones de estrés (hidrólisis ácida, básica y a pH neutro).

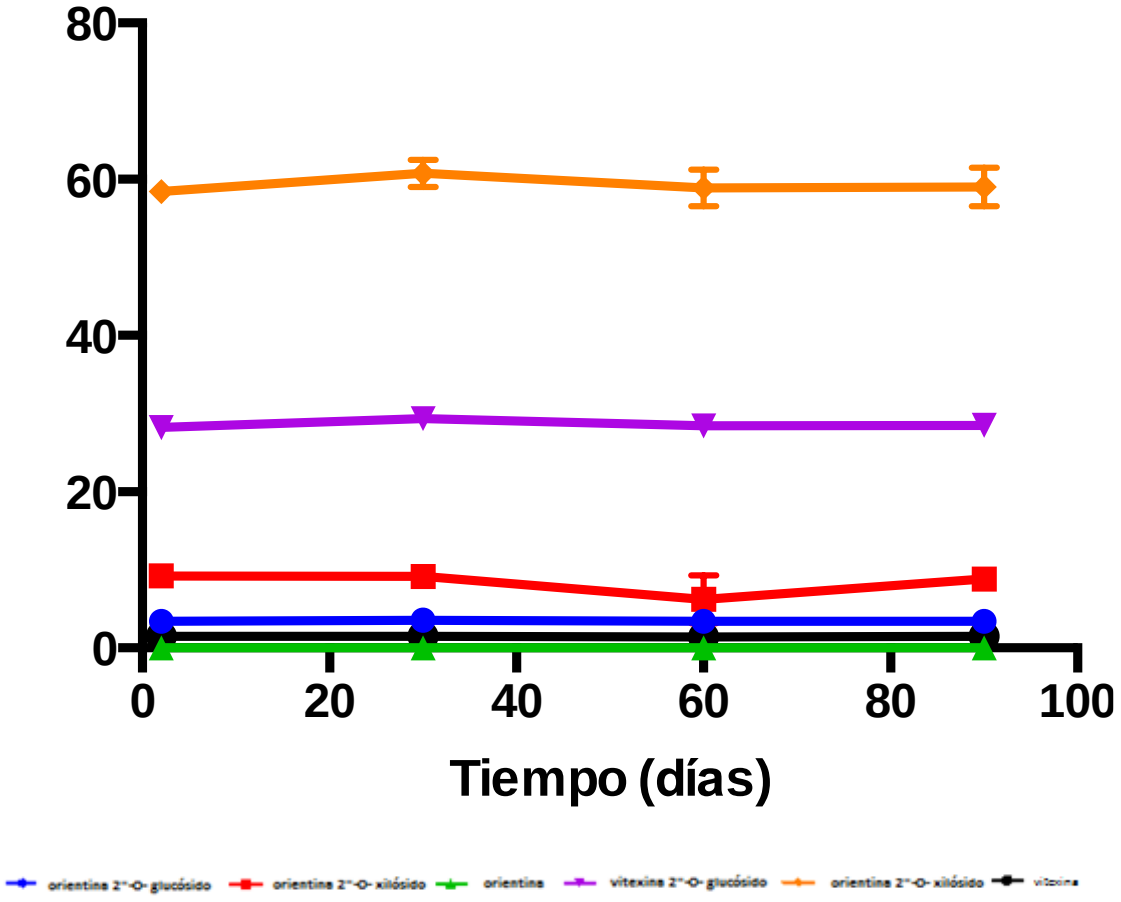
Al realizar esta misma visualización gráfica, para el sistema microparticulado en las condiciones de 30ºC y 70%HR (Figura 5-21), no parecen existir diferencias en los resultados obtenidos en el tiempo cero y en el dia 90, lo anterior se confirma mediante el resultado obtenido del test de comparaciones multiples de Dunett, donde para ninguno de los flavonoides se presentan cambios significativos de la muestra.

Figura 5-20 Abundancia relativa de flavonoides del extracto libre de *P. quadrangularis* durante la monitorización en condiciones de almacenamiento controladas 30ºC y 70%HR



Los datos están expresados como la media ± D.E. (n=3) Test de Dunnet comparando todos los puntos de muestreo contra el t=0 (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001)

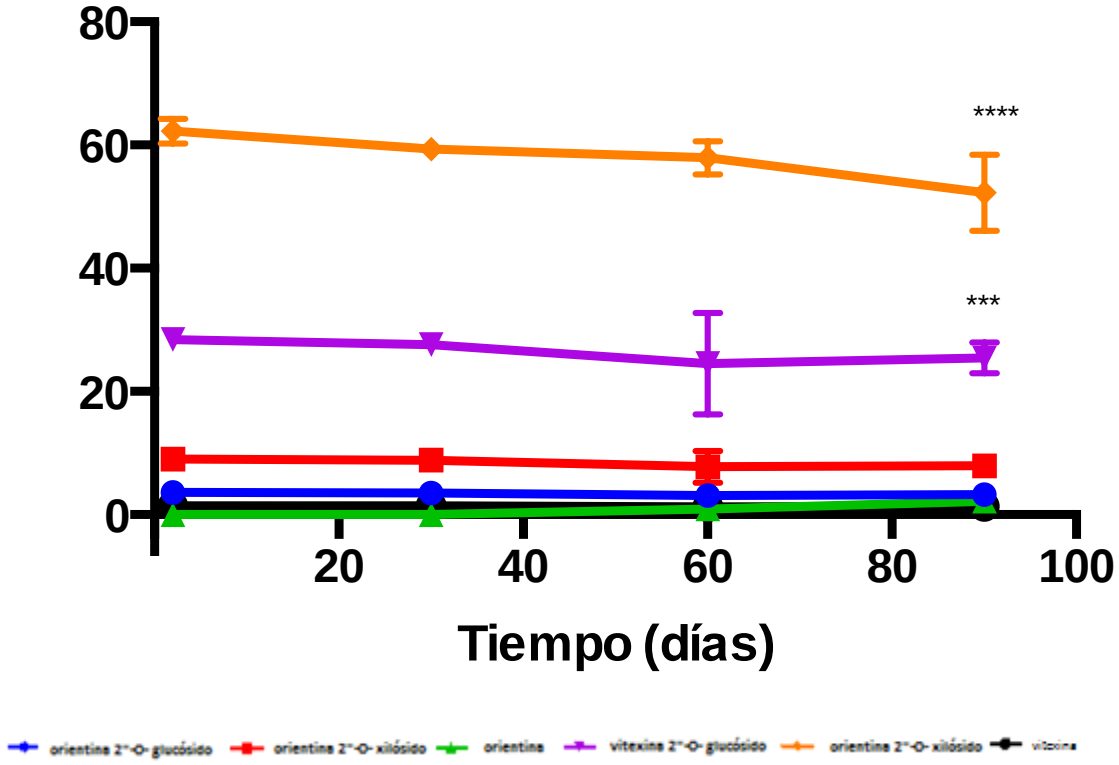
Figura 5-21 Abundancia relativa de flavonoides del extracto microencapsulado de *P. quadrangularis* durante la monitorización en condiciones de almacenamiento controladas 30ºC y 70%HR



Los datos están expresados como la media ± D.E. (n=3) Test de Dunnet comparando todos los puntos de muestreo contra el t=0 (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001)

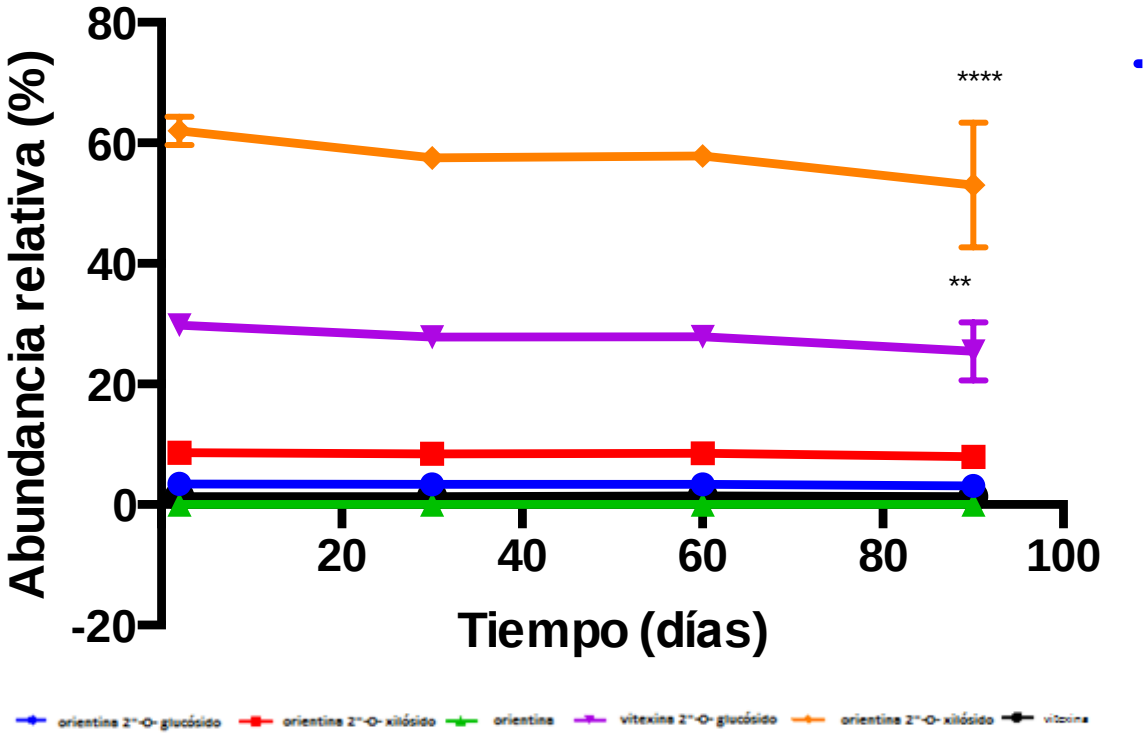
De la misma forma se reportan las gráficas correspondientes a la condicion de almacenamiento de 40ºC y 75%HR, para el extracto libre y microencapsulado, Figura 5-22 y 5-23 respectivamente. En estas graficas, al monitorear los cambios en las abundancias relativas se encontró que para el extracto libre y las micropartículas hay cambios en los flavonoides vitexina 2”-O-xilósido y vitexina 2”-O-glucósido, observándose una ligera disminución a los 90 días la cual es estadísticamente significativa según el test de Dunnet.

Figura 5-22 Abundancia relativa de flavonoides del extracto libre de *P. quadrangularis* durante la monitorización en condiciones de almacenamiento controladas 40ºC y 75%HR



Los datos están expresados como la media ± D.E. (n=3) Test de Dunnet comparando todos los puntos de muestreo contra el t=0 (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001)

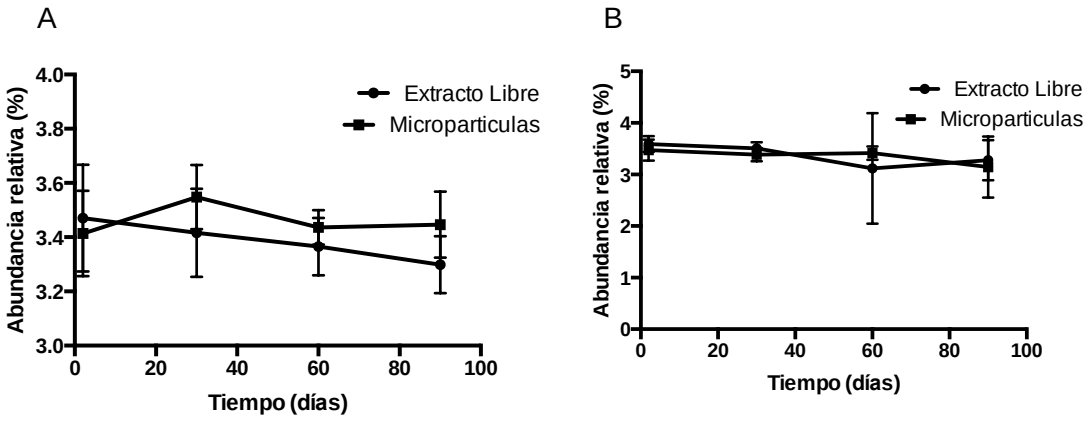
Figura 5-23 Abundancia relativa de flavonoides del extracto microencapsulado de *P. quadrangularis* durante la monitorización en condiciones de almacenamiento controladas 40ºC y 75%HR



Los datos están expresados como la media ± D.E. (n=3) Test de Dunnet comparando todos los puntos de muestreo contra el t=0 (* p<0.05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001)

Ahora, como uno de los objetivos del presente proyecto es comparar los resultados de los ensayos de estabilidad entre el sistema microparticulado y el extracto libre, con el objetivo de verificar si existen diferencias atribuibles al sitema microparticulado, a continuación se presentan los resultados comparativos de cada uno de los flavonoides a las dos condiciones de almacenamiento monitoreadas durante la realización de estos ensayos (Figuras 5-24 a 5-29).

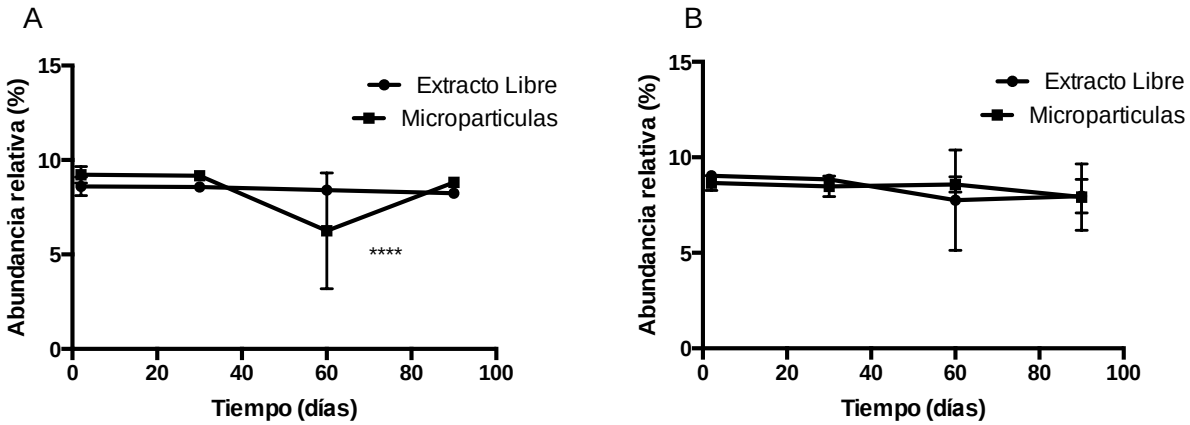
Figura 5-24 Comparación entre el extracto libre y microencapsulado de *P. quadrangularis* en condiciones de almacenamiento controladas (orientina 2”-O-glucósido)



A) 30°C 70% HR. B) 40°C 75% HR Los datos están expresados como la media ± D.E. (n=3) Test de Sidak comparando los grupos Extracto libre y Extracto microencapsulado en todos los tiempos de muestreo (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001)

Como se observa en la Figura 5-24, no hay diferencias marcadas entre los grupos microparticulas y extracto libre, lo cual es confirmado por el test de Sidak, la abundancia relativa permanece intacta en el tiempo.

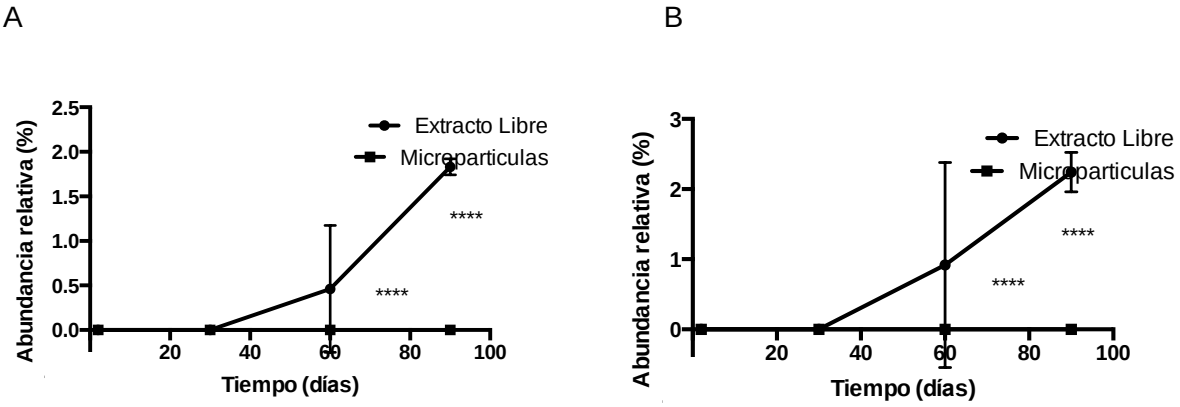
Figura 5-25 Comparación entre el extracto libre y microencapsulado de *P. quadrangularis* en condiciones de almacenamiento controladas (orientina 2”-O-xilósido)



A) 30°C 70% HR. B) 40°C 75% HR Los datos están expresados como la media ± D.E. (n=3) Test de Sidak comparandolos grupos Extracto libre y Extracto microencapsulado en todos los tiempos de muestreo (* p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001; **** p<0.0001

Como se puede visualizar en la Figura 5-25 correspondiente al flavonoide orientina 2”O-xilósido, no hay diferencias entre el grupo de micropartículas y el extracto libre, verificado por la prueba estadística de comparaciones múltiples, excepto en el tiempo 60 días donde hay una abundancia relativa menor de este flavonoide en la condición de almacenamiento de 30ºC y 70% HR.

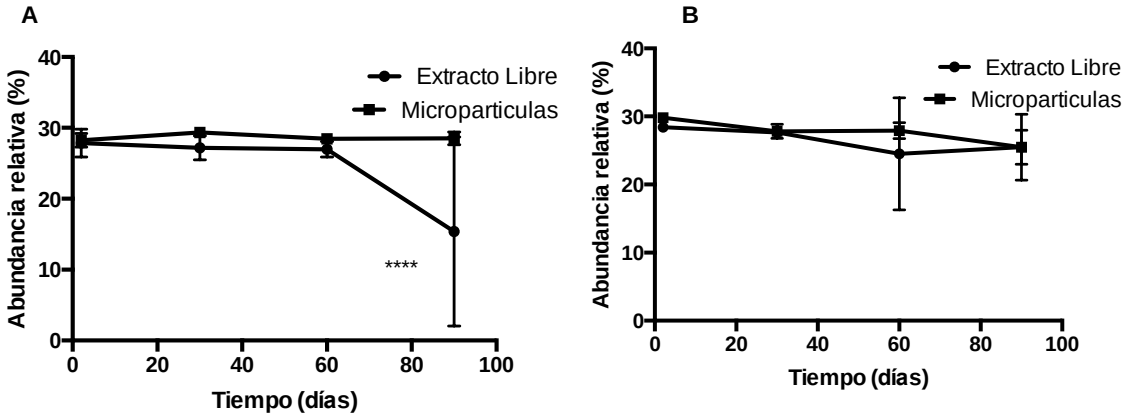
Figura 5-26 Comparación entre el extracto libre y microencapsulado de *P. quadrangularis* en condiciones de almacenamiento controladas (orientina)



A. 30°C 70% HR B. 40°C 75% HR Los datos están expresados como la media ± D.E. (n=3) Test de Sidak comparando los grupos Extracto libre y Extracto microencapsulado en todos los tiempos de muestreo (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001

Una visualización de la Figura 5-26 permite inferir que sí existe una degradación de algunos compuestos hacia orientina ya que su abundancia relativa aumenta ligeramente a los 60 días de evaluación. Este aumentó es estadísticamente significativo de acuerdo al test de Sidak.

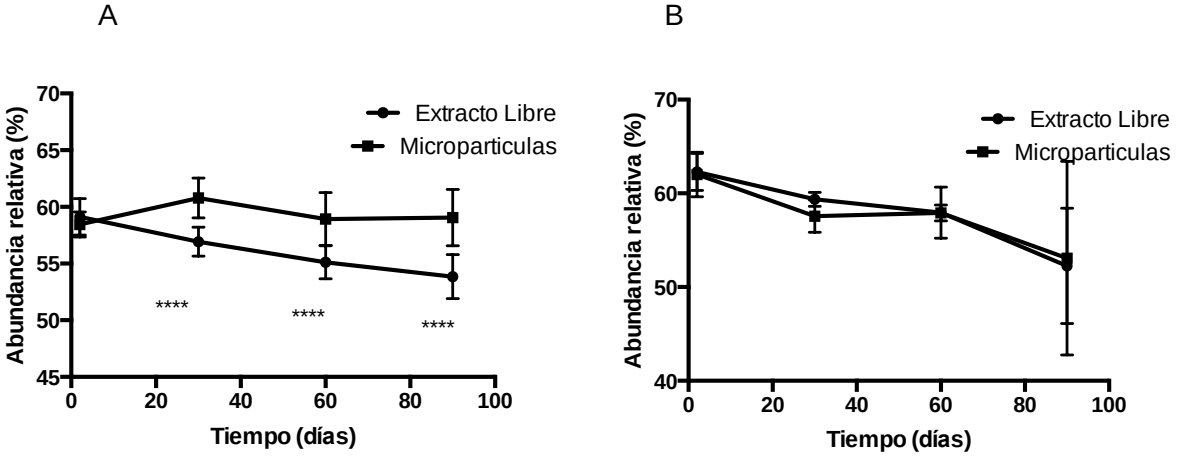
Figura 5-27 Comparación entre el extracto libre y microencapsulado de *P. quadrangularis* en condiciones de almacenamiento controladas (vitexina 2”-O-glucósido)



A. 30°C 70% HR B. 40°C 75% HR Los datos están expresados como la media ± D.E. (n=3) Test de Sidak comparando los grupos Extracto libre y Extracto microencapsulado en todos los tiempos de muestreo (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001

La prueba de comparación de los grupos indica que existe diferencia estadisticamente significativa entre los grupos de microparticulas y extracto libre, únicamente en el último punto de la condición de almacenamiento de 30ºC, donde la abundancia relativa de este flavonoide es menor en el extracto libre, de lo que se puede inferir que este flavonoide se degrada en otro compuesto (Figura 5-27).

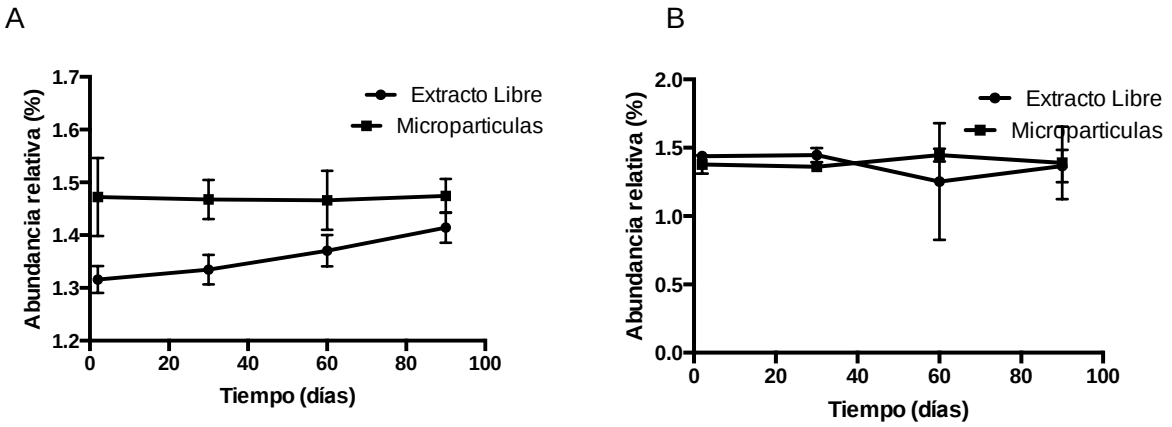
Figura 5-28 Comparación entre el extracto libre y microencapsulado de *P. quadrangularis* en condiciones de almacenamiento controladas (vitexina 2”-O-glucósido)



A. 30°C 70% HR B. 40°C 75% HR Los datos están expresados como la media ± D.E. (n=3) Test de Sidak comparando los grupos Extracto libre y Extracto microencapsulado en todos los tiempos de muestreo (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001

En el caso del compuestos vitexina 2”-O-xilósido se observa que hay una caída de la abundancia relativa, esta es mayor en la condición de almacenamiento de 40ºC. Sin embargo en la condición de 30ºC es más pronunciada y estadísticamente significativa la diferencia entre los dos grupos, siendo más drástico el descenso para el extracto libre. Lo anterior indica que hay una degradación de este compuesto, y que el sistema microparticulado puede contribuir al protegerlo de las condiciones ambientales (Figura 5-28).

Figura 5-29 Comparación entre el extracto libre y microencapsulado de *P. quadrangularis* en condiciones de almacenamiento controladas (vitexina)



A. 30°C 70% HR B. 40°C 75% HR Los datos están expresados como la media ± D.E. (n=3) Test de Sidak comparando los grupos Extracto libre y Extracto microencapsulado en todos los tiempos de muestreo (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001)

Finalmente la Figura 5-29 correspondiente a vitexina, no hay diferencias significativas para la condición de almacenamiento de 40ºC, aun así a 30ºC si existe una diferencia, encontrándose un aumento de la abundancia de vitexina, lo que concuerda con el descenso de la vitexina 2”O-xilósido que puede generar vitexina al perder la segunda unida de azúcar. Este aumento no se observa en el sistema microparticulado por lo que se puede inferir que el sitema microparticulado protege la degradación de vitexina 2”-O-xilósido a vitexina.

Los resultados anteriores se encuentran de acuerdo a los resultados reportados previamente por Pacheco et al. en los cuales se evaluó la estabilidad del flavonoide orientina, así como de otros compuestos fenólicos y algunas antocianidinas en aceites de *E. Precatoria.* en este trabajo se encontró que este tipo de compuestos permanecen estables en un almacenamiento a 30ºC (Pacheco et al., 2010),. Como podemos observar los flavonoides totales no disminuyeron en el tiempo en que se evaluó la estabilidad. Este hecho concuerda con los datos de Bilia et al. quienes hallaron que el contenido de flavonoides totales en dos plantas *Crataegus oxyacantha* L. e *Hieracium pilosella* L, no disminuye en los tres primeros meses (fueron evaluados 9), entre los componentes evaluados se encontraron presente también Vitexina 2-O ramnhósido Bilia et al. (2007),.

Bilia et al. reportaron estudios de estabilidad a diferentes condiciones (25º C 60%HR, 40ºC 75%HR, 50ºC 75%HR y 60 ºC 75%HR) durante seis meses, para tinturas de grado farmacopéico de *Silybum marianum, Calendula officinalis y Passiflora incarnata.* En estas dos últimas especies resulta de vital importancia la cuantificación de los flavonoides ya que sirven como marcadores químicos de las tinturas; la cuantificación fue realizada mediante una metodología de CLAE previamente validada, en la que se usó rutina como estándar externo. Los flavonoides contenidos en cada una de las tinturas fueron identificados mediante la utilización de un CLAE-MS. Para el caso de caléndula (*Calendula officinallis*) se identificaron 7 compuestos, los resultados de la degradación a 25ºC demuestran que hay una disminución del 2.5% aproximadamente de los flavonoides totales en 90 días. Respecto a cada uno de los siete flavonoides se puede observar un descenso en la concentración de todos, aunque los autores encontraron un aumento de la concentración del flavonoide isoramnetina 3-O- glucósido que atribuyen a la pérdida de una unidad de azúcar de flavonoides diglicosidados presentes en la tintura. Para el caso de *Passiflora incarnata,* siete compuestos de tipo flavonoide fueron identificados (vicina, isoschaftosido, schaftosido, homoorientina, isovitexina 2”O-glucósido , vitexina e isovitexina). Respecto a su degradación en 90 días se observa una disminución del 1.6% aproximadamente de los flavonoides totales. El compuesto con el porcentaje de degradación mas alto es vitexina 2”O-glucósido con una degradación de 10% mientras los demás compuestos no tienen una degradación mayor al 1% (Bilia et al., 2002).

Los resultados anteriormente descritos son muy similares a los reportados en el presente trabajo, ya que podemos observar que en los primeros 90 días no hay una disminución significativa del contenido de flavonoides totales del extracto de *P. quadrangularis*. Sin embargo, podemos observar también que los compuestos del tipo C-O-diglicosilados se degradan de manera más rápida que sus precursores monoglicosidados, de hecho el aumento de las concentraciones de vitexina y orientina puede deberse a este efecto. Bilia et al. en un trabajo investigativo adicional en el cual evaluó la estabilidad de extractos de hierba de San Juan comercialmente disponibles, a 25ºC (65%HR) y 40ºC (75%HR) encontró una degradación del 2% de los flavonoles de la muestra contenida en el extracto para la primera condición de almacenamiento (en 90 días) y de 15% para la segunda condición de almacenamiento (en 45 días) (Bilia et al., 2001), similar a lo encontrado en el presente trabajo.

Algunos autores han reportado estudios de estabilidad de microparticulas elaboradas con la metodología de secado por aspersión, a continuación se resumen alguno ejemplos. Cortés- Rojas et al. realizaron un estudio de estabilidad en diferentes condiciones de almacenamiento (14° C y 80% HR, 25°C y 63,5 % HR, y 40°C y 75% HR) de un extracto de *Bidens pilosa* L. que fue transformado usando secado por aspersión con Aerosil y celulosa microcristalina, sus resultados muestran que los tres compuestos usados como marcadores (rutina, hiperósido y poliacetileno) no tienen variaciones significativas en sachets cerrados durante un año si estos se almacenan a 14° C y 80% HR ó 25°C y 63,5 % HR (Cortés- Rojas et al., 2014). Vergara et al. describen en su estudio la microencapsulación de extractos de pulpa de *Opuntia ficus indica* ultrafiltrados en Capsul ® C, adicinalmente reportan los resultados de evaluación de estabilidad en condiciones de almacenamiento de 60°C durante 25 semanas, mostrando que la microencapsulación disminuye la tasa de degradación en comparación con el extracto crudo (Vergara et al., 2014). Sansone et al. reportan estudios de estabilidad a 40° C y 75% de HR, para extractos de *Fodogia ancylantha* y *Melissa officinallis* encapsulados en maltodextrinas y pectina, encontrando que si bien hay una disminución en la degradación esta no es una protección completa debido a que parte de los extractos quedaron sin encapsular ó están adheridos a la superficie (Sansone et al., 2011). Finalmente el reporte de Sansone et al., han reportado estudios de estabilidad de 25°C y 60% HR durante 12 meses, para micropartículas de flavonoides naringenina y quercetina, usando celulosa acetato ftalato y carboximetilcelulosa como agentes de recubrimiento, hallando que no hubo variación significativa en el contenido de los flavonoides en los 12 meses de evaluación (Sansone et al., 2011(1)).

De manera global, el sistema microparticulado es útil para la protección del extracto, retrasando la degradación en las condiciones de estrés cuando el medio se encuentra en un pH alcalino y se reliza una hidrólisis a reflujo; y también cuando se somete a condiciones de almacenamiento de 40°C y 75% HR.

6. Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

Se desarrolló y validó una metodología analítica que permitió la cuantificación de flavonoides totales y de vitexina presentes en el extracto acuoso de hojas de *P. quadrangularis,* por medio de CLAE. Por medio del método, que mostró ser linear, preciso, exacto, sensible, específico y selectivo, fue posible determinar que en el extracto acuoso de hojas hay un contenido de 55,1 mg de flavonoides totales (equivalentes a vitexina) por cada gramo de extracto y 0,57 mg de vitexina.

Se evaluó el efecto de algunas variables (Velocidad de Aspersión, temperatura de entrada, caudal de aire, concentración de sólidos, proporcion polimero:extracto) de la metodología de Spray Drying en la microencapsulación del extracto acuoso de hojas de *P. quadrangularis* en un polímero, hallando la forma en la que ciertos factores afectan la respuesta del rendimiento y la eficiencia de encapsulación. Las mejores condiciones encontradas en el presente trabajo, es decir aquellas con rendimientos y eficiencias de encapsulación más altas son: Temperatura de entrada: 100 ºC, velocidad de aspersión: 10%, caudal de aire: 100%, concentración de sólidos: 5%, proporción de copolímero:extracto: 3:1

La evaluación de estabilidad del extracto de *P. quadrangularis* permite clasificarle como lábil a las condiciones hidrolíticas catalizadas por medio ácido y alcalino y estable a hidrólisis a pH neutro.

Se comparó la estabilidad en condiciones de estrés del extracto acuoso de hojas de *P. quadrangularis* libre y microencapsulado, encontrando que la microencapsulación afecta estabilidad de forma que retrasa de manera significativa la degradación en las condiciones

de estrés: hidrólisis básica 0,1 N en Reflujo y las condiciones de almacenamiento controladas: 40ºC 75%HR.

6.2 Recomendaciones

Optimizar el proceso de extracción, de tal forma que se mejore el rendimiento de obtención del extracto acuoso de hojas de *P. quadrangularis.*

Determinar propiedades mecánicas como la elasticidad de las micropartículas de tal forma que se pueda determinar si es viable su incorporación en formas farmacéuticas convencionales.

Implementar metodologías analíticas que permitan la evaluación de estabilidad de este extracto mediante otros marcadores analíticos, incluyendo otras sustancias o grupos de metabolitos que están presentes en el extracto, tal como las saponinas, y de esta forma obtener información acerca de la cinética de degradación de los diferentes componentes de la muestra.

Adelantar estudios en modelos animales de forma que se pueda encontrar información más clara en relación a la absorción, distribución, metabolismo y eliminación de los diferentes componentes del extracto, en especial de los flavonoides contenidos a los cuáles se les ha atribuido las actividades sobre el sistema nervioso central. A su vez iniciar estudios de toxicidad con el fin de obtener más información en relación a la seguridad de este extracto.

A. Anexo: Código Utilizado para el análisis de Datos en el Software R

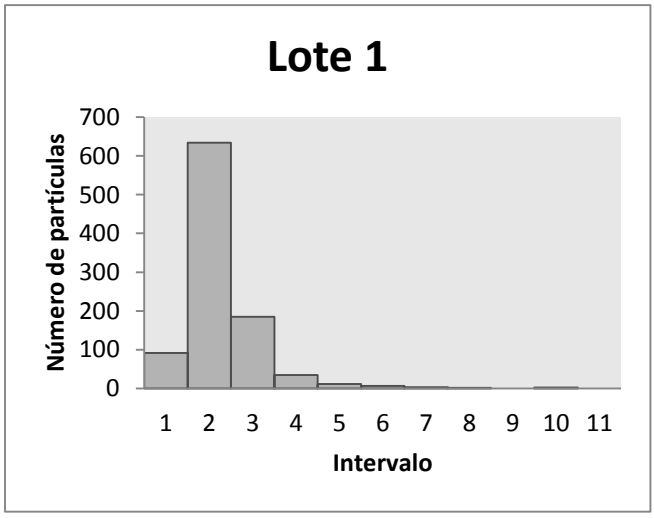
```
datos <- read.delim("clipboard",header=T)
attach(datos)
names(datos)
Rend.1 <- (Rend-((max(Rend)+min(Rend))/2))/((max(Rend)-
min(Rend))/2)
Efi.1  <- (Efi4-((max(Efi4)+min(Efi4))/2))/((max(Efi4)-
min(Efi4))/2)
datos.1 <- matrix(0,nrow(datos),ncol(datos))
for(i in 1:ncol(datos)){
datos.1[,i] <- (datos[,i]-
((max(datos[,i])+min(datos[,i]))/2))/((max(datos[,i])-
min(datos[,i]))/2)
}
shapiro.test(Rend.1)
shapiro.test(Efi.1)
datos.1 <- as.data.frame(datos.1)
names(datos.1) <- names(datos)
datos.1
attach(datos.1)
T2 <- T*T
VA2 <- VA*VA
CA2 <- CA*CA
VAG2 <- VAG*VAG
P2 <- P*P
##Regresion Rendimiento
lmR <-
lm(Rend~T*VA+T*CA+T*VAG+T*P+VA*CA+VA*VAG+VA*P+CA*VAG+CA*P+VAG*P+(T
2)+(VA2)+(VAG2)+(P2),data=datos.1)
summary(lmR)
step(lmR)

lmStepR <- lm(formula = Rend ~ T + VA + CA + VAG + P + T2 + VA2 +
T:VA +
T:CA + VA:CA + VA:VAG + VA:P + CA:VAG, data = datos.1)
lmStepR <- lm(formula = Rend ~ T + VA + CA + VA:CA, data =
datos.1)
summary(lmStepR)
lmStepR <- lm(formula = Rend ~ T + VA + CA + VAG + P + T2 + VA2 +
T^2 + VA^2 + CA^2 + VAG^2 + P^2 + T2^2 + VA2^2 , data = datos.1)
anova(lmStepR)
```

```
lmStepR$model
plot(lmStepR)
par(mfrow = c(1,3))
persp(lmStepR,~ T+VA+CA,col=rainbow(50),contours="colors")
contour(lmStepR,~ T+VA+CA,image=TRUE)
modelo_Rend <- lm(Rend ~ T+VA+CA+VA:CA-1)
summary(modelo_Rend)
##Regresion Eficiencia
lmE <-
lm(Efi4~T*VA+T*CA+T*VAG+T*P+VA*CA+VA*VAG+VA*P+CA*VAG+CA*P+VAG*P+(T
2)+(VA2)+(VAG2)+(P2),data=datos.1)
summary(lmE)
step(lmE)
lmStepE <- lm(formula = Efi4 ~ T + VA + CA + VAG + P + VA2 + VAG2
+ T:VA +
VA:CA + VA:VAG + VA:P + CA:VAG + CA:P, data = datos.1)
lmStepE <- lm(formula = Efi4 ~ T + VA + CA + VAG + P + VA2 + VAG2
+ T:VA +
    VA:CA + VA:VAG + VA:P + CA:P, data = datos.1)
summary(lmStepE)
plot(lmStepE)
par(mfrow = c(3,4))
persp(lmStepE,~ T+VA+CA+VAG+P,col=rainbow(50),contours="colors")
contour(lmStepE,~ T+VA+CA+VAG+P,image=TRUE)
dev.off()
shapiro.test(lmStepE$residuals)
library(rgl)
T.p <- seq(-1,1,length= 25)
VA.p <- seq(-1,1,length= 25)
CA.p <- seq(-1,1,length= 25)
Int.p <- seq(-1,1,length= 25)
VAG.p <- seq(-1,1,length= 25)
P.p <- seq(-1,1,length= 25)
cons<-rep(1,1000)
sim<-data.frame(T=T.p,VA=VA.p,CA=CA.p,VAG=VAG.p,P=P.p)
predichosR<-predict(lmStepR,sim,type="response")
plot3d(T.p,predichosR,VA.p)
zR <- outer(VA.p, CA.p, function(VA.p,CA.p){0.2879-0.2000-
(0.2498*VA.p)+(0.2411*CA.p)+(0.2591*VA.p*CA.p)})
hgt <- 0.25 * (zR[-25,-25] + zR[-1,-25] + zR[-25,-1] + zR[-1,-1])
hgt <- (hgt - min(hgt))/ (max(hgt) - min(hgt))
persp(VA.p, CA.p, zR, col = gray(1 - hgt), theta =-30,phi=10)
zE <- outer(VA.p, CA.p, function(VA.p,CA.p){ 0.45022-0.15119-
(0.37825*VA.p)-(0.28362*CA.p)-0.37178-0.10054-(0.16049*VA.p*VA.p)-
0.32287-(0.06759*VA.p)-(0.18017*VA.p*CA.p)-(0.09345*VA.p)-
(0.22953*VA.p)-(0.05075*CA.p)})
hgt <- 0.25 * (zE[-25,-25] + zE[-1,-25] + zE[-25,-1] + zE[-1,-1])
hgt <- (hgt - min(hgt))/ (max(hgt) - min(hgt))
persp(VA.p, CA.p, zE, col = gray(1 - hgt), theta =50,phi=0)
```

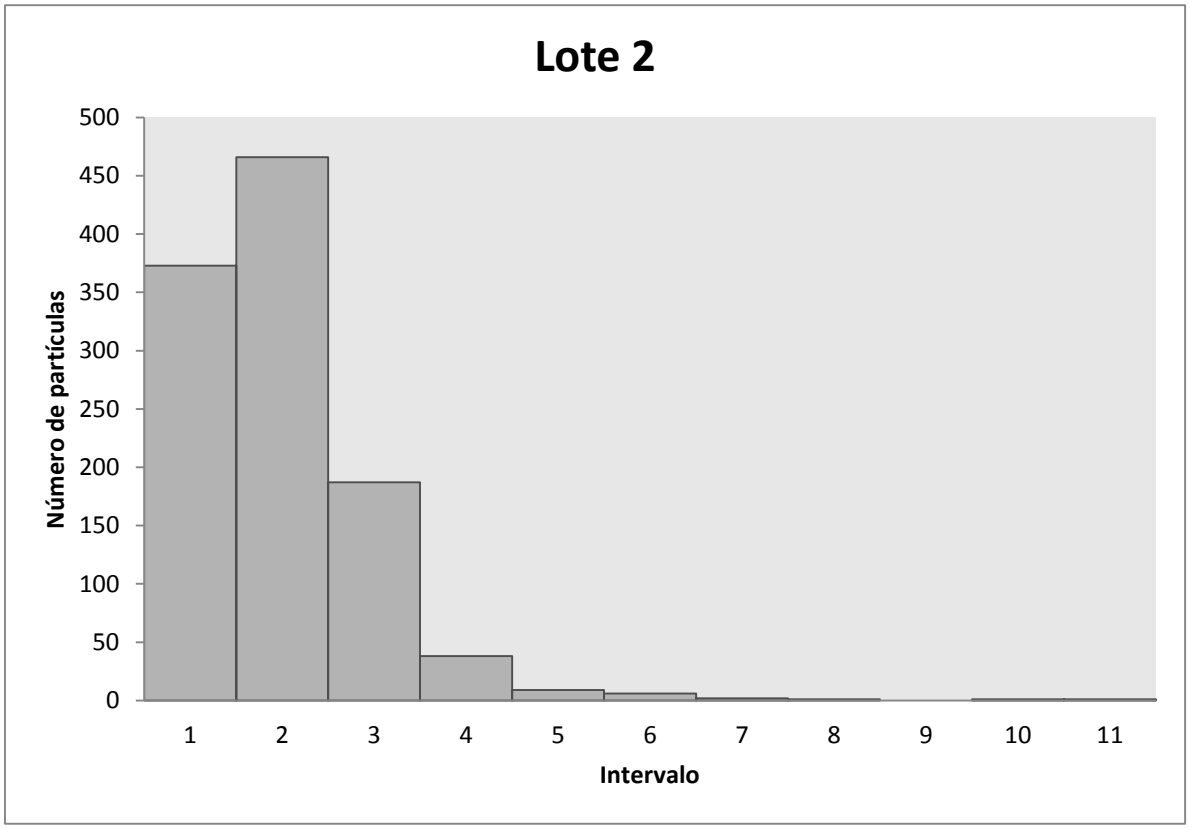
```
wireframe(Rend ~ T + VA + CA + VA*CA, data = datos.1, drape =
TRUE,
  colorkey = TRUE)
wireframe(Efi4 ~ T + VA + CA + VAG + P + VA2 + VAG2 + T*VA +
VA*CA + VA*VAG + VA*P + CA*P, data = datos.1, drape = TRUE,
colorkey = TRUE,screen = list(z = -30, x = -60))
f<-function(a,b,c)
{
a<-0.2879 - 0.2*a - 0.2498*b + 0.2411*c + 0.2591*b*c
a
}
plot(f(T.p,VA.p,CA.p)
## hacer una grilla fina*
## SAS g3grid, contour*
curve(f)
polinomial
g<-function(a,b,c,d,e)
{
b <- 0.45022 - 0.15119*a - 0.37825*b -0.28362*c - 0.37178*d -
0.10054*e
     -0.16049*b*b - 0.32287*d*d - 0.06759*a*b -0.18017*b*c -
0.09345*b*d
     -0.22953*b*e -0.05075*c*e
b
}
plot(g(T.p,VA.p,CA.p,VAG.p,P.p))
z<-outer(T.p,CA.p,f(T.p,CA.p))
persp(T.p,CA.p,z)
plot(predichos,T.p)
```

B. Anexo: Histogramas de distribución de frecuencias para el tamaño de partícula de los Lotes de Micropartículas Obtenidas

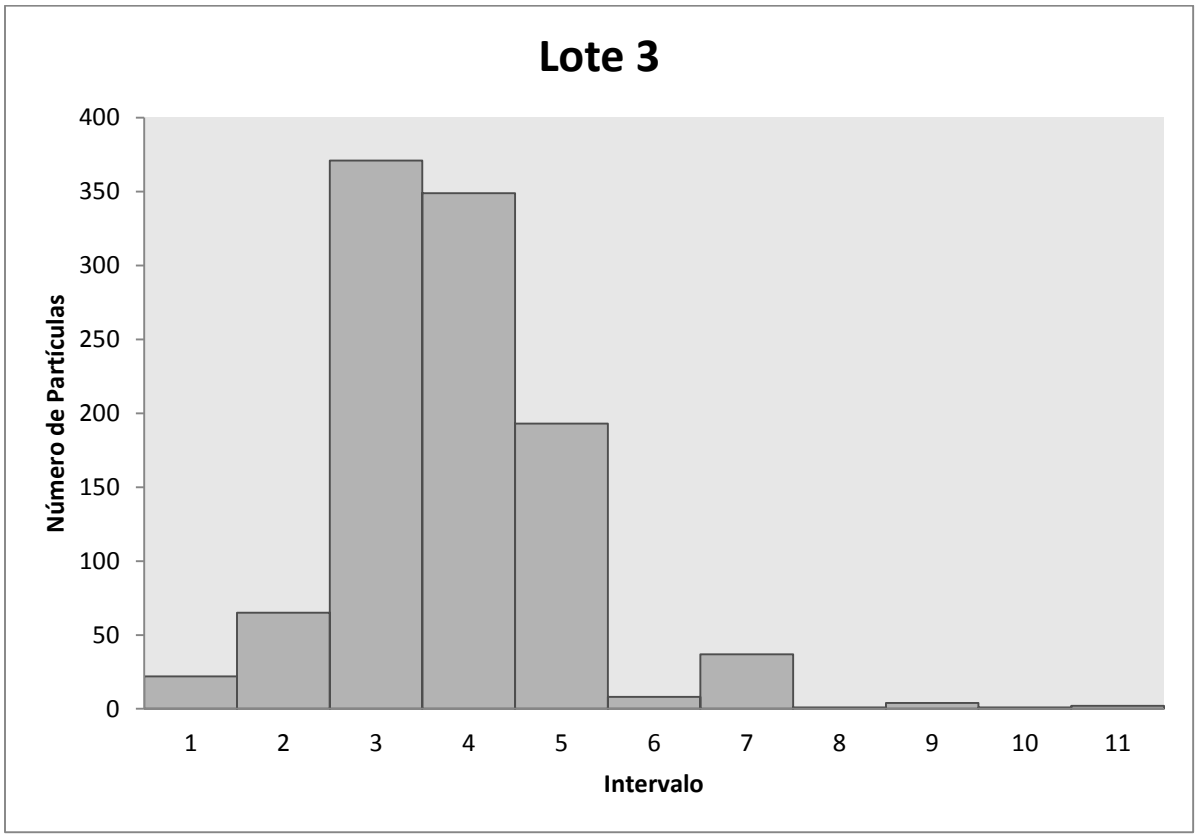
LOTE 1				
Clase	Inferior	Superior	Frecuencia Acumulada	Frecuencia absoluta
1	0,2	3,8	91	91
2	3,8	7,4	725	634
3	7,4	11,1	910	185
4	11,1	14,7	944	34
5	14,7	18,3	955	11
6	18,3	21,9	961	6
7	21,9	25,5	964	3
8	25,5	29,1	965	1
9	29,1	32,8	965	0
10	32,8	36,4	967	2
11	36,4	40,0	967	0



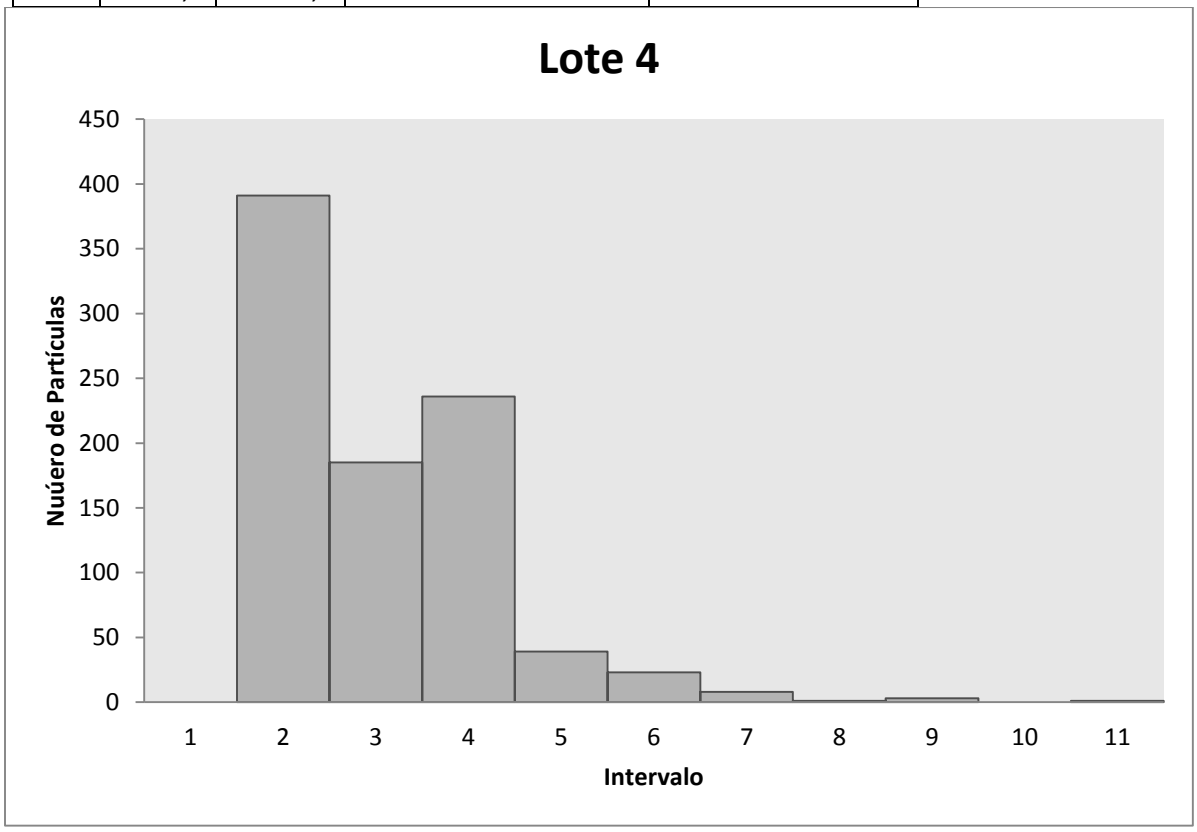
LOTE 2				
Clase	Inferior	Superior	Frecuencia Acumulada	Frecuencia absoluta
1	2,4	4,9	373	373
2	4,9	7,5	839	466
3	7,5	10,0	1026	187
4	10,0	12,6	1064	38
5	12,6	15,1	1073	9
6	15,1	17,7	1079	6
7	17,7	20,2	1081	2
8	20,2	22,8	1082	1
9	22,8	25,3	1082	0
10	25,3	27,9	1083	1
11	27,9	30,4	1084	1



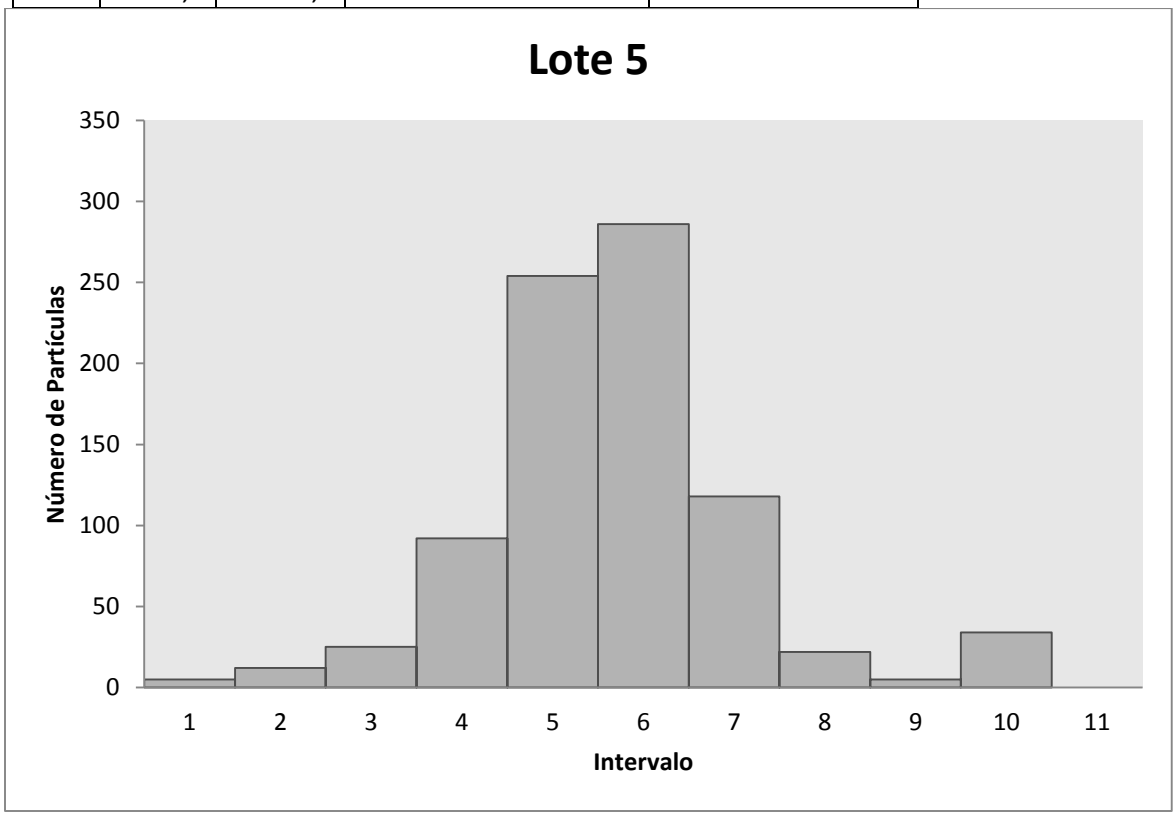
LOTE 3				
Clase	Inferior	Superior	Frecuencia Acumulada	Frecuencia absoluta
1	0,8	2,0	22	22
2	2,0	3,1	87	65
3	3,1	4,3	458	371
4	4,3	5,5	807	349
5	5,5	6,6	1000	193
6	6,6	7,8	1008	8
7	7,8	8,9	1045	37
8	8,9	10,1	1046	1
9	10,1	11,3	1050	4
10	11,3	12,4	1051	1
11	12,4	13,6	1053	2



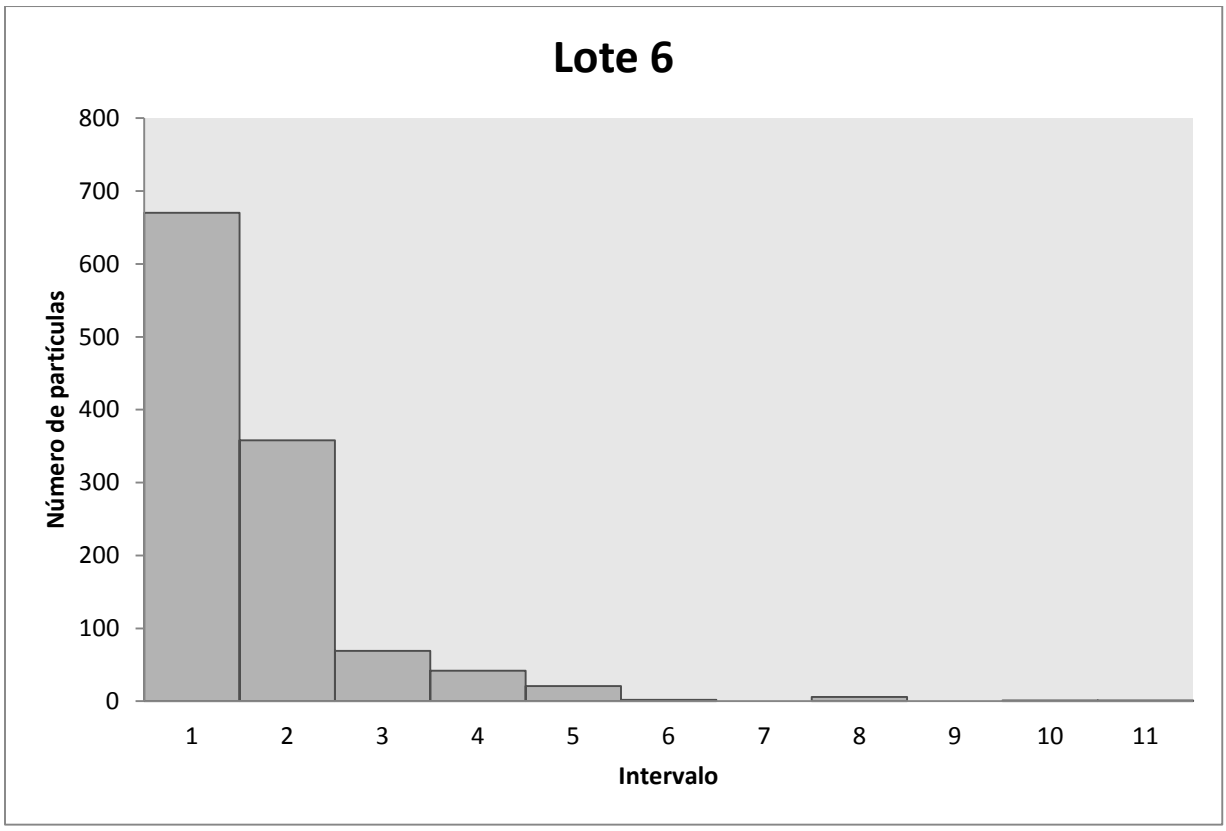
LOTE 4				
Clase	Inferior	Superior	Frecuencia Acumulada	Frecuencia absoluta
1	1,6	3,6	0	0
2	3,6	5,7	391	391
3	5,7	7,7	576	185
4	7,7	9,7	812	236
5	9,7	11,8	851	39
6	11,8	13,8	874	23
7	13,8	15,9	882	8
8	15,9	17,9	883	1
9	17,9	19,9	886	3
10	19,9	22,0	886	0
11	22,0	24,0	887	1



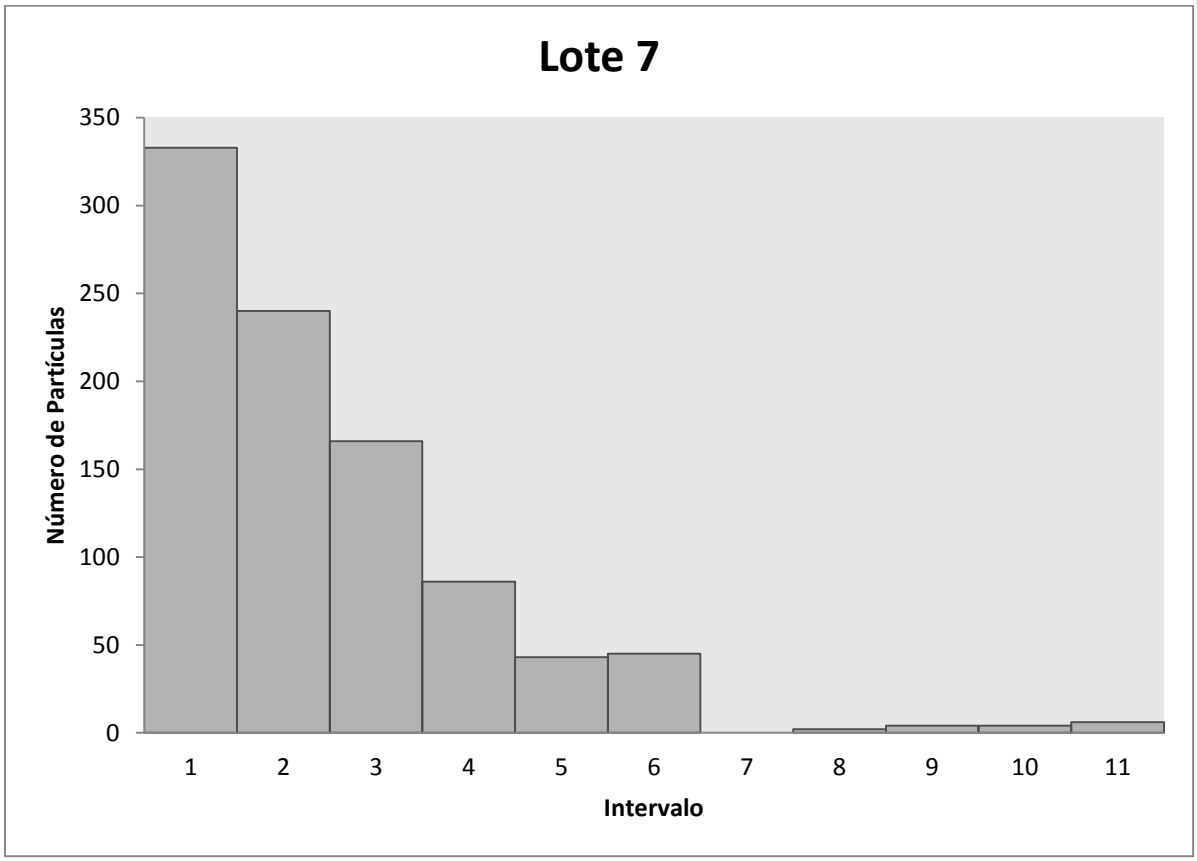
LOTE 5				
Clase	Inferior	Superior	Frecuencia Acumulada	Frecuencia absoluta
1	0,1	1,0	5	5
2	1,0	1,8	17	12
3	1,8	2,7	42	25
4	2,7	3,6	134	92
5	3,6	4,4	388	254
6	4,4	5,3	674	286
7	5,3	6,1	792	118
8	6,1	7,0	814	22
9	7,0	7,9	819	5
10	7,9	8,7	853	34
11	8,7	9,6	853	0



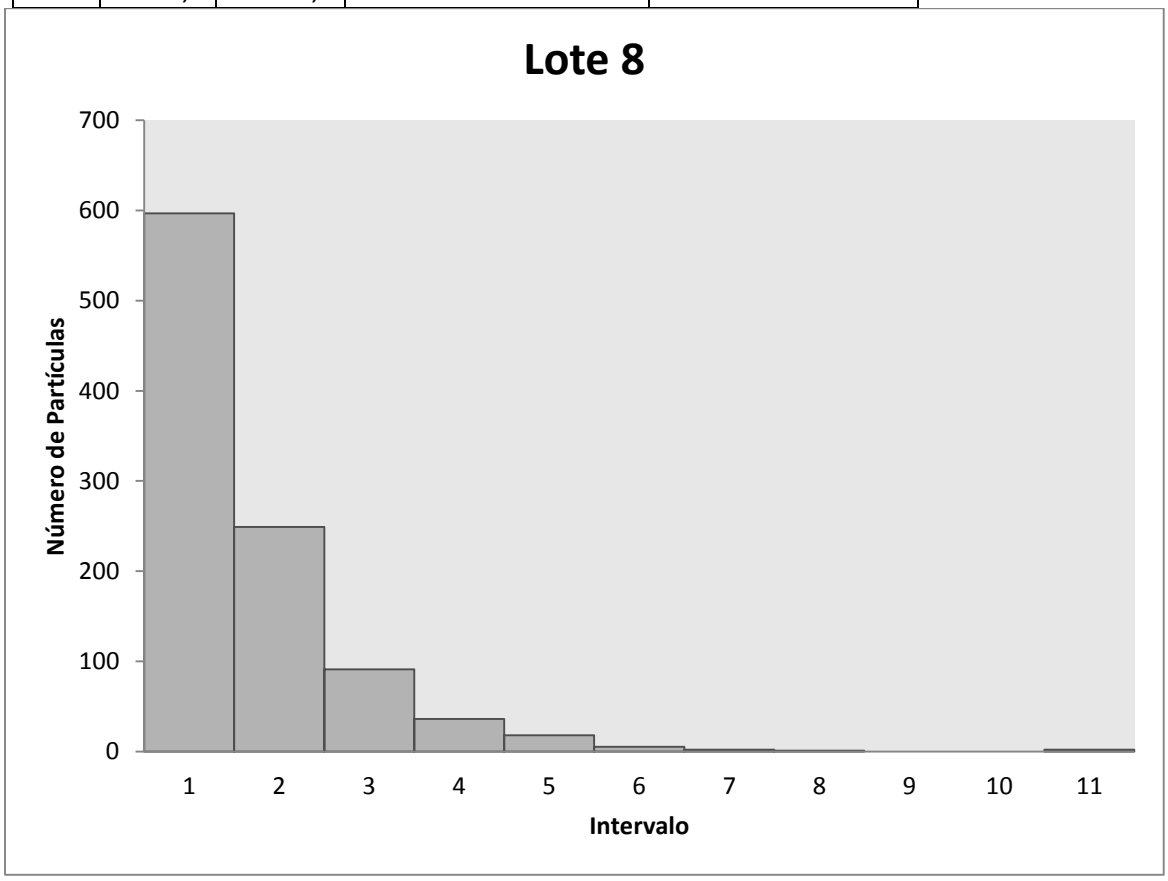
LOTE 6				
Clase	Inferior	Superior	Frecuencia Acumulada	Frecuencia absoluta
1	2,4	5,6	670	670
2	5,6	8,8	1028	358
3	8,8	12,0	1097	69
4	12,0	15,2	1139	42
5	15,2	18,4	1160	21
6	18,4	21,6	1162	2
7	21,6	24,8	1162	0
8	24,8	28,0	1168	6
9	28,0	31,2	1168	0
10	31,2	34,4	1169	1
11	34,4	37,6	1170	1



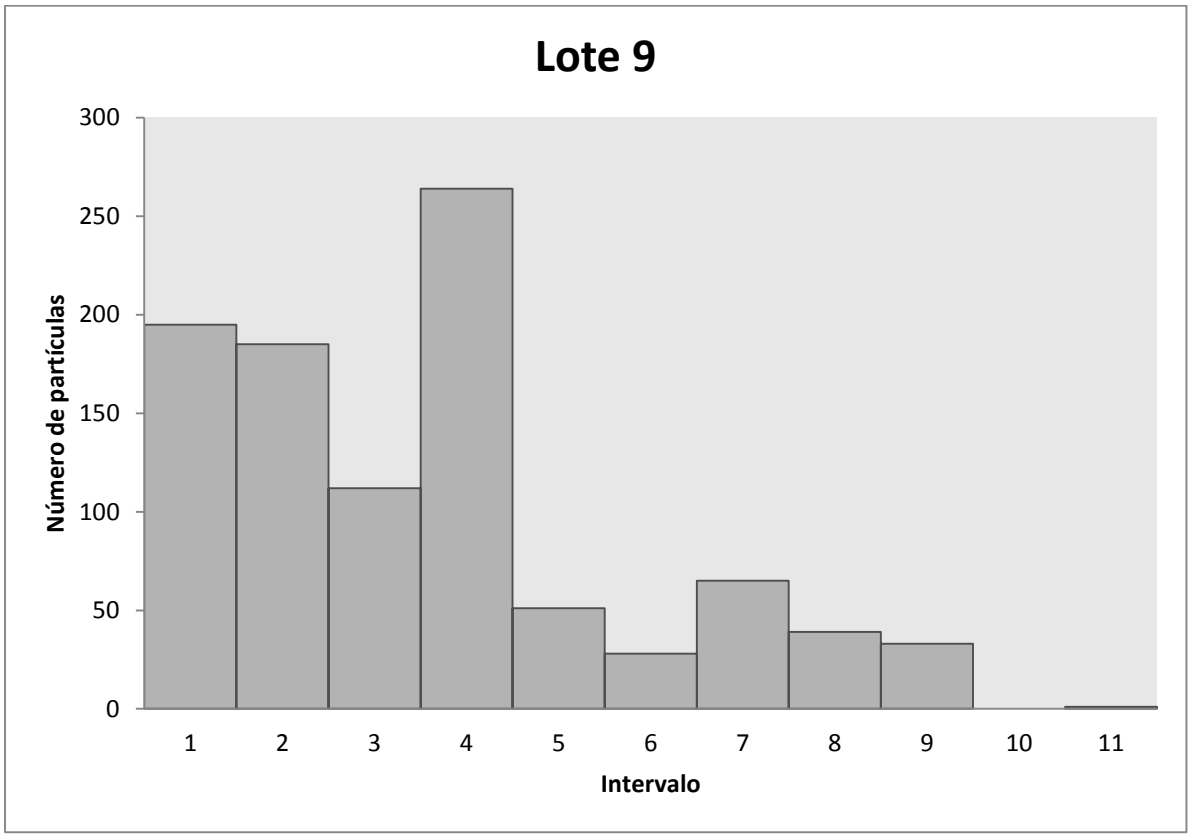
LOTE 7				
Clase	Inferior	Superior	Frecuencia Acumulada	Frecuencia absoluta
1	1,6	4,8	333	333
2	4,8	8,0	573	240
3	8,0	11,2	739	166
4	11,2	14,4	825	86
5	14,4	17,6	868	43
6	17,6	20,8	913	45
7	20,8	24,0	913	0
8	24,0	27,2	915	2
9	27,2	30,4	919	4
10	30,4	33,6	923	4
11	33,6	36,8	929	6



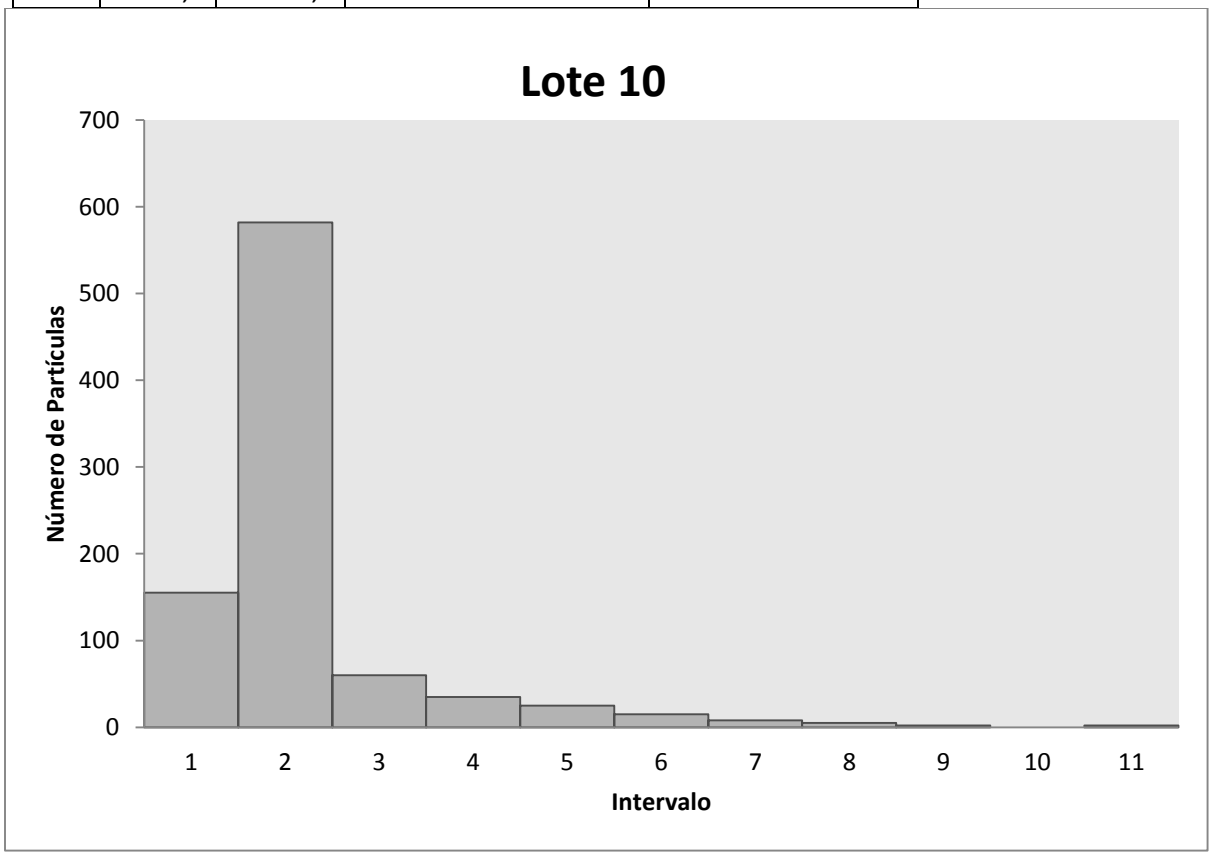
LOTE 8				
Clase	Inferior	Superior	Frecuencia Acumulada	Frecuencia absoluta
1	0,8	5,9	597	597
2	5,9	11,0	846	249
3	11,0	16,1	937	91
4	16,1	21,2	973	36
5	21,2	26,3	991	18
6	26,3	31,3	996	5
7	31,3	36,4	998	2
8	36,4	41,5	999	1
9	41,5	46,6	999	0
10	46,6	51,7	999	0
11	51,7	56,8	1001	2



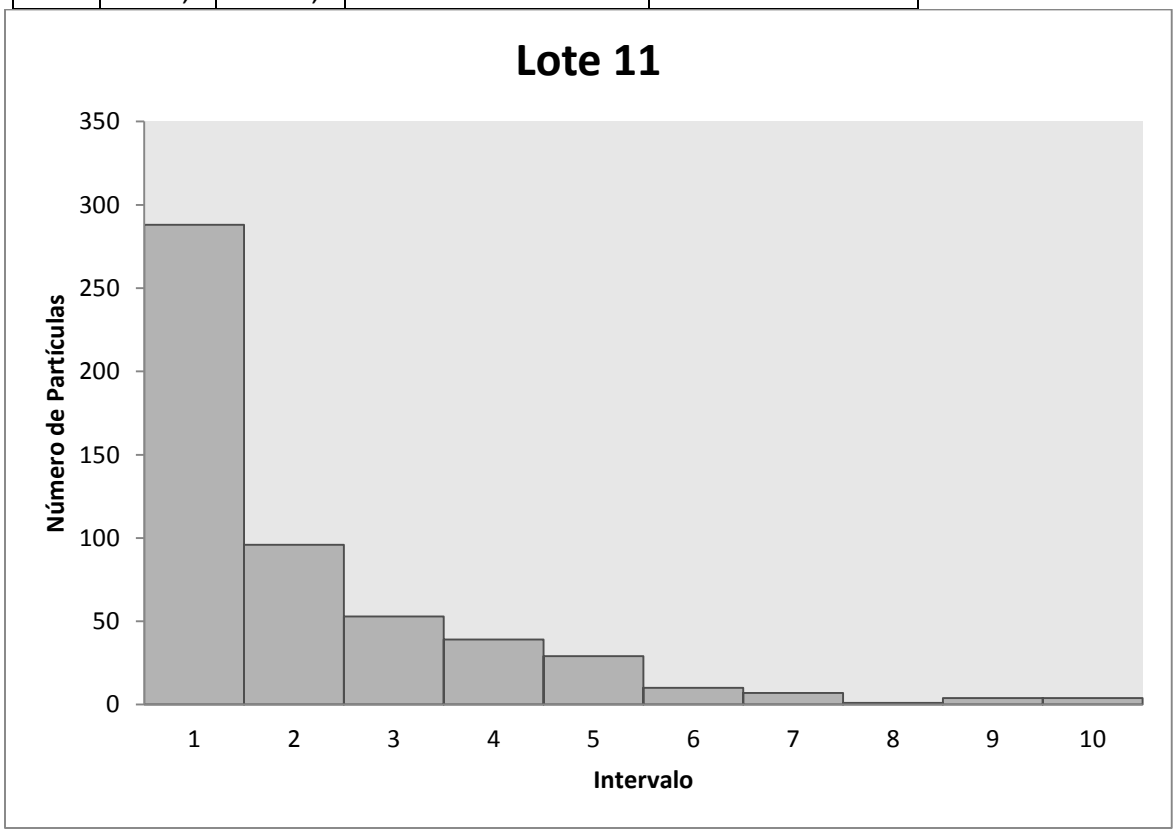
LOTE 9				
Clase	Inferior	Superior	Frecuencia Acumulada	Frecuencia absoluta
1	1,2	3,1	195	195
2	3,1	5,1	380	185
3	5,1	7,0	492	112
4	7,0	8,9	756	264
5	8,9	10,8	807	51
6	10,8	12,8	835	28
7	12,8	14,7	900	65
8	14,7	16,6	939	39
9	16,6	18,5	972	33
10	18,5	20,5	972	0
11	20,5	22,4	973	1



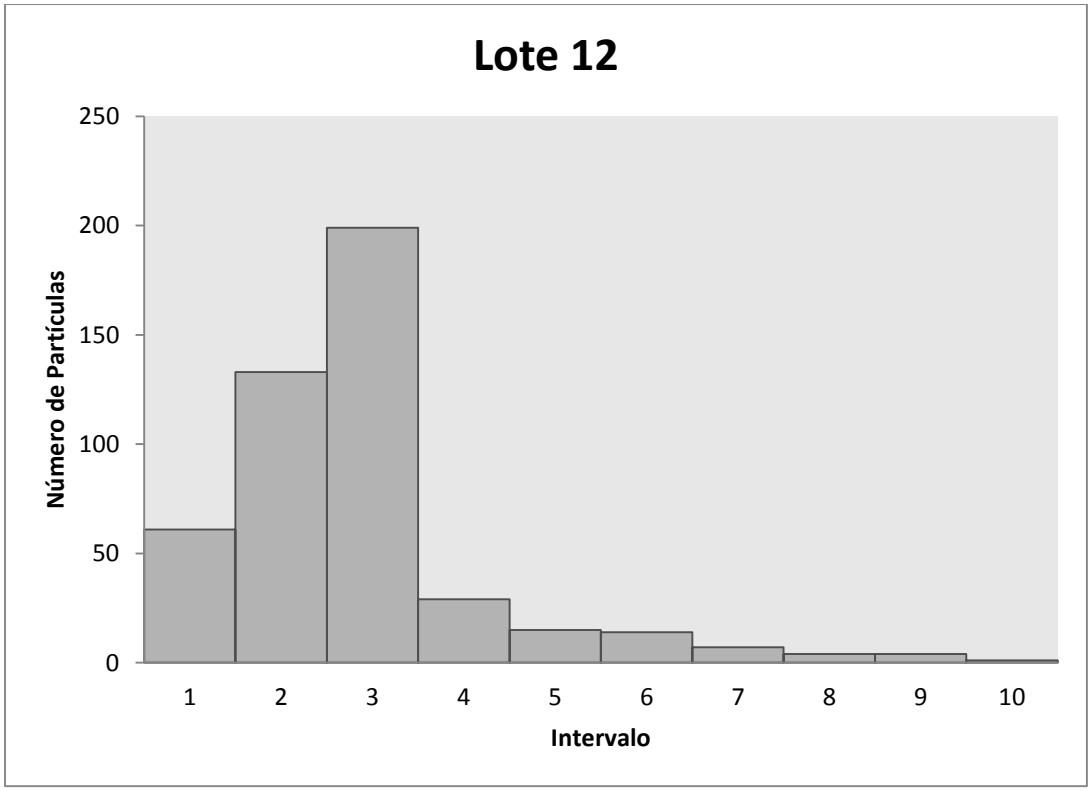
LOTE 10				
Clase	Inferior	Superior	Frecuencia Acumulada	Frecuencia absoluta
1	2,4	7,2	155	155
2	7,2	12,0	737	582
3	12,0	16,8	797	60
4	16,8	21,6	832	35
5	21,6	26,4	857	25
6	26,4	31,2	872	15
7	31,2	36,0	880	8
8	36,0	40,8	885	5
9	40,8	45,6	887	2
10	45,6	50,4	887	0
11	50,4	55,2	889	2



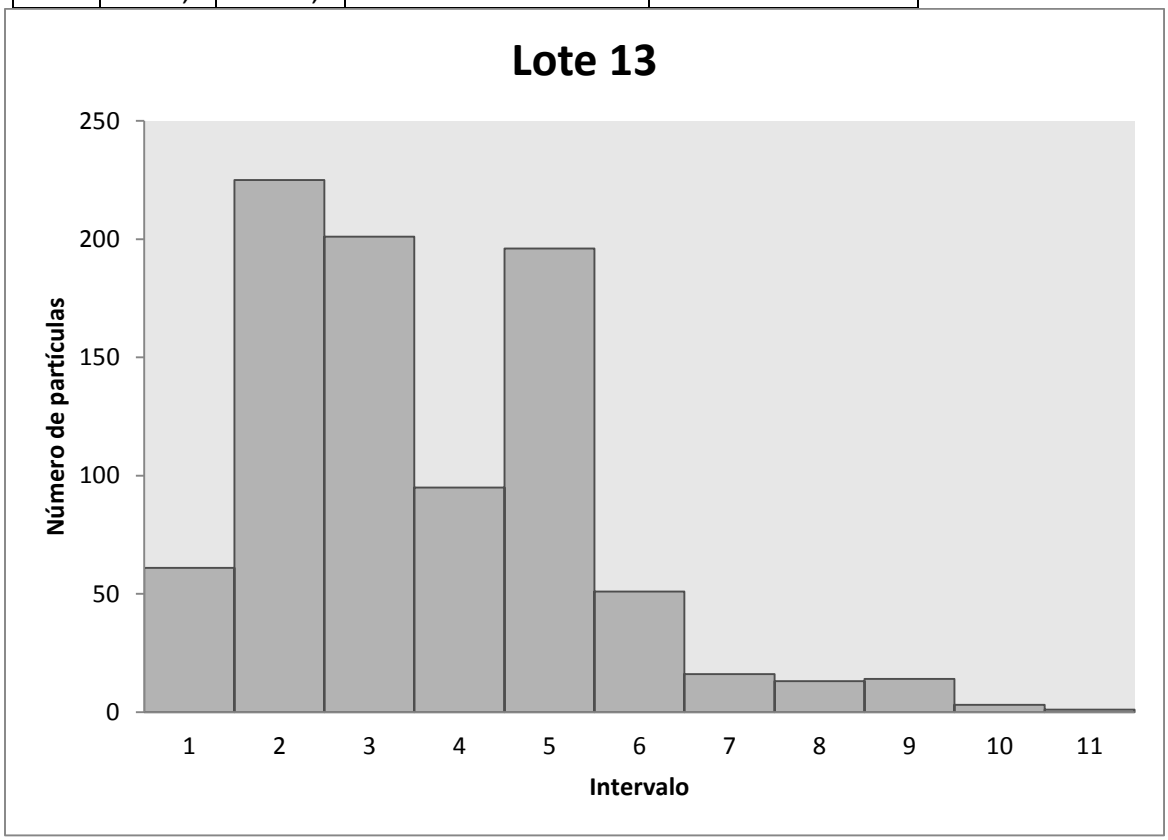
LOTE 11				
Clase	Inferior	Superior	Frecuencia Acumulada	Frecuencia absoluta
1	6,4	10,2	288	288
2	10,2	14,1	384	96
3	14,1	17,9	437	53
4	17,9	21,8	476	39
5	21,8	25,6	505	29
6	25,6	29,4	515	10
7	29,4	33,3	522	7
8	33,3	37,1	523	1
9	37,1	41,0	527	4
10	41,0	44,8	531	4



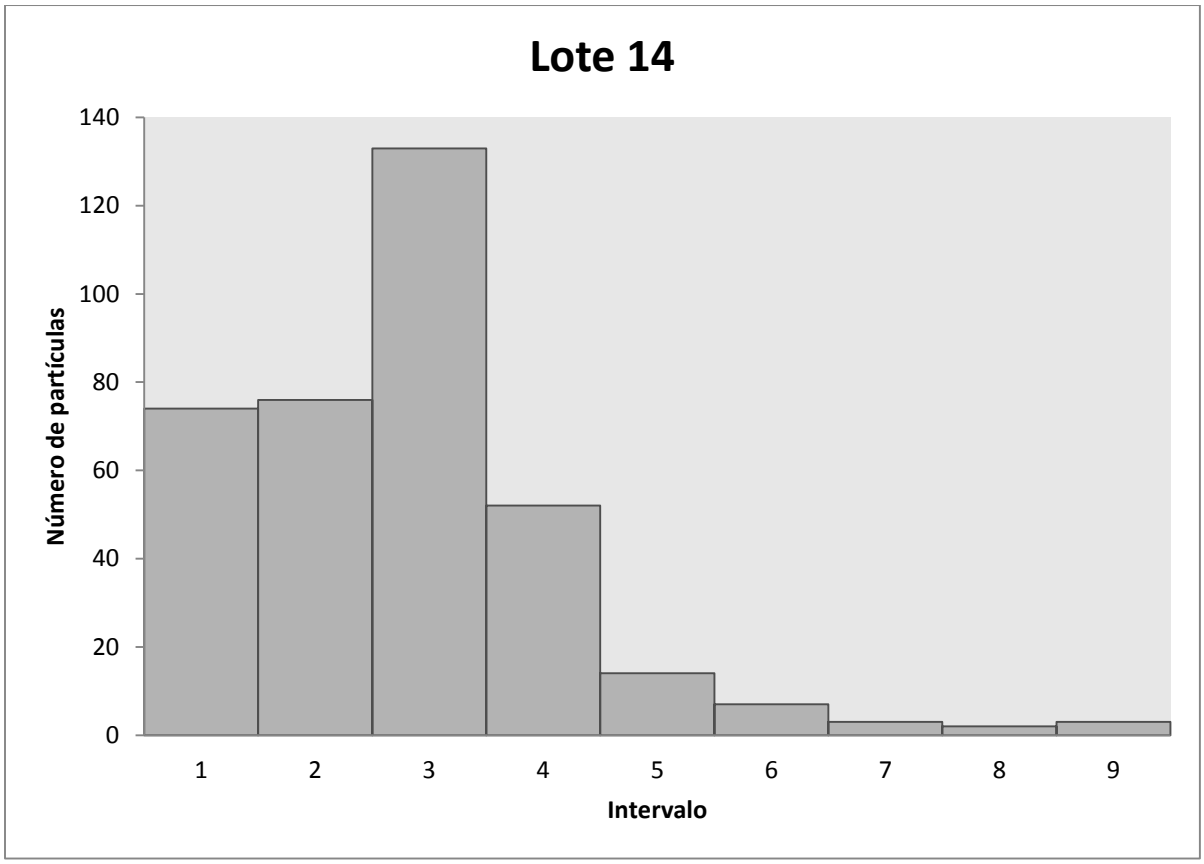
LOTE 12				
Clase	Inferior	Superior	Frecuencia Acumulada	Frecuencia absoluta
1	1,5	4,7	61	61
2	4,7	7,9	194	133
3	7,9	11,1	393	199
4	11,1	14,3	422	29
5	14,3	17,6	437	15
6	17,6	20,8	451	14
7	20,8	24,0	458	7
8	24,0	27,2	462	4
9	27,2	30,4	466	4
10	30,4	33,6	467	1



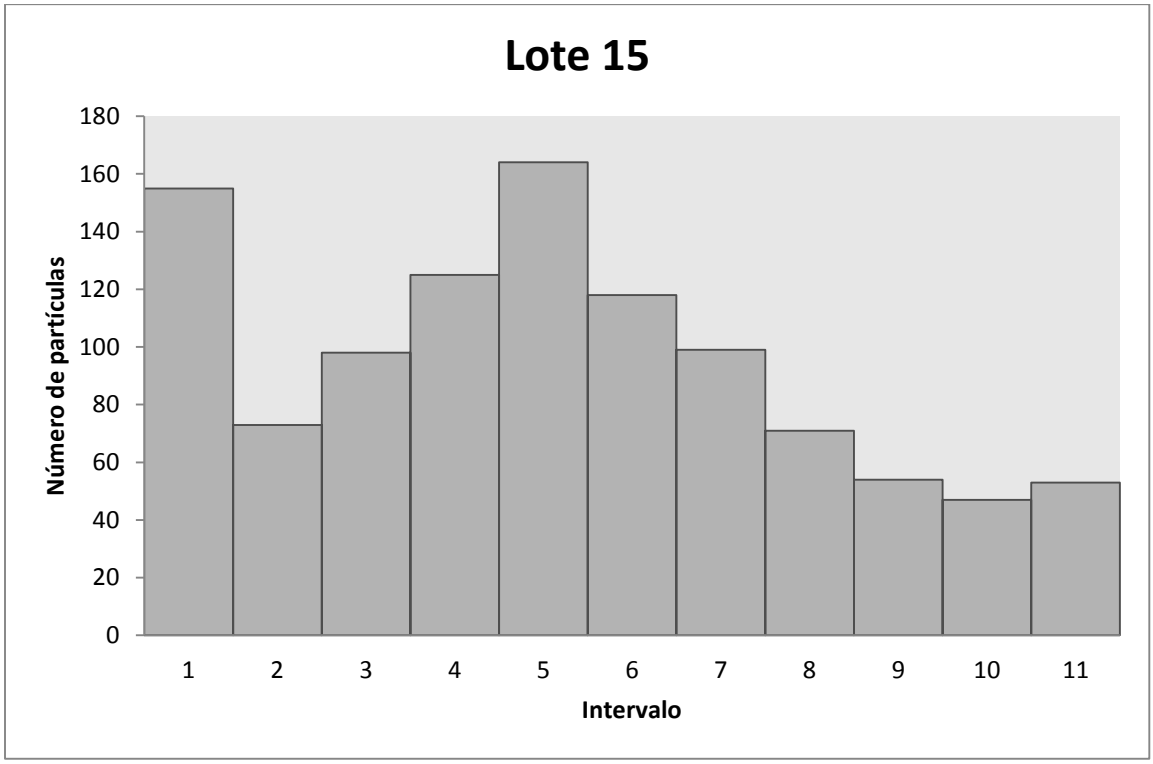
LOTE 13				
Clase	Inferior	Superior	Frecuencia Acumulada	Frecuencia absoluta
1	1,6	3,0	61	61
2	3,0	4,4	286	225
3	4,4	5,7	487	201
4	5,7	7,1	582	95
5	7,1	8,5	778	196
6	8,5	9,9	829	51
7	9,9	11,3	845	16
8	11,3	12,7	858	13
9	12,7	14,0	872	14
10	14,0	15,4	875	3
11	15,4	16,8	876	1



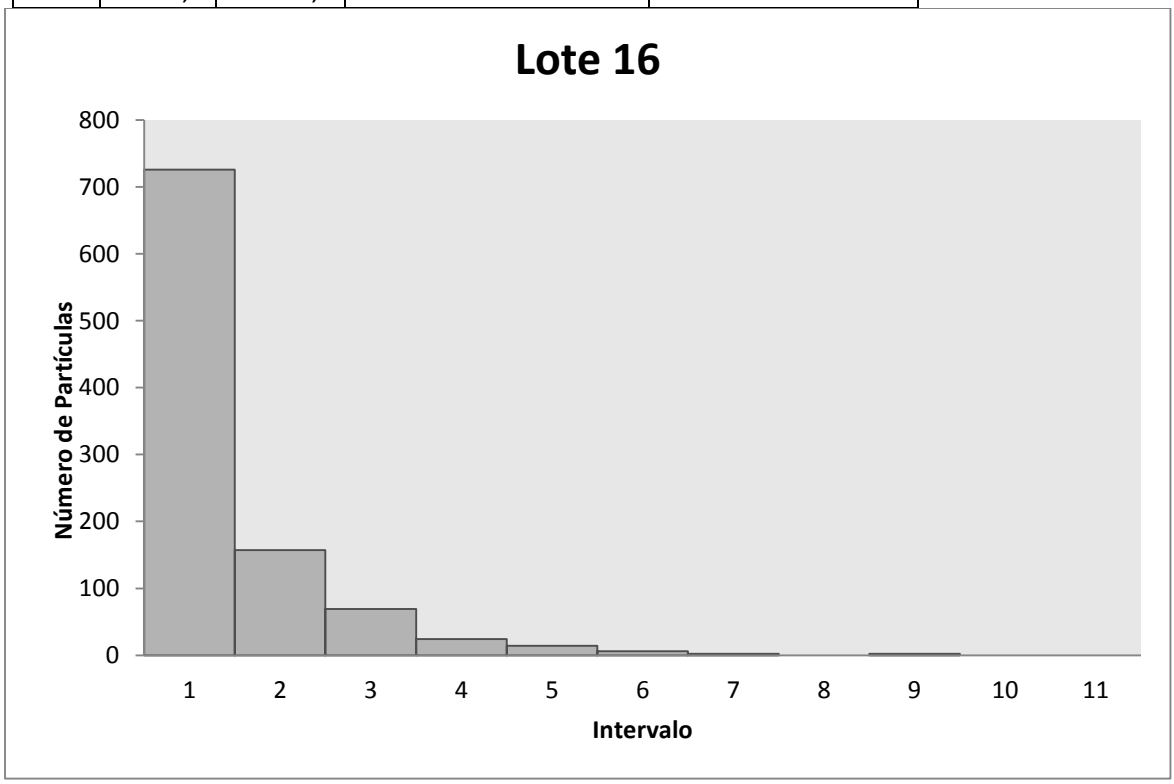
LOTE 14				
Clase	Inferior	Superior	Frecuencia Acumulada	Frecuencia absoluta
1	4,0	9,0	74	74
2	9,0	14,0	150	76
3	14,0	18,9	283	133
4	18,9	23,9	335	52
5	23,9	28,9	349	14
6	28,9	33,9	356	7
7	33,9	38,8	359	3
8	38,8	43,8	361	2
9	43,8	48,8	364	3



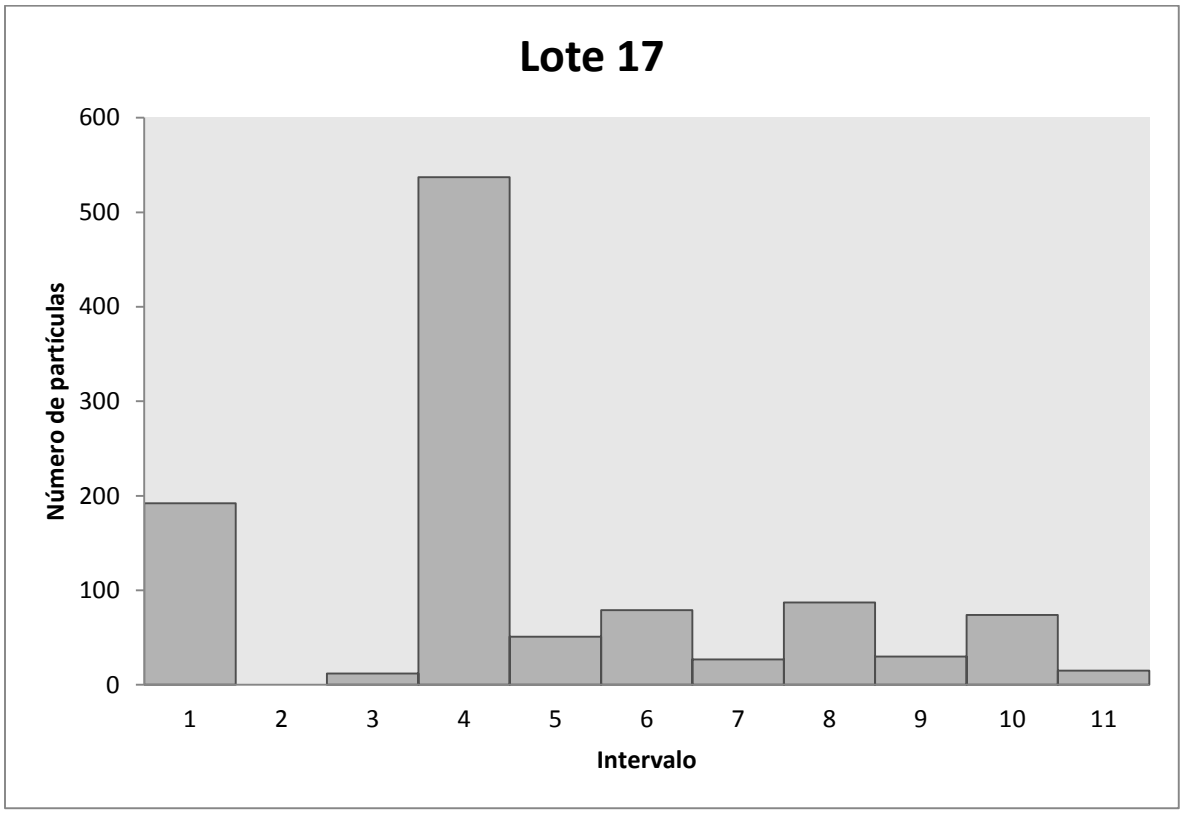
LOTE 15				
Clase	Inferior	Superior	Frecuencia Acumulada	Frecuencia absoluta
1	1,6	2,5	155	155
2	2,5	3,3	228	73
3	3,3	4,2	326	98
4	4,2	5,1	451	125
5	5,1	6,0	615	164
6	6,0	6,8	733	118
7	6,8	7,7	832	99
8	7,7	8,6	903	71
9	8,6	9,5	957	54
10	9,5	10,3	1004	47
11	10,3	11,2	1057	53



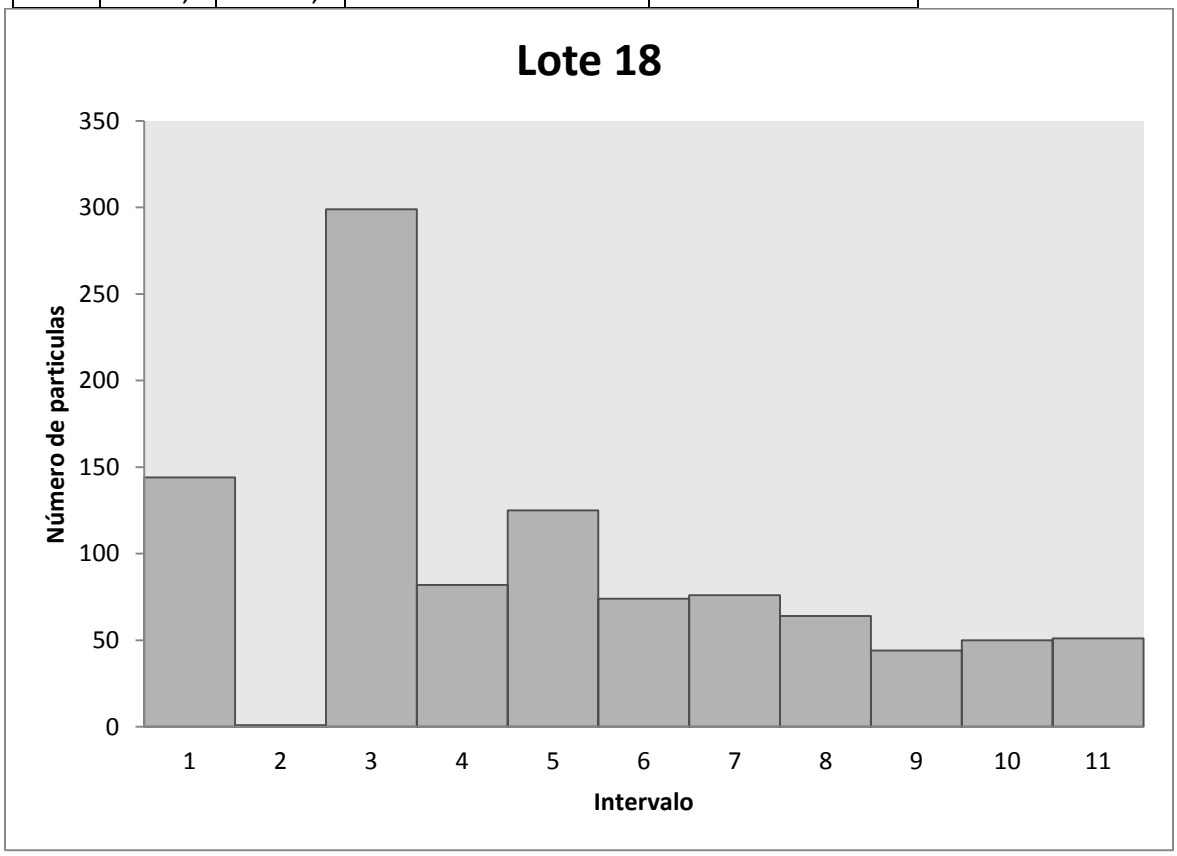
LOTE 16				
Clase	Inferior	Superior	Frecuencia Acumulada	Frecuencia absoluta
1	8,0	12,8	726	726
2	12,8	17,6	883	157
3	17,6	22,4	952	69
4	22,4	27,2	976	24
5	27,2	32,0	990	14
6	32,0	36,8	996	6
7	36,8	41,6	998	2
8	41,6	46,4	998	0
9	46,4	51,2	1000	2
10	51,2	56,0	1000	0
11	56,0	60,8	1000	0



LOTE 17				
Clase	Inferior	Superior	Frecuencia Acumulada	Frecuencia absoluta
1	3,4	5,1	192	192
2	5,1	6,8	192	0
3	6,8	8,5	204	12
4	8,5	10,2	741	537
5	10,2	11,9	792	51
6	11,9	13,7	871	79
7	13,7	15,4	898	27
8	15,4	17,1	985	87
9	17,1	18,8	1015	30
10	18,8	20,5	1089	74
11	20,5	22,2	1104	15



LOTE 18				
Clase	Inferior	Superior	Frecuencia Acumulada	Frecuencia absoluta
1	2,4	4,8	144	144
2	4,8	7,2	145	1
3	7,2	9,7	444	299
4	9,7	12,1	526	82
5	12,1	14,5	651	125
6	14,5	16,9	725	74
7	16,9	19,3	801	76
8	19,3	21,7	865	64
9	21,7	24,2	909	44
10	24,2	26,6	959	50
11	26,6	29,0	1010	51



ANÁLISIS DE COMPARACIONES MÚLTIPLES TAMAÑO DE PARTÍCULA 1 A 18

Número de Familias	1
Numero de comparaciones por familia	153

Test de comparaciones multiples de Tuckey	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significante	Nivel	
1 vs. 2	0,0	-0,6820 to 0,6820	No	ns	A-B
1 vs. 3	1,560	0,8733 to 2,247	Si	****	A-C
1 vs. 4	-0,7100	-1,426 to 0,006181	No	ns	A-D
1 vs. 5	1,620	0,8960 to 2,344	Si	****	A-E
1 vs. 6	-0,5000	-1,170 to 0,1700	No	ns	A-F
1 vs. 7	-1,810	-2,518 to -1,102	Si	****	A-G
1 vs. 8	-1,230	-1,925 to -0,5348	Si	****	A-H
1 vs. 9	-0,9200	-1,620 to -0,2199	Si	***	A-I
1 vs. 10	-3,990	-4,706 to -3,274	Si	****	A-J
1 vs. 11	-6,340	-7,173 to -5,507	Si	****	A-K
1 vs. 12	-2,190	-3,059 to -1,321	Si	****	A-L
1 vs. 13	0,2600	-0,4592 to 0,9792	No	ns	A-M
1 vs. 14	-9,300	-10,25 to -8,352	Si	****	A-N
1 vs. 15	0,5600	-0,1259 to 1,246	No	ns	A-O
1 vs. 16	-5,530	-6,225 to -4,835	Si	****	A-P
1 vs. 17	-4,020	-4,699 to -3,341	Si	****	A-Q
1 vs. 18	-6,920	-7,614 to -6,226	Si	****	A-R
2 vs. 3	1,560	0,8927 to 2,227	Si	****	B-C
2 vs. 4	-0,7100	-1,408 to -0,01242	Si	*	B-D
2 vs. 5	1,620	0,9144 to 2,326	Si	****	B-E
2 vs. 6	-0,5000	-1,150 to 0,1501	No	ns	B-F
2 vs. 7	-1,810	-2,499 to -1,121	Si	****	B-G
2 vs. 8	-1,230	-1,906 to -0,5540	Si	****	B-H
2 vs. 9	-0,9200	-1,601 to -0,2390	Si	***	B-I
2 vs. 10	-3,990	-4,688 to -3,292	Si	****	B-J
2 vs. 11	-6,340	-7,157 to -5,523	Si	****	B-K
2 vs. 12	-2,190	-3,044 to -1,336	Si	****	B-L
2 vs. 13	0,2600	-0,4406 to 0,9606	No	ns	B-M
2 vs. 14	-9,300	-10,23 to -8,366	Si	****	B-N
2 vs. 15	0,5600	-0,1065 to 1,226	No	ns	B-O
2 vs. 16	-5,530	-6,206 to -4,854	Si	****	B-P
2 vs. 17	-4,020	-4,679 to -3,361	Si	****	B-Q
2 vs. 18	-6,920	-7,594 to -6,246	Si	****	B-R
3 vs. 4	-2,270	-2,972 to -1,568	Si	****	C-D
3 vs. 5	0,06000	-0,6502 to 0,7702	No	ns	C-E
3 vs. 6	-2,060	-2,715 to -1,405	Si	****	C-F
3 vs. 7	-3,370	-4,064 to -2,676	Si	****	C-G
3 vs. 8	-2,790	-3,471 to -2,109	Si	****	C-H
3 vs. 9	-2,480	-3,166 to -1,794	Si	****	C-I
3 vs. 10	-5,550	-6,252 to -4,848	Si	****	C-J
3 vs. 11	-7,900	-8,721 to -7,079	Si	****	C-K
3 vs. 12	-3,750	-4,607 to -2,893	Si	****	C-L
3 vs. 13	-1,300	-2,005 to -0,5948	Si	****	C-M
3 vs. 14	-10,86	-11,80 to -9,922	Si	****	C-N
3 vs. 15	-1,000	-1,671 to -0,3287	Si	****	C-O
3 vs. 16	-7,090	-7,771 to -6,409	Si	****	C-P
3 vs. 17	-5,580	-6,244 to -4,916	Si	****	C-Q
3 vs. 18	-8,480	-9,159 to -7,801	Si	****	C-R
4 vs. 5	2,330	1,591 to 3,069	Si	****	D-E
4 vs. 6	0,2100	-0,4759 to 0,8959	No	ns	D-F
4 vs. 7	-1,100	-1,823 to -0,3767	Si	****	D-G
4 vs. 8	-0,5200	-1,231 to 0,1905	No	ns	D-H
4 vs. 9	-0,2100	-0,9253 to 0,5053	No	ns	D-I
4 vs. 10	-3,280	-4,011 to -2,549	Si	****	D-J

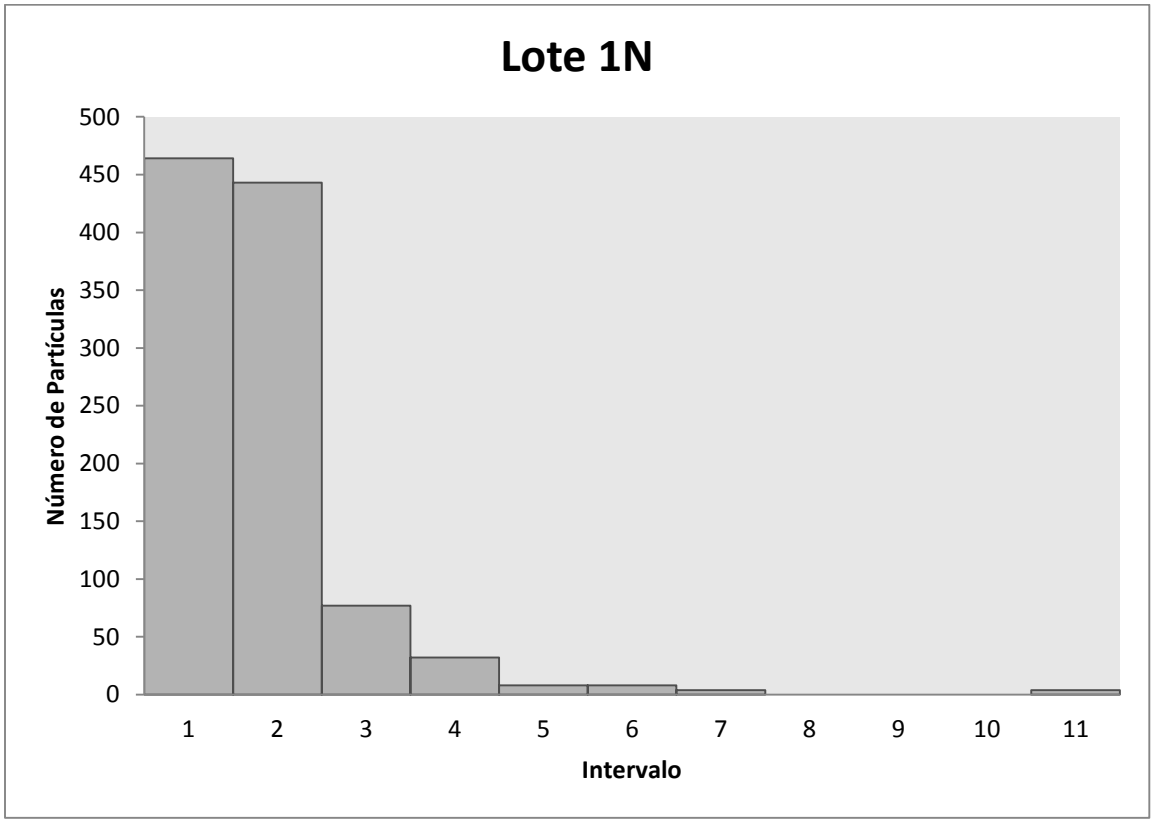
4 vs. 11	-5,630	-6,476 to -4,784	Si	****	D-K
4 vs. 12	-1,480	-2,361 to -0,5988	Si	****	D-L
4 vs. 13	0,9700	0,2360 to 1,704	Si	***	D-M
4 vs. 14	-8,590	-9,549 to -7,631	Si	****	D-N
4 vs. 15	1,270	0,5686 to 1,971	Si	****	D-O
4 vs. 16	-4,820	-5,530 to -4,110	Si	****	D-P
4 vs. 17	-3,310	-4,005 to -2,615	Si	****	D-Q
4 vs. 18	-6,210	-6,919 to -5,501	Si	****	D-R
5 vs. 6	-2,120	-2,814 to -1,426	Si	****	E-F
5 vs. 7	-3,430	-4,161 to -2,699	Si	****	E-G
5 vs. 8	-2,850	-3,568 to -2,132	Si	****	E-H
5 vs. 9	-2,540	-3,263 to -1,817	Si	****	E-I
5 vs. 10	-5,610	-6,349 to -4,871	Si	****	E-J
5 vs. 11	-7,960	-8,812 to -7,108	Si	****	E-K
5 vs. 12	-3,810	-4,698 to -2,922	Si	****	E-L
5 vs. 13	-1,360	-2,102 to -0,6184	Si	****	E-M
5 vs. 14	-10,92	-11,89 to -9,955	Si	****	E-N
5 vs. 15	-1,060	-1,769 to -0,3506	Si	****	E-O
5 vs. 16	-7,150	-7,868 to -6,432	Si	****	E-P
5 vs. 17	-5,640	-6,343 to -4,937	Si	****	E-Q
5 vs. 18	-8,540	-9,257 to -7,823	Si	****	E-R
6 vs. 7	-1,310	-1,988 to -0,6323	Si	****	F-G
6 vs. 8	-0,7300	-1,394 to -0,06602	Si	*	F-H
6 vs. 9	-0,4200	-1,089 to 0,2491	No	ns	F-I
6 vs. 10	-3,490	-4,176 to -2,804	Si	****	F-J
6 vs. 11	-5,840	-6,647 to -5,033	Si	****	F-K
6 vs. 12	-1,690	-2,534 to -0,8459	Si	****	F-L
6 vs. 13	0,7600	0,07097 to 1,449	Si	*	F-M
6 vs. 14	-8,800	-9,726 to -7,874	Si	****	F-N
6 vs. 15	1,060	0,4057 to 1,714	Si	****	F-O
6 vs. 16	-5,030	-5,694 to -4,366	Si	****	F-P
6 vs. 17	-3,520	-4,167 to -2,873	Si	****	F-Q
6 vs. 18	-6,420	-7,082 to -5,758	Si	****	F-R
7 vs. 8	0,5800	-0,1226 to 1,283	No	ns	G-H
7 vs. 9	0,8900	0,1826 to 1,597	Si	**	G-I
7 vs. 10	-2,180	-2,904 to -1,456	Si	****	G-J
7 vs. 11	-4,530	-5,369 to -3,691	Si	****	G-K
7 vs. 12	-0,3800	-1,255 to 0,4948	No	ns	G-L
7 vs. 13	2,070	1,344 to 2,796	Si	****	G-M
7 vs. 14	-7,490	-8,444 to -6,536	Si	****	G-N
7 vs. 15	2,370	1,677 to 3,063	Si	****	G-O
7 vs. 16	-3,720	-4,422 to -3,018	Si	****	G-P
7 vs. 17	-2,210	-2,897 to -1,523	Si	****	G-Q
7 vs. 18	-5,110	-5,811 to -4,409	Si	****	G-R
8 vs. 9	0,3100	-0,3843 to 1,004	No	ns	H-I
8 vs. 10	-2,760	-3,471 to -2,049	Si	****	H-J
8 vs. 11	-5,110	-5,938 to -4,282	Si	****	H-K
8 vs. 12	-0,9600	-1,824 to -0,09579	Si	*	H-L
8 vs. 13	1,490	0,7765 to 2,204	Si	****	H-M
8 vs. 14	-8,070	-9,014 to -7,126	Si	****	H-N
8 vs. 15	1,790	1,110 to 2,470	Si	****	H-O
8 vs. 16	-4,300	-4,989 to -3,611	Si	****	H-P
8 vs. 17	-2,790	-3,463 to -2,117	Si	****	H-Q
8 vs. 18	-5,690	-6,378 to -5,002	Si	****	H-R
9 vs. 10	-3,070	-3,786 to -2,354	Si	****	I-J
9 vs. 11	-5,420	-6,252 to -4,588	Si	****	I-K
9 vs. 12	-1,270	-2,138 to -0,4018	Si	****	I-L

9 vs. 13	1,180	0,4617 to 1,898	Si	****	I-M
9 vs. 14	-8,380	-9,328 to -7,432	Si	****	I-N
9 vs. 15	1,480	0,7950 to 2,165	Si	****	I-O
9 vs. 16	-4,610	-5,304 to -3,916	Si	****	I-P
9 vs. 17	-3,100	-3,778 to -2,422	Si	****	I-Q
9 vs. 18	-6,000	-6,693 to -5,307	Si	****	I-R
10 vs. 11	-2,350	-3,196 to -1,504	Si	****	J-K
10 vs. 12	1,800	0,9186 to 2,681	Si	****	J-L
10 vs. 13	4,250	3,516 to 4,984	Si	****	J-M
10 vs. 14	-5,310	-6,270 to -4,350	Si	****	J-N
10 vs. 15	4,550	3,848 to 5,252	Si	****	J-O
10 vs. 16	-1,540	-2,251 to -0,8295	Si	****	J-P
10 vs. 17	-0,03000	-0,7249 to 0,6649	No	ns	J-Q
10 vs. 18	-2,930	-3,639 to -2,221	Si	****	J-R
11 vs. 12	4,150	3,172 to 5,128	Si	****	K-L
11 vs. 13	6,600	5,752 to 7,448	Si	****	K-M
11 vs. 14	-2,960	-4,009 to -1,911	Si	****	K-N
11 vs. 15	6,900	6,080 to 7,720	Si	****	K-O
11 vs. 16	0,8100	-0,01779 to 1,638	No	ns	K-P
11 vs. 17	2,320	1,506 to 3,134	Si	****	K-Q
11 vs. 18	-0,5800	-1,407 to 0,2467	No	ns	K-R
12 vs. 13	2,450	1,566 to 3,334	Si	****	L-M
12 vs. 14	-7,110	-8,188 to -6,032	Si	****	L-N
12 vs. 15	2,750	1,893 to 3,607	Si	****	L-O
12 vs. 16	-3,340	-4,204 to -2,476	Si	****	L-P
12 vs. 17	-1,830	-2,681 to -0,9787	Si	****	L-Q
12 vs. 18	-4,730	-5,593 to -3,867	Si	****	L-R
13 vs. 14	-9,560	-10,52 to -8,598	Si	****	M-N
13 vs. 15	0,3000	-0,4045 to 1,004	No	ns	M-O
13 vs. 16	-5,790	-6,503 to -5,077	Si	****	M-P
13 vs. 17	-4,280	-4,978 to -3,582	Si	****	M-Q
13 vs. 18	-7,180	-7,892 to -6,468	Si	****	M-R
14 vs. 15	9,860	8,923 to 10,80	Si	****	N-O
14 vs. 16	3,770	2,826 to 4,714	Si	****	N-P
14 vs. 17	5,280	4,348 to 6,212	Si	****	N-Q
14 vs. 18	2,380	1,437 to 3,323	Si	****	N-R
15 vs. 16	-6,090	-6,770 to -5,410	Si	****	O-P
15 vs. 17	-4,580	-5,243 to -3,917	Si	****	O-Q
15 vs. 18	-7,480	-8,158 to -6,802	Si	****	O-R
16 vs. 17	1,510	0,8371 to 2,183	Si	****	P-Q
16 vs. 18	-1,390	-2,078 to -0,7024	Si	****	P-R
17 vs. 18	-2,900	-3,571 to -2,229	Si	****	Q-R

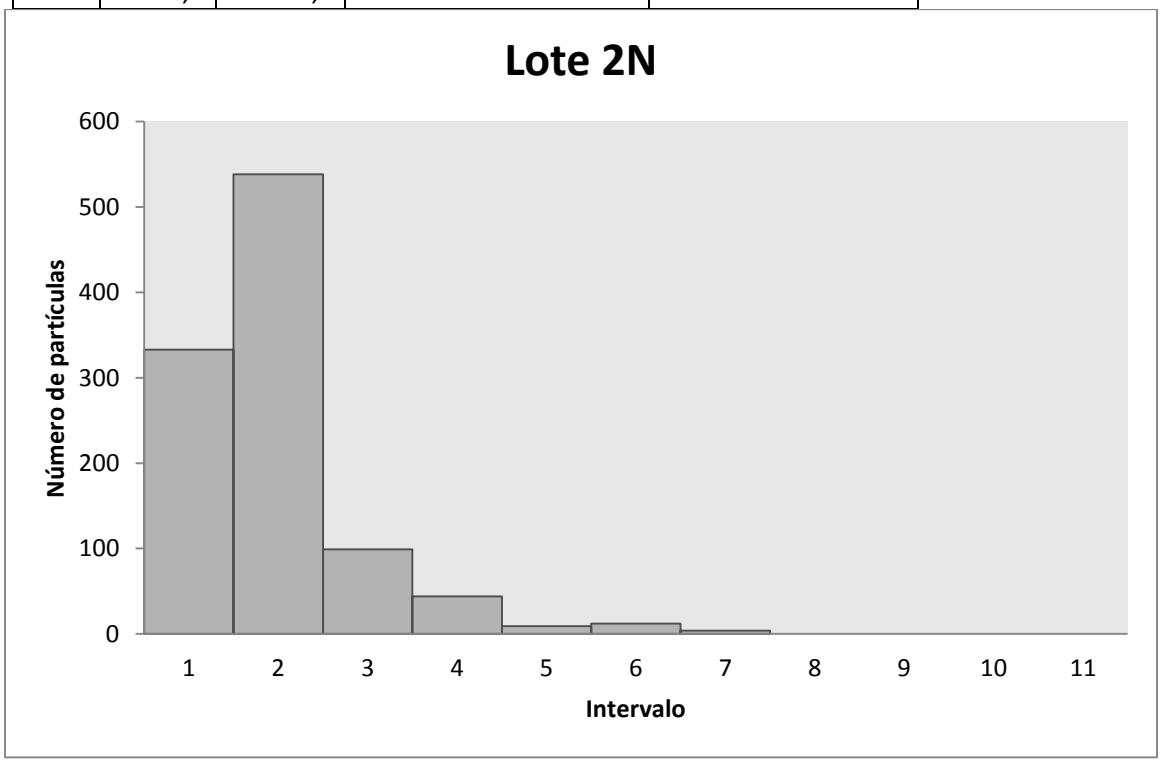
Comparaciones no siginificativas (N=No significativa)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1		N		N		N							N		N			
2						N							N		N			
3					N													
4						N		N										
5																		
6									N									
7								N				N						
8									N									
9																		
10																		
11																N		N
12																		
13															N			
14																		
15																		
16																		
17																		
18																		

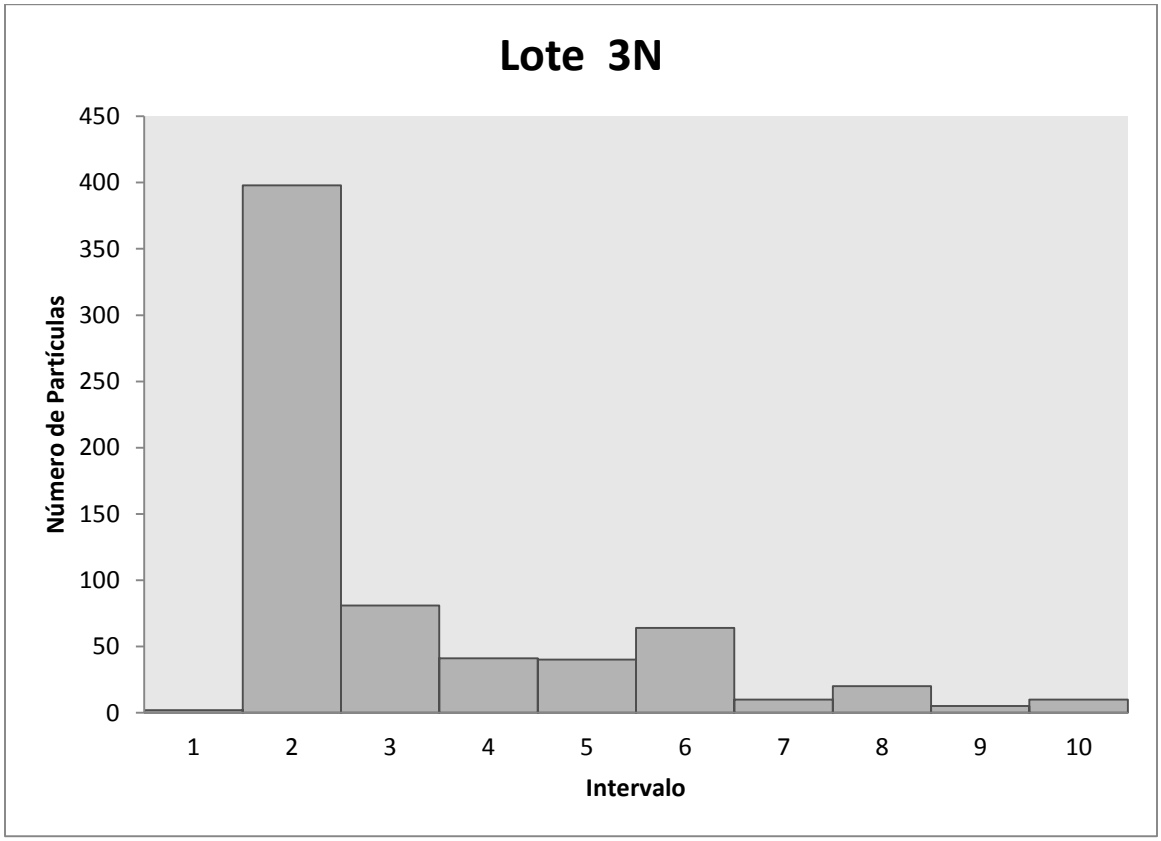
LOTE 1N				
Clase	Inferior	Superior	Frecuencia Acumulada	Frecuencia absoluta
1	1,6	6,0	464	464
2	6,0	10,5	907	443
3	10,5	14,9	984	77
4	14,9	19,3	1016	32
5	19,3	23,8	1024	8
6	23,8	28,2	1032	8
7	28,2	32,7	1036	4
8	32,7	37,1	1036	0
9	37,1	41,5	1036	0
10	41,5	46,0	1036	0
11	46,0	50,4	1040	4



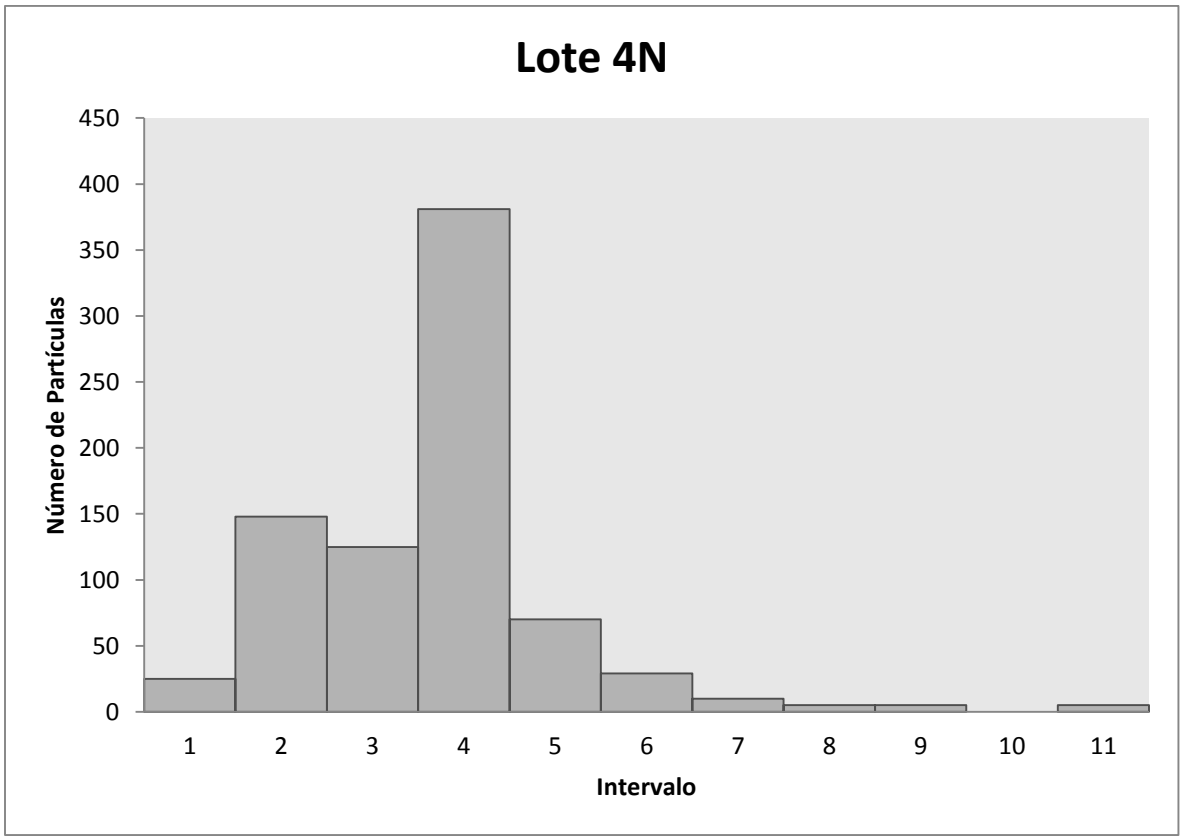
LOTE 2N				
Clase	Inferior	Superior	Frecuencia Acumulada	Frecuencia absoluta
1	0,2	4,8	333	333
2	4,8	9,3	871	538
3	9,3	13,9	970	99
4	13,9	18,5	1014	44
5	18,5	23,0	1023	9
6	23,0	27,6	1035	12
7	27,6	32,1	1039	4
8	32,1	36,7	1039	0
9	36,7	41,3	1039	0
10	41,3	45,8	1039	0
11	45,8	50,4	1039	0



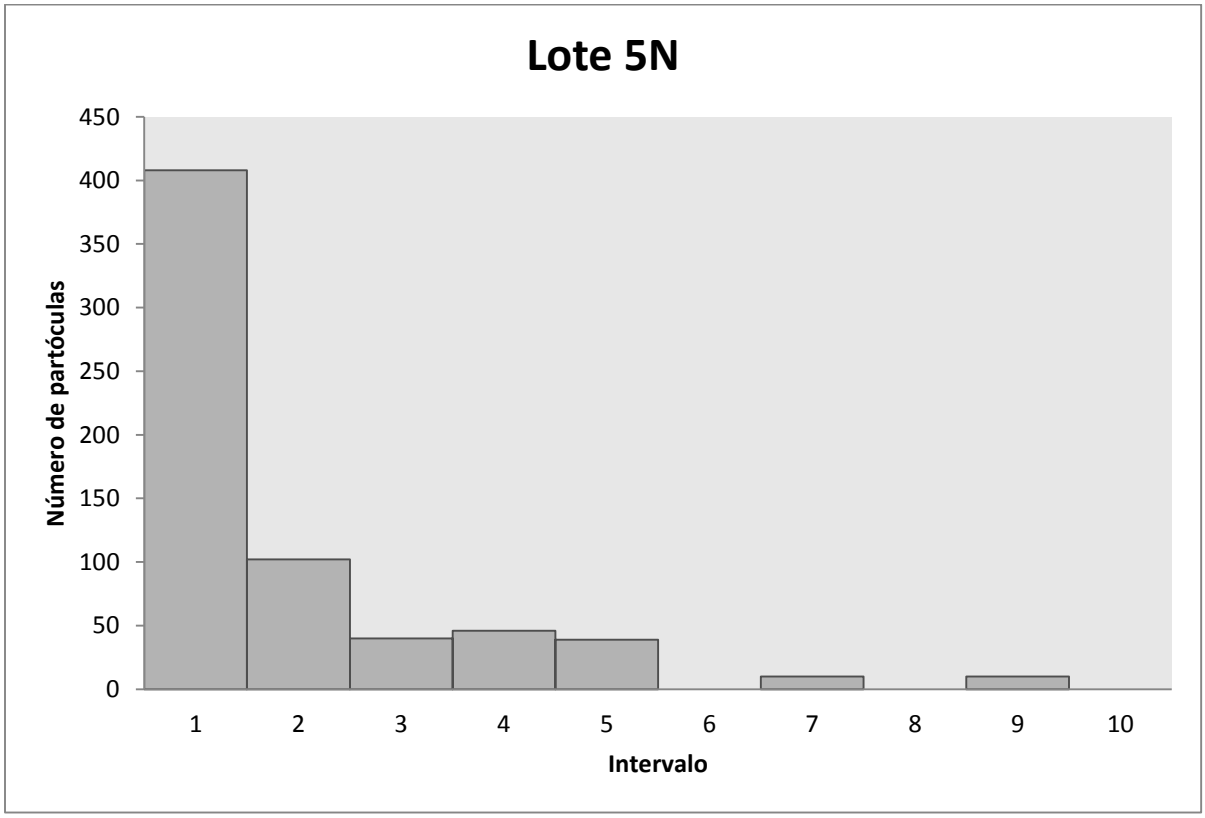
LOTE 3N				
Clase	Inferior	Superior	Frecuencia Acumulada	Frecuencia absoluta
1	3,2	6,3	2	2
2	6,3	9,4	400	398
3	9,4	12,6	481	81
4	12,6	15,7	522	41
5	15,7	18,8	562	40
6	18,8	21,9	626	64
7	21,9	25,0	636	10
8	25,0	28,2	656	20
9	28,2	31,3	661	5
10	31,3	34,4	671	10



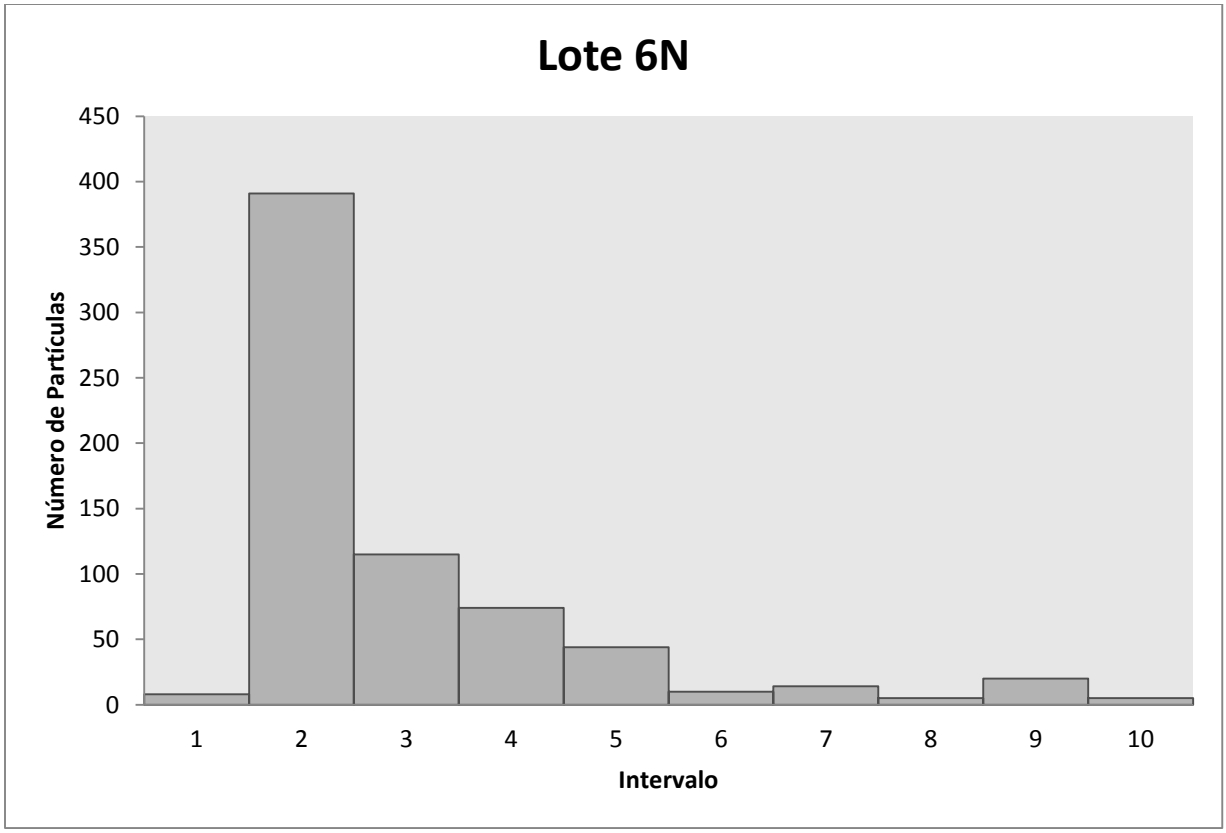
LOTE 4N				
Clase	Inferior	Superior	Frecuencia Acumulada	Frecuencia absoluta
1	0,4	2,9	25	25
2	2,9	5,4	173	148
3	5,4	7,9	298	125
4	7,9	10,4	679	381
5	10,4	12,9	749	70
6	12,9	15,5	778	29
7	15,5	18,0	788	10
8	18,0	20,5	793	5
9	20,5	23,0	798	5
10	23,0	25,5	798	0
11	25,5	28,0	803	5



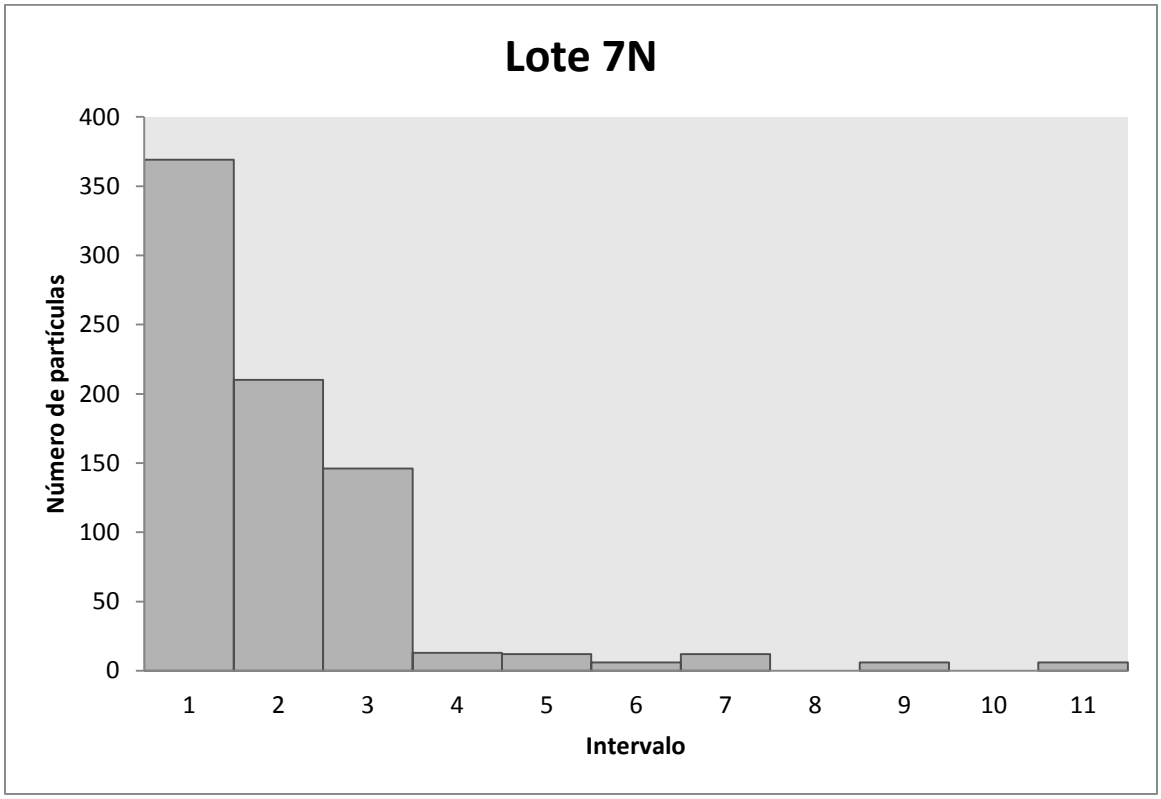
LOTE 5N				
Clase	Inferior	Superior	Frecuencia Acumulada	Frecuencia absoluta
1	8,0	12,4	408	408
2	12,4	16,8	510	102
3	16,8	21,2	550	40
4	21,2	25,6	596	46
5	25,6	30,0	635	39
6	30,0	34,4	635	0
7	34,4	38,8	645	10
8	38,8	43,2	645	0
9	43,2	47,6	655	10
10	47,6	52,0	655	0



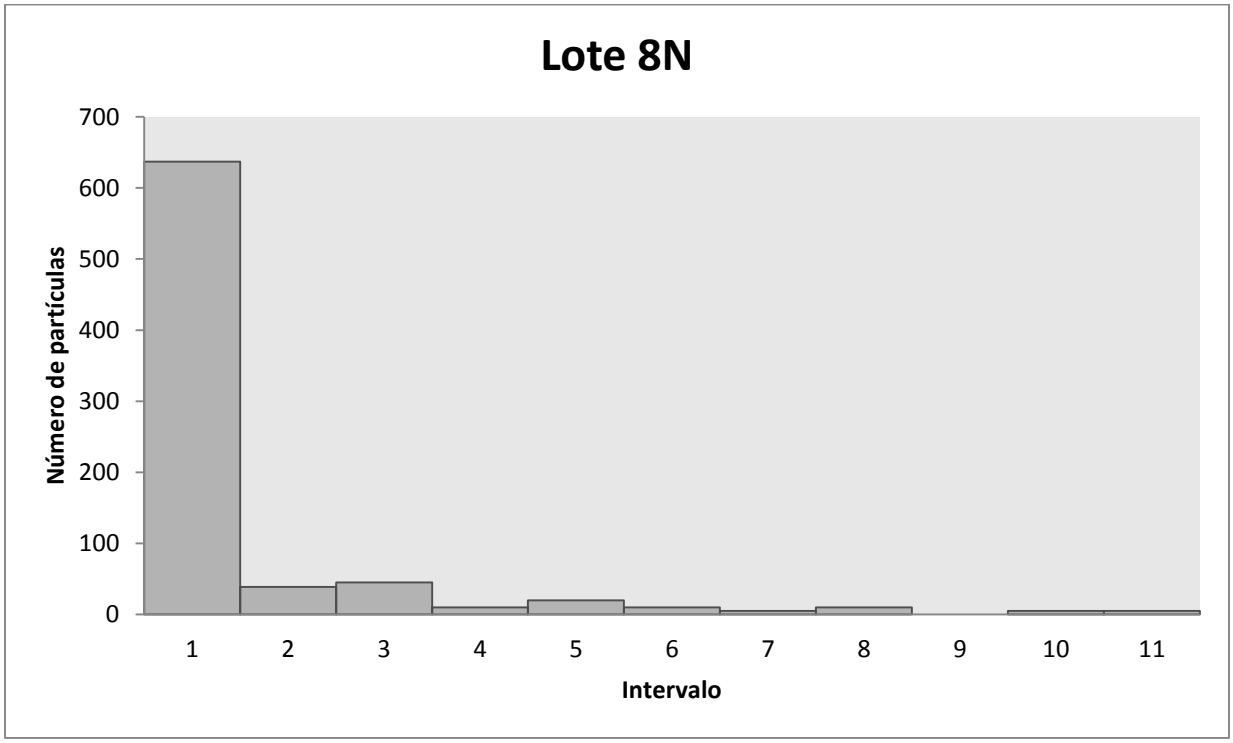
LOTE 6N				
Clase	Inferior	Superior	Frecuencia Acumulada	Frecuencia absoluta
1	3,2	6,5	8	8
2	6,5	9,8	399	391
3	9,8	13,0	514	115
4	13,0	16,3	588	74
5	16,3	19,6	632	44
6	19,6	22,9	642	10
7	22,9	26,2	656	14
8	26,2	29,4	661	5
9	29,4	32,7	681	20
10	32,7	36,0	686	5



LOTE 7N				
Clase	Inferior	Superior	Frecuencia Acumulada	Frecuencia absoluta
1	1,0	4,3	369	369
2	4,3	7,5	579	210
3	7,5	10,8	725	146
4	10,8	14,0	738	13
5	14,0	17,3	750	12
6	17,3	20,5	756	6
7	20,5	23,8	768	12
8	23,8	27,0	768	0
9	27,0	30,3	774	6
10	30,3	33,5	774	0
11	33,5	36,8	780	6



LOTE 8N				
Clase	Inferior	Superior	Frecuencia Acumulada	Frecuencia absoluta
1	8,0	11,4	637	637
2	11,4	14,8	676	39
3	14,8	18,3	721	45
4	18,3	21,7	731	10
5	21,7	25,1	751	20
6	25,1	28,5	761	10
7	28,5	31,9	766	5
8	31,9	35,3	776	10
9	35,3	38,8	776	0
10	38,8	42,2	781	5
11	42,2	45,6	786	5



ANÁLISIS DE COMPARACIONES MULTIPLES TAMAÑO DE PARTÍCULA 1N A 8N

Número de Familias	1
Número de comparaciones múltiples de Tuckey	28

Test de comparaciones múlples de Tukey	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary
1N vs. 2N	0,0	-0,7459 to 0,7459	No	ns
1N vs. 3N	-4,400	-5,243 to -3,557	Si	****
1N vs. 4N	-0,5000	-1,299 to 0,2993	No	ns
1N vs. 5N	-6,300	-7,147 to -5,453	Si	****
1N vs. 6N	-4,100	-4,937 to -3,263	Si	****
1N vs. 7N	1,200	0,3938 to 2,006	Si	***
1N vs. 8N	-3,400	-4,204 to -2,596	Si	****
2N vs. 3N	-4,400	-5,242 to -3,558	Si	****
2N vs. 4N	-0,5000	-1,299 to 0,2988	No	ns
2N vs. 5N	-6,300	-7,147 to -5,453	Si	****
2N vs. 6N	-4,100	-4,937 to -3,263	Si	****
2N vs. 7N	1,200	0,3943 to 2,006	Si	***
2N vs. 8N	-3,400	-4,204 to -2,596	Si	****
3N vs. 4N	3,900	3,010 to 4,790	Si	****
3N vs. 5N	-1,900	-2,833 to -0,9669	Si	****
3N vs. 6N	0,3000	-0,6242 to 1,224	No	ns
3N vs. 7N	5,600	4,704 to 6,496	Si	****
3N vs. 8N	1,000	0,1054 to 1,895	Si	*
4N vs. 5N	-5,800	-6,694 to -4,906	Si	****
4N vs. 6N	-3,600	-4,485 to -2,715	Si	****
4N vs. 7N	1,700	0,8445 to 2,555	Si	****
4N vs. 8N	-2,900	-3,754 to -2,046	Si	****
5N vs. 6N	2,200	1,272 to 3,128	Si	****
5N vs. 7N	7,500	6,600 to 8,400	Si	****
5N vs. 8N	2,900	2,001 to 3,799	Si	****
6N vs. 7N	5,300	4,409 to 6,191	Si	****
6N vs. 8N	0,7000	-0,1894 to 1,589	No	ns
7N vs. 8N	-4,600	-5,460 to -3,740	Si	****

Comparaciones no significativas (N=no significativa)

	1	2	3	4	5	6	7	8
1		N		N				
2				N				
3						N		
4								
5								
6								N
7								
8								

7. Bibliografía

Abourashed E.A., VanderplankJ.R., Khan I.A. (2002) High-speed extraction and HPLC Fingerprinting of medicinal PLants – I. Application to Passiflora Flavonoids, Pharmaceutical Biology, 40 (2), 81-91

An H., Wang H., Lan Y., Hashi Y., Chen S. (2013) Simultaneous qualitative and quantitative analysis of phenolic acids and flavonoids for the quality control of Apocynum venetum L. leaves by HPLC–DAD–ESI–IT–TOF–MS and HPLC–DAD, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 85, 95-304

Araujo, P. (2009). Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. Journal of Chromatography, 877, 2224–2234.

AEFI Asociacion Española de Farmaceuticos de la Industria. (2001). Validación de Métodos Analíticos . Barcelona: Asociacion Española de Farmaceuticos de la Industria AEFI.

Barrett, B. (1994). Medicinal Palnts of Nicaragua's Atlantic Coast. Economic Botany, 48(1), 8-20.

Bilia , A. R., Bergonzi, C. M., Morgenni, F., Mazzi, G., Vincieri, F. F. (2001). Evaluation of chemical stability of St. John's wort commercial extract and some preparations. International Journal of Pharmaceutics, 213(1-2), 199-208.

Bilia, A. R., Bergonzi, C. M., Gallori, S., Mazzi, G., Vincieri, F. F. (2002). Stability of the constituents of Calendula, Milk-thistle and Passion flower tinctures by LC-DAD and LC-MS. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 30(3), 613-624.

Bilia, A., Eterno , F., Bergonzi, M., Mazzi , G., Vincieri, F. (2007). Evaluation of the content and stability of the constituents of mother tinctures and tinctures: The case of Crataegus oxyacantha L. and Hieracium pilosella L. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 44, 70-78.

Bohm B.A. (1999) Introduction to Flavonoids. CRC Press, University of British Columbia, Canada, Vancouver

Bott, R., Labuza , T., Oliveira, T. (2010). Stability Testing of Spray- and Spouted Bed–Dried Extracts of Passiflora alata. Drying Technologies, 28, 12551265.

Buchi Technologies. (2008). Training Papers. Recuperado el 09 de 08 de 2013, de BÜCHI Labortechnik AG: http://www.buchi.com/Nano-Spray-Dryer-B-90.12378.0.html?&no_cache=1&file=308&uid=64652.

Calero, J., Sánchez, Y., Tórrez, R., Hernann, E., López, K. (2008). Elaboración y Caracterización de microcápsulas gastrorresistentes de Diclofenac obtenidas por Gelificación Iónica. Universitas, 1(2), 27-30.

Cañigueral, S., Della Cassa, E., Bandoni, A. (2003). Plantas Medicinales y Fitoterapia:¿Indicadores de Dependencia o Factores de Desarrollo? Latin American Journal of Pharmacy , 3(22), 265-78 .

Cardone, M. J. (1986) New Technique in Chemila Assay Calculations. 2. Correct Solution of the Model Problem and related Concepts. Analytical Chemistry, 58 (2), 438-445.

Carvajal, L., Turbay, S., Alvarez, L., Rodriguez, A., Alvarez , M., Bonilla, K., .Parra, M. (2014). Propiedades funcionales y nutricionales de seis especies de passifloras (Passifloraceae) del departamento del Huila (Colombia). Caldasia, 36(1), 1-15.

Castro , P., Hoshino, A., da Silva, J., & Mendes , F. (2007). Possible anxiolytic effect of two extracts of Passiflora quadrangularis L. in experimental models. Phytoter Res., 5(21), 481-484.

CEPASS Huila. (2010). Corporación Centro de Investigación para la gestíon tecnológica del Passiflora del Huila, identificación, valoración y uso potencial de las pasifloras en el huila con fines de mercados especializados del orden nacional e internacional. Presentación de primer congreso latinoamericano de Passiflora. Recuperado el 23 de 03 de 2013,: http://www.asohofrucol.com.co/archivos/biblioteca/biblioteca_166_SEMINARIO_PASSIFLORAS_UDEA.pdf

CEPASS Huila. (2011). Corporación Centro de Investigación para la gestíon tecnológica del Passiflora del Huila. Galeria Frutas. Recuperado el 27 de 07 de 2013, de Badea: http://www.cepass.org/index.php/galeria-frutas

Cerea M., Zheng W., Young C.R., McGinity J.W. (2004) A novel powder coating process for attaining taste masking and moisture protective films applied to tablets. International Journal of Pharmaceutics, 279(1-2), 127-39

Chan, E. S., Yim, Z. H., Phan, S. H., Mansa, R. F., Ravindra, P. (2010). Encapsulation of herbal aqueous extract through absorption with ca-alginate hydrogel beads. Food and Bioproducts Processing, 88(2), 195-201.

Convention on Biological diversity. (2012). Convention on Biological diversity CBD. Recuperado el 07 de 08 de 2013, de Nagoya Protocol: http://www.cbd.int/abs/text/default.shtml

Convention on Biological Diversity. (2013). Convention on Biological Diversity CBT. (United Nations) Recuperado el 03 de 08 de 2013, de Aichi Biodiversiry Targets: http://www.cbd.int/sp/targets/

Cortés-Rojas D.F., Souza C.R.F., Oliveira W.P. (2014) Assessment of stability of a spray dried extract from the medicinal plant Bidens pilosa L., Journal of King Saud University - Engineering Sciences, Available online 19 April 2014

Costa, G. (2013). Estudo químico de espécies brasileiras e colombianas do gênero Passiflora. Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Farmácia. Florianópolis.

Costa , G., Gazola , A., Madóglio , F., Zucolotto , S., Reginatto , F., Castellanos , L., Schenkel , E. (2013). Vitexin derivates as chemical markers in the differentiation of the closely related species Passiflora alta curtis and Passiflora quadrangularis Linn. Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies, 36(12), 1697-1707.

Cristancho, C. y Melo, O. (2005). Optimizacion de sistemas de respuesta dual. Una aproximacion compromiso. Revista Colombiana de Estadistica, 155-171.

Dhawan, K., Dhawan, S., Sharma, A. (2004). Passiflora: a review update. Journal of Ethnopharmacology(94), 1-23.

Endale , A., Kammerer, B., Gebre-Mariam, T., Schmidt, P. C. (2005). Quantitative determination of the group of flavonoids and saponins from the extracts of the seeds of Glinus lotoides and tablet formulation thereof by high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A, 1083, 32-41.

Esmaeili , A., Saremnia, B., & Koohia, A. (2011). Mechanism of nanocapsules of Matricaria recutita L. extract formation by the emulsion–diffusion process. Superlattices and Microstructures 50 (2011) 340–349(50), 340–349.

Esposito, E., Roncariti, R., Cortesi, R., Cervellati, F., & Nastruzzi, C. (2000). Production of Eudragit microparticles by spray-drying technique: influence of experimental parameters on morphological and dimensional characteristics. Pharma Dev Technol., 5(2), 267-278.

Estevinho, B. N., Rocha, F., Santos, L., Alves, A. (2013). Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications–A review. Trends in Food Science & Technology, 31(2), 138-155.

Evonik Industries AG . (2014). Technical Information Eudragit E 100 Eudragit E PO Eudragit E 12,5. Evonik Romhm, Darmstadt.

Fernandes, L., Candido, R., Oliveira, W. (2012). Spray drying microencapsulation of Lippia sidoides extracts in carbohydrates blends. Food and bioproducts processing(90), 425–432.

Frascareli , E., Silva, V., Tonona, R., Hubinger, M. (2012). Effect of process conditions on the microencapsulation of coffe oil by spray drying. Food and Bioproducts Processing(90), 413–424.

Fucina , G., Catia Block, L., Baccarin Thaisa, Gutierrez Ribeiro, T., Meira Quintao, N., Cechinel Filho, V., . . . Bellé Bresolin, T. (2012). Development and validation of a stability indicative HPLC–PDA method for kaurenoic acid in spray dried extracts of Sphagneticola trilobata (L.) Pruski, Asteraceae. Talanta, 101, 530-536.

Gallardo, G., Guida, L., Martinez, V., Lopez, M., Bernhardt, D., Blasco, R., . . . Hermida, L. (2013). Microencapsulation of linseed oil by spray drying for functional food application. Food Research International (52), 473–482.

Gallegos-Infante, J., Rocha Guzman, N., Gonzalez-Laredo, R., Medina-Torres, L., Gomez-Aldapa, C., Ochoa-Martınez, L., Rodrıguez-Ramırez, J. (2013). Physicochemical properties and antioxidant capacity of oak (Quercusresinosa) leaf infusións encapsulated by Spray Drying. Food Bioscience(2), 31–38.

Gallo, L., Llabot, J., Allemandi , D., Bucalá, V., Piña, J. (2011). Influence of spray-drying operating conditions on Rhamnus purshiana (Cáscara sagrada) extract powder physical properties. Powder Technology (208), 205–214.

Gallo, L., Piña, J., Bucalá, V., Allemandi, D., Ramírez-Rigo, M. (2013). Development of a modified-release hydrophilic matrix system of a plant extract based on co-spray-dried powders. Powder Technology 241 (2013) 252–262(241), 252–262.

Garekani, H., Moghaddam, Z., Sadeghi, F. (2013). Organic solution versus aqueous dispersion of Eudragit RS in preparation of sustained release microparticles of theophylline using spray drying. Colloids and surfaces B: Biointerfaces, 108, 374-379.

Gazola, A. (2012). Avaliação química e neurofarmacológica de espécies de passiflora da américa do sul. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianopolis. Tese de Doutorado.

Guevara H. A., Luengas P. E., Garavito G. (2010) Revisión documental de los productos naturales legalmente autorizados para su mercadeo en Colombia, Colombia Medica, 41 (2), 129-140

Gharsallaoui , A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an overview. Food Research International , 40, 1107–1121.

Guo, Y., Shalaev, E., Smith, S. (2013). Physical stability of pharmaceutical formulations: solid-state characterization of amorphous dispersions. TrAC. Trends in Analitycal Chemistry, 49, 137-144.

Harris, D. C. (2003). Analisis quimico cuantitativo. Barcelona, España: Editorial Reverte S.A.

He, Y., Zhimin , H., Haitong, W. (2012). Determination of quercetin, plumbagin and total flavonoids in Drosera peltata var. glabrata YZ ruan. Pharmacognosy Magazine , 32(8), 263-267.

Herandez A., Bernal R. (2000) Lista de Especies de Passifloraceae de Colombia. Biota Colombiana 1 (3), 320-355

Instituto de Investigación en Recursos Biológicos Alexander von Humbolt. (2008). Política Nacional de Biodiversidad 2009-2019. Bogota.

Intenational Conference of Harmozination ICH. (2003). Annex 5. Stability Data package for registration applications in climatic zones III and IV. Guidance fot industry Q1F, 863, 1-20.

ICH, International Concerence of Harmonisation. (2005). Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). Current Step 4 version

Karioti, A., Chiarabini, L., Alachkar, A., Chehna, M. F., Vincieri, F. F., Bilia, A. R. (2014). HPLC–DAD and HPLC–ESI-MS analyses of Tiliae flos and its preparations. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 100, 205-214.

Kaviani N, Tavakoli M, Tabanmehr M, Havaei R. (2013) The Efficacy of Passiflora Incarnata Linnaeus in Reducing Dental Anxiety in Patients Undergoing Periodontal Treatment. Journal of Dentistry.14(2), 68-72.

Kazakevich, H. M. (2007). HPLC for Pharmaceutical Scientists. United States, New York: Wiley

Krishnaiah, D., Sarbatly, R., Nithyanandam, R. (2012). Microencapsulation of Morinda citrifolia L. extract by Spray Drying. Chemical Engineering Research and Design (90), 622–632.

Kristmundsdottir, T., Gudmundsson, O., Ingvarsdottir, K. (1996). Release of diltiazem from Eudragit microparticles prepared by spray-drying. International Journal of Pharmaceutics, 137(2), 159-165.

Lam, P.-L., Kok, S.-L., Ho, Y.-W., Wong, R.-M., Cheng, G.-M., Cheng, C.-H., Chui, C.-H. (2013). A novel green gelatin–agar microencapsulation system with P. urinaria as an improved anti-A. niger model. Carbohydrate Polymers , 92, 877– 880.

Lamprecht A., Torres H.R., Schafer U., Lehr C.M (2000) Biodegradable microparticles as a two-drug controlled release formulation: a potential treatment of inflammatory bowel disease, Journal of Controlled Release 69 (2000) 445–454

Laohasongkrama, K., Mahamaktudsanee, T., Chaiwanichsiri, S. (2011). Microencapsulation of Macadamia oil by spray drying. Procedia – Food Science(1), 1660 – 1665.

Lazarowych, N. J. y Pekos, P. (1998). Compounds for identification and Standarization of Botanical Drugs: Strategies for applying Pharmaceutical HPLC Analysis to Herbal Products. Terapeutic Innovation and Regulatory Science , 32(2), 497-512.

Loo, L., Koerner, P., Mathews, T., Lam, J. (s.f.). Using pH-LC to Control Selectivity of Acidic and Basic Compounds on Gemini - NX. Phenomenex INC. Torrance, CA: US.

Lopretti, M., Barreiro, F., Fernandes, I., Damboriarena, A., Ottati, C., Olivera, A. (2007). Microencapsulación de compuestos de actividad biologica. Publicación Anual del Laboratorio Tecnologico de Uruguay.

Lorenzo-Lamosa ML, Cuna M, Vila-Jato JL, Torres D, Alonso MJ (1997) Development of a microencapsulated form of cefuroxime axetil using pH-sensitive acrylic polymers. Journal of Microencapsulation. 14(5), 607-16.

Lorenzo-Lamosa, M., Remuñan-Lopez, C., Vita-Jato, J., M.J., A. (1998). Design of microencapsulated chitosan microspheres for colonic drug delivery. Journal of Controlled relase, 52(1-2), 109-118.

Marques, G. S., Leao, W. F., Lyra, M. A., Peixoto , M., Monteiro, R. P., Rolim, L. A., Soares , L. A. (2013). Comparative evaluation of UV/VIS and HPLC and HPLC analytical

methodologies applied for quantification of flavonoids from leaves of Bauhinia forficata. 23(1), 1-15.

Martins S., Sarmento B., Souto E.B., Ferreira D.C. (2007) Insulin-loaded alginate microspheres for oral delivery – Effect of polysaccharide reinforcement on physicochemical properties and release profile, Carbohydrate Polymers, 69, 725–73

Masters, K. (1990). Spray Drying Handbook. New York, USA: Longman.

Millers J.N. (1991). Basic Statistical methods for Analytical Chemiatry Part2. Calibration and Regression Methods* A review. Analyst, 116, 3-14

Ministerio de Protección Social (2004) Decreto 2266 del 15 de julio de 2004, por el cual se reglamentan los regímenes de registros sanitarios y de vigilancia y control sanitario y publicidad de los productos fitoterapéuticos. (Diario Oficial N° 45.610

Morcillo, J. (1989). Temas básicos de química. Alhambra Universidad. Madrid

Muller S.D., Vasconcelos S.B., Coelho M., Biavatti M.W. (2005) LC and UV determination of flavonoids from Passiflora alata medicinal extracts and leaves, J ournal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 37 (2005) 399–403

Muñoz-Celaya, A., Ortiz-García, M., Vernon-Carter, E., Jauregui-Rincón, J., Galindo, E., & Serrano-Carreón, L.-C. (2012). Spray-drying microencapsulation of Trichoderma harzianum conidias in carbohydrate polymers matrices. Carbohydrate Polymers (88), 1141– 1148.

Nikam, V. K., Kotade, K. B., Gaware, V. M., Dolas, R. T. (2011). Eudragit a Versatile Polymer: Areview. Pharmacology Online, 1, 152 - 164.

Obidike, I. y Emeje, M. (2011). Microencapsulation enhances the anti-ulcerogenic properties of Entada africana leaf extract. Journal of Ethnopharmacology (137), 553– 561.

Ocampo Pérez, J., Coppens d'Eeckenbrugge, G., Restrepo, M., Jarvis, A., Salazar, M., Caetano, C. (2007). Diversity of Colombian Passifloraceae: biogeography and an updated list for conservation . Biota Colombiana, 8(1), 1-45.

Okamoto, Y. y Yoshizawa, T. (1994). Japan Patent nº 293, 657, 4PP.

Oliveira, W., Bott, R., Souza, C. (2006). Manufacture of standardized dried extracts from medicinal Brazilian plants. Drying Technology, 4(24), 523–533.

Oliveira, K.B. y Oliveira B. H. (2013) HPLC/DAD determination of rosmarinic acid in Salvia officinalis: sample preparation optimization by factorial design. Journal of Brazilian Chemistry Society. 24 (1), 85-91

Orsini, F. y Luisella, V. (1985). Separation of natural polarsubstances by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography, Centrifugal Thin- LayerChromatography and Droplet Counter-Current Chromatography. Journal of Chromatography, 399, 69-75.

Orsini, F., Pelizzoni, F., Verotta , L. (1985). Quadranguloside, a cycloartane triterpene glycoside from Passiflora quadrangularis. Phytochemistry, 25(1), 191-193.

Ortiz Torres, H.;I Sánchez, W.; Murillo Perea, E.; Méndez Arteaga, J (2009) Potencial antioxidante de hojas y corteza de Bauhinia kalbreyeri harms: contribución de sus fl avonoides en esta actividad, Revista Tumbaga, 4, 43-58

Osorio, C., Duque, C., Fujimoto, Y. (1999). Oxygenated monoterpenoids from badea (Passiflora quadrangularis) fruit pulp. Phytochemistry(53), 97-101.

Otero, R., Nuñez N., V., Barona, J., Fonnegra, R., Jimenez, S., Osorio , R., Díaz, A. (2000). Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia Part III: Neutralization of the haemorrhagic effect of Bothrops atrox venom. Journal of Ethnopharmacology (73), 233–241.

Pacheco-Palencia, L. y Talcott, S. (2010). Chemical stability of açai fruit (Euterpe oleracea Mart.) anthocyanins as influenced by naturally occurring and externally added polyphenolic cofactors in model systems. Food chemistry, 118, 17-25.

Passerinia N., B. Perissutti, B. Albertinia, E. Franceschinis, D. Lenaz, D. Hasa, . . . D. Voinovich. (2012). A new approach to enhance oral bioavailability of Silybum Marianum dry extract: Association of mechanochemical activation and spray congealing. Phytomedicine (19), 160– 168.

Paudel, A., Worku, Z. A., Meeus, J., Guns, S., Van den Mooter, G. (2013). Manufacturing of solid dispersions of poorly water soluble drugs by spray drying: Formulation and process considerations. International Journal of Pharmaceutics, *453*(1), 253-284.

Pereira N, M., Correa, L., Carvalho , S., Pereira , G., de Oliveira, L. (2013). Simultaneous analysis of 25 phenolic compounds in grape juice for HPLC: Method validation and characterization of São Francisco Valley samples. Microchemical Journal, 110, 665-674.

Pereira de Souza T., Martinez-Pacheco R., Gomez-Amoza J. L., Petrovick P. R. (2007) Eudragit E as excipient for production of granules and tablkets from phyllanthus niruru L spray-dried extract, APPS Pharm. Sci. Tech. 8 (2), e54-e60

Praveena, R., Sadasivam, K., Kumaresan, R., Deepha, V., Sivakumar, R. (2013). Experimental and DFT studies on the antioxidant activity of a C-glycoside from Rhynchosia

capitata. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 103, 442-452.

Rassu, G., Gavini, E., Espada, G., Giunchedi, P., Marceddu, S. (2008). Ketoprofen Spray-dried Microspheres Based on Eudragit® RS and RL: Study of the Manufacturing Parameters . Drug Delivery and Industrial Pharmacy, 34(11), 1178-1187.

Rates, S. (2001). Plants as source of drugs. Toxicon (39), 603–613.

Reginatto, F. H., Gosmann, G., Schripsema, J., Schenkel, E. P. (2004). Assay of quadranguloside, the major saponin of leaves of Passiflora alata, by HPLC-UV. Phytochemical Analysis, 15(3), 195-197.

Ribeiro R., A. L. y Pereira O., W. (2007). Spray drying conditions and encapsulating composition effects on formation and properties of sodium diclofenac microparticles. Powder Technology, 171(1), 7-14.

Rommel, A. y Wrolstad, R. E. (1993). Influence of acid and Base Hydrolysis on the phenolic composition of Red Raspberry Juice. Aplic. Food Chem, 41, 1237-1241.

Rosas P., J. y Pedraza, J. (2007). Microesferas de PLGA: un sistema para la liberación controlada de moléculas con actividad inmunogénica. Revista Colombiana de Ciencias Quimico Farmaceuticas, 2(37), 134-153.

Saénz , C., Tapia , S., Chávez, J., Robert, P. (2009). Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (Opuntia ficus-indica). Food Chemistry (114), 616–622.

Sahin-Nadeem, H., Dinçer, C., Torun, M., Özdemir, F. (2009). Influence of inlet air temperature and carrier material on the production of instant soluble sage (Salvia fruticosa Miller) by spray drying. LWT - Food Science and Technology , 52, 31 - 38.

Sahoo, N., Manchikanti , P., Dey, S. (2010). Herbal drugs: Standards and regulation. Fitoterapia (81), 462–471.

Sakalem, G. M., Negri, G., Tabach, R. (31 de 07 de 2012). Chemical composition of hydroethanolic extracts from five species of the Passiflora. Brazilian Journal of Pharmacognosy.1219-1232.

Salamanca Grosso, I. L. (2007). Perfil de flavonoides e índices de oxidación de algunos propóleos colombianos. Zootecnia Trop., 25(2): 95-102. 2007 , 25(2), 95-102.

Sansone F., Mencherini T., Picerno P., d'Amore M., Patrizia Aquino R., Lauro M.R. (2011) Maltodextrin/pectin microparticles by spray drying as carrier for nutraceutical extracts, Journal of Food Engineering, 105 (3), 468-476

Sansone F., Picerno P., Mencherini T., Villecco F., D'Ursi A.M., Aquino R.P., Lauro M.R.,(2011 (1)) Flavonoid microparticles by spray-drying: Influence of enhancers of the dissolution rate on properties and stability, Journal of Food Engineering, 103 (2), 188-196

Salvador, M. J., Ferreira, E. O., Mertens-Talcott, S. U., De Castro, W. V., Veronika, B., Hartmut, D., Dias, D. (2006). Isolation and HPLC Quantitative Analysis of Antioxidant Flavonoids from *Alternanthera tenella* Colla. Z. Naturforsch, 61(c), 19-25.

Seccion de Laboratorio y Asuntos Cientificos de la ONU. (2010). Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos. New York: Servicio Editorial de la ONU.

Seikel, M. K., Chow , J. H., Feldman , L. (1966). The glycoflavonoid pigments of Vitex lunces Wood . Phytochemistry, 5, 439-455.

Sen, S., Chakraborty, R., De, B. (2011). Challenges and opportunities in the advancement of herbal medicine: India's position and role in a global context. Journal of Herbal Medicine, I, 67-75.

Shu, B., Yu, W., Zhao , Y., Liu, X. (2006). Study on microencapsulation of lycopene by spray-drying. Journal of Food Engineering (76), 664–669.

Silva, P., Stringheta, P., Teófilo, R., de Oliveira, I. (2013). Parameter optimization for spray-drying microencapsulation of jaboticaba Myrciaria jaboticaba) peel extracts using simultaneous analysis of responses. Journal of Food Engineering (117), 538–544.

Singh, S. y Bakshi, M. (2000). Stress Tests to Determine Inherent Stability of Drugs. Pharmaceutical Technology On-Line , 1, 1-14.

Six K., Verreck G., Peeters J., Brewster M., Van Den Mooter G. (2003). Increased physical Stability and Improved Dissolution properties of Itraconazole, a Class II Drug, by Solid Dispersions that Combine Fast- and Slow Dissolving Polymers. Journal of Pharmaceutical Sciences, 93 (1), 124-131

Smith, G., (1998). Introduction to stadistical Reasoning. WCB/McGraw-Hill. Libro. California

Sosa, M., Rodríguez-Rojoa, S., Mattea, F., Cismondic, M., Coceroa, M. (2011). Green tea encapsulation by means of high pressure antisolvent coprecipitation. The Journal of Supercritical Fluids, 3(56), 304–311.

Souza, C., Schiavetto, I., Thomazini, F., Oliveira, W. (2008). Processing of Rosmarinus officinalis line extract on spray and spouted bed dryers. Brazilian Journal of Chemical Enginnering (25), 59–69.

USDA (2015), ARS, National Genetic Resources Program. Germplasm Resources Information Network - (GRIN) [Online Database].National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland.URL: http://www.ars-grin.gov.4/cgi-bin/npgs/html/gnlist.pl?829 (24 March 2015)

Vergara C., Saavedra J., Sáenz C., García P., Robert P.(2014) Microencapsulation of pulp and ultrafiltered cactus pear (Opuntia ficus-indica) extracts and betanin stability during storage, Food Chemistry, 157, 246-251

Wang, Y., Zhaoxin, L., Fengxia, L., Xiaomei, B. (2009). Study on microencapsulation of curcumin pigments by spray drying. European Food Research and Technology (229), 391–396.

Wang, C.-H., Wang, Y.-X., Liu, H.-J. (2011). Validation and application by HPLC for simultaneous determination of vitexin-2″-O-glucoside, vitexin-2″-O-rhamnoside, rutin, vitexin, and hyperoside. Journal of Pharmaceutical Analysis, 1(4), 291-296.

Yan Y. D., Woo J.S., Kang J.H., Yong C.S., Choi H.G. (2010). Preparation and evaluation of taste-masked donepezil hydrochloride orally disintigrating tablets. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 33 (8), 1364-1370.

Zelinska-Pisklak, M. A., Kaliszewska, D., Stolarczyk, M., Kiss, A. K. (2015). Activity-guided isolation, identification and quantification of biologically active isomeric compounds from folk medicinal plant Desmodium adscendens using high performance liquid chromatography with diode array detector, mass spectrometry and multidimentional nuclear magnetic resonance spectroscopy. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 102 (1), 54-63

Zeraik, M. y Yariwake, J. (2010). Quantification of isoorientin and total flavonoids in Passiflora edulis fruit pulp by HPLC-UV/DAD. Microchemical Journal, 96(1), 86-91.