



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# **Propuesta de un marcador analítico como herramienta en la microencapsulación de un extracto con actividad antioxidante de cálices de *Physalis peruviana***

**Reina Marcela Toro Arango**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia  
Bogotá, Colombia  
2014



**Propuesta de un marcador analítico como herramienta  
en la microencapsulación de un extracto con actividad  
antioxidante de cálices de *Physalis peruviana***

**Reina Marcela Toro Arango**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en Ciencias Farmacéuticas**

Director (a):

Ph.D. Diana Marcela Aragón Novoa

Codirector (a):

Ph.D. Freddy Alejandro Ramos Rodriguez

Línea de Investigación:

Tecnología en Productos Naturales

Grupo de Investigación:

Tecnología de Productos Naturales – TECPRONA

Estudio y Aprovechamiento de Productos Naturales Marinos y Frutas de Colombia

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia

Bogotá, Colombia

2014



*A mi familia y a la estrella que ilumina mi camino.*



## Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia, por permitir mi formación integral y hacer de mí una mejor persona.

A la Vicerrectoría de Investigación por la financiación del Proyecto de Investigación “Propuesta de un marcador analítico como herramienta en la microencapsulación de un extracto con actividad antioxidante de cálices de *Physalis peruviana*”

Al Departamento de Farmacia por su recurso humano y permitir sus instalaciones para el desarrollo de este trabajo.

A COLCIENCIAS, por el apoyo mediante el programa “Jóvenes Investigadores e Innovadores”.

A mi familia, y muy profundamente a mi madre por ser ese pilar que me acompaña a cada paso.

A la profesora Marcela Aragón, por su confianza, apoyo incondicional, su amistad y principalmente por su paciencia.

Al profesor Freddy Ramos y en general al grupo “Estudio y Aprovechamiento de Productos Naturales Marinos y Frutas de Colombia”, por su colaboración y constante apoyo.

Al profesor Luis Fernando Ospina, por sus enseñanzas, risas y apoyo.

A Geison Modesti por sus oportunos aportes.

A mis amigos de ésta aventura que fue la maestría, a Paola, Carolina, Leidy, Milena, Iván, Juan Felipe, y en general a todos los que de una u otra forma fueron cómplices y una importante compañía

A los profesores del Departamento de Farmacia que sin su apoyo no podría haber llevado a cabo este proceso.

Y a todas las personas que conocí durante este tiempo que con su presencia hicieron parte de este logro.

MIL GRACIAS!!!

## Resumen

La uchuva (*Physalis peruviana* L., *Solanacea*) es una especie Andina ampliamente utilizada en medicina popular para el tratamiento de enfermedades asociadas con el estrés oxidativo tales trastornos del hígado, inflamación, cáncer y reumatismo. Actualmente, la uchuva ha adquirido gran importancia, ya que es la segunda fruta más exportada en Colombia, y los cálices, un material que encierra el fruto para protegerlo de insectos, pájaros, enfermedades y condiciones climáticas adversas, es considerado como residuo en las operaciones de poscosecha. Adicionalmente, este material se utiliza en la medicina tradicional en forma tópica para reducir los síntomas de la artritis. En estudios previos, se ha reportado una importante actividad antioxidante a partir de extractos de hojas y tallos de esta especie, asociada a la presencia de flavonoides y otros compuestos.

El objetivo del presente trabajo fue buscar un marcador analítico que permitiera el seguimiento de procesos de microencapsulación de un extracto con capacidad antioxidante de cálices de *P. peruviana*, una técnica que facilitaría la incorporación de dicho extracto en productos fitoterapéuticos o fitocosméticos. Para ese fin, se realizó un aislamiento bioquímico, a partir de un extracto etanólico, empleando modelos *in vitro* para la evaluación de actividad antioxidante tales como FRAP, ORAC, ABTS y DPPH. Igualmente, se utilizaron métodos de actividad antioxidante generando *in situ* radicales superóxido y óxido nítrico. A partir de los resultados obtenidos en los ensayos de actividad antioxidante, se seleccionó la fracción butanólica para realizar purificación e identificación de compuestos activos, logrando elucidar los flavonoides glicosidados rutina y nicotiflorina.

Teniendo en cuenta que la rutina se observó como uno de los compuestos mayoritarios del extracto de cálices de *P. peruviana*, este flavonoide fue seleccionado como el marcador analítico del extracto crudo y se validaron metodologías por HPLC-DAD para su cuantificación tanto en el extracto crudo como en micropartículas poliméricas.

Finalmente, de modo exploratorio, se elaboraron micropartículas poliméricas empleando los métodos de emulsificación/evaporación del solvente y secado por aspersión, logrando emplear las metodologías validadas para la determinación de parámetros como eficiencia de encapsulación y carga de extracto.

**Palabras clave:** *Physalis peruviana*, capacidad antioxidante, rutina, marcador analítico, microencapsulación.

## Abstract

Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L., Solanaceae) is an Andean plant, it is widely used in folk medicine for the treatment of diseases associated with oxidative stress such liver disorders, inflammation, cancer and rheumatism. Currently, the cape gooseberry has become important since is the second most exported fruit in Colombia, and the calyces, a material that encloses the fruit, protecting it from insects, birds, diseases and adverse weather conditions, it's considered as a post-harvest waste. However, this material is used in traditional medicine as infusion to reduce the symptoms of arthritis. In previous studies, an important antioxidant activity obtained from leaves and stems of this specie has been established, associated to the presence of flavonoids and other compounds with antioxidant properties.

In the present study, the antioxidant activity of crude extract and fractions obtained from *P. peruviana* calyces was evaluated. The *in-vitro* models FRAP, ORAC, ABTS and DPPH were used. From the results obtained in the tests, the butanol fraction was selected for purification and identification of active compounds. The glycosidated flavonoids rutin (1) and nicotifloirina (2) were elucidated. Subsequently, the *in-vitro* models of antioxidant activity superoxide and nitric oxide were used to characterize the rutin and fractions against free radicals with biological relevance. Similarly, the antiinflammatory activity of the fractions and the rutin were determined.

Furthermore, rutin was selected as an analytical marker of crude extract of *P. peruviana*, as a tool in the microencapsulation of the extract. And a methodology for quantification by HPLC-DAD was development and validated.

Finally, two statistical experimental designs to the preparation of microparticles from the crude extract were performed by determining some preliminary parameters to consider for future studies.

**Keywords:** *Physalis peruviana*, antioxidant activity, rutin, analytical marker, microencapsulation.



# Contenido

	Pág.
<b>1. Marco Teórico.....</b>	<b>3</b>
1.1 <i>Physalis peruviana</i> L. ....	3
1.1.1 Usos Tradicionales .....	4
1.1.2 Estudios de Actividad Farmacológica .....	6
1.1.3 Fitoquímica .....	7
1.2 Marcadores químicos de un producto vegetal .....	11
1.3 Sistemas Transportadores .....	12
1.3.1 Micropartículas .....	13
1.3.2 Microencapsulación de extractos vegetales.....	15
1.4 Especies Reactivas del Oxígeno: Actividad antioxidante.....	20
<b>2. Justificación .....</b>	<b>23</b>
<b>3. Objetivos.....</b>	<b>25</b>
3.1 Objetivo General .....	25
3.2 Objetivos específicos .....	25
<b>4. Aislamiento e identificación de compuestos. Evaluación de la actividad antioxidante.....</b>	<b>26</b>
4.1 Metodología .....	26
4.1.1 Generalidades .....	26
4.1.2 Material vegetal .....	27
4.1.3 Obtención del extracto crudo .....	27
4.1.4 Fraccionamiento del extracto crudo .....	27
4.1.5 Actividad Antioxidante <i>in vitro</i> .....	30
4.1.5.1 FRAP ( <i>Ferric Reducing/Antioxidant Power</i> ) .....	30
4.1.5.2 ABTS ( <i>ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico</i> ).....	31
4.1.5.3 DPPH ( <i>radical 2,2difenil-1-picrilhidrazil</i> ).....	31
4.1.5.4 ORAC ( <i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i> ) .....	31
4.1.5.5 Captación del anión superóxido generado por el sistema Hipoxantina/Xantina Oxidasa .....	32
4.1.5.6 Medida de la captación de óxido nítrico (NO•) .....	33
4.1.5.7 Edema Auricular inducido por TPA .....	33
4.1.5.8 Análisis Estadístico.....	34
4.2 Resultados y discusión.....	35
4.2.1 Obtención de extractos .....	35
4.2.2 Actividad antioxidante .....	35
4.2.3 Aislamiento y purificación .....	43
4.2.3.1 Elucidación estructural del compuesto PP0503 .....	44

4.2.3.2	Elucidación estructural del compuesto PP0405.....	48
<b>5.</b>	<b>Cuantificación de Rutina por HPLC-DAD.....</b>	<b>55</b>
5.1	Metodología.....	55
5.1.1	Equipos.....	55
5.1.2	Reactivos.....	55
5.1.3	Desarrollo del método analítico por HPLC.....	55
5.1.3.1	Condiciones cromatográficas.....	55
5.1.3.2	Preparación de las muestras.....	56
5.1.3.3	Idoneidad del sistema.....	57
5.1.3.4	Validación de la metodología analítica.....	57
5.2	Resultados y discusión.....	60
5.2.1	Desarrollo del método analítico por HPLC.....	60
5.2.2	Validación de la metodología.....	66
5.2.2.1	Idoneidad del sistema.....	66
5.2.2.2	Parámetros de validación.....	68
<b>6.</b>	<b>Ensayos preliminares de microencapsulación.....</b>	<b>89</b>
6.1	Metodología.....	89
6.1.1	Reactivos.....	89
6.1.2	Elaboración de las micropartículas.....	89
6.1.3	Caracterización de las micropartículas.....	92
6.1.3.1	Rendimiento del proceso.....	92
6.1.3.2	Contenido de extracto en las micropartículas.....	92
6.1.3.3	Tamaño de partícula.....	93
6.2	Resultados y discusión.....	93
<b>7.</b>	<b>Conclusiones y recomendaciones.....</b>	<b>106</b>
7.1	Conclusiones.....	106
7.2	Recomendaciones.....	108
<b>8.</b>	<b>Bibliografía.....</b>	<b>121</b>

## Lista de figuras

	Pág.
Figura 1- 1. Voucher de <i>Physalis peruviana</i> L. encontrado en el Museo de Historia Natural de Suecia. Fuente: <a href="http://linnaeus.nrm.se/botany/fbo/p/physa/physper.html.en">http://linnaeus.nrm.se/botany/fbo/p/physa/physper.html.en</a> ...	3
Figura 1- 2. Estructura química de witanólidos presentes en los cálices de <i>Physalis peruviana</i> .....	8
Figura 1- 3. Estructura química de ésteres glicosidados presentes en los cálices de <i>Physalis peruviana</i> .....	8
Figura 1- 4. Tipos de Micropartículas .....	14
Figura 4- 1. Método modificado de Kupchan para el fraccionamiento del extracto crudo (PP0101) de <i>Physalis peruviana</i> .....	28
Figura 4- 2. Esquema de fraccionamiento de la fracción PP0301 a través de cromatografía en columna .....	29
Figura 4- 3. Esquema de fraccionamiento de la fracción PP0302 a través de cromatografía en columna y HPLC semipreparativa .....	30
Figura 4- 4. Captación del radical DPPH .....	31
Figura 4- 5. Reducción del NBT a diformazán por efecto del radical superóxido .....	32
Figura 4- 6. Formación del óxido nítrico y su reacción con oxígeno.....	33
Figura 4- 7. Extracción de los cálices de <i>Physalis peruviana</i> por percolación con Etanol	35
Figura 4- 8. Rutina (1) y Nicotoflorina (2), flavonoides aislados de los cálices de <i>Physalis peruviana</i> .....	50
Figura 4- 9. A) Cromatograma obtenido a partir de una solución de extracto etanólico de cálices de <i>Physalis peruviana</i> [1) Rutina, $t_r$ : 10,1 min, 2) Nicotoflorina, $t_r$ : 11,3 min]. B) ESI [-] Pico 10,1 min. C) ESI [-] Pico 11,3 min.....	53
Figura 5- 1. Cromatogramas obtenidos a partir de una solución de extracto etanólico de cálices de <i>Physalis peruviana</i> empleando diferentes sistemas cromatográficos. 1) Rutina. A) Gradiente A, B) Gradiente B, C) Gradiente B acidificando la fase móvil, D) Gradiente C acidificando la fase móvil, E) Gradiente C acidificando la fase móvil y $^{\circ}T = 35^{\circ}C$ , F) Gradiente C empleando acetonitrilo acidificado y $^{\circ}T = 35^{\circ}C$ , G) Gradiente D acidificando la fase móvil y $^{\circ}T = 35^{\circ}C$ .....	62
Figura 5- 2. Cromatograma obtenido a partir de una solución de rutina estándar. 1) Rutina, $t_r$ : 10,0 min .....	65

Figura 5- 3. Cromatograma obtenido a partir de una solución de extracto etanólico de cálices de <i>Physalis peruviana</i> . 1) Rutina, $t_r$ : 10,0 min.....	65
Figura 5- 4. Similitud de espectros UV del pico de rutina del extracto de cálices de <i>Physalis peruviana</i> (A) y el estándar de rutina (B). Picos de máxima absorción, 1) 255 nm, 2) 355nm. Datos procesado con el software LCsolution®.....	69
Figura 5- 5. Pureza del pico de rutina en el extracto. Datos procesados con el software LCsolution®.....	69
Figura 5- 6. Cromatograma obtenido a partir de, A) Metanol, B) Eudragit® E PO en metanol 2 mg/mL, C) Eudragit® RS 100 en metanol 2 mg/mL.....	70
Figura 5- 7. Cromatogramas obtenidos a partir de una solución de extracto etanólico de cálices de <i>Physalis peruviana</i> . A: Extracto sin degradar, B: Degradación del extracto con HCl 0,1 N, C: Degradación del extracto con NaOH 0,1 N, D: Degradación del extracto con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3%.....	73
Figura 5- 8. Cromatograma obtenido a partir de una solución de rutina estándar a 0,15625 µg/mL. 1) Rutina, $t_r$ : 10,0 min.....	87
Figura 5- 9. Cromatograma obtenido a partir de una solución de rutina estándar a 0,0078125 µg/mL. 1) Rutina, $t_r$ : 10,0 min.....	87

## Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1- 1. Clasificación taxonómica de <i>Physalis peruviana</i> .....	3
Tabla 1- 2. Usos tradicionales de <i>Physalis peruviana</i> en la medicina popular .....	5
Tabla 1- 3. Compuestos químicos aislados de <i>Physalis peruviana</i> .....	9
Tabla 1- 4. Metabolitos secundarios estudiados para el desarrollo de nuevos sistemas de transporte de extractos vegetales.....	16
Tabla 1- 5. Absorción de compuestos fenólicos .....	18
Tabla 1- 6. Ejemplos de sistemas microparticulados como vehículos para polifenoles de fuentes naturales.....	19
Tabla 1- 7. Antioxidantes de origen natural propios del metabolismo normal .....	21
Tabla 4- 1. Capacidad antioxidante <i>in vitro</i> de las fracciones de los cálices de <i>Physalis peruviana</i> .....	36
Tabla 4- 2. Capacidad antioxidante de las fracciones de los cálices de <i>Physalis peruviana</i> frente al radical superóxido .....	38
Tabla 4- 3. Capacidad antioxidante de las fracciones de los cálices de <i>Physalis peruviana</i> frente al radical óxido nítrico.....	39
Tabla 4- 4. Actividad antiinflamatoria <i>in-vivo</i> de las fracciones de los cálices de <i>Physalis peruviana</i> .....	42
Tabla 4- 5. Datos de RMN- <sup>1</sup> H, RMN- <sup>13</sup> C y 2D-HMBC para el compuesto PP0503 (MeOD, 400 MHz).....	45
Tabla 4- 6. RMN- <sup>1</sup> H (δppm) y RMN- <sup>13</sup> C (δppm) del compuesto PP0503 en MeOD, comparado con datos de la literatura para rutina en MeOD.....	47
Tabla 4- 7. Datos de RMN- <sup>1</sup> H para el compuesto PP0405 (DMSO, 400 MHz) .....	49
Tabla 4- 8. RMN- <sup>1</sup> H (δppm) del compuesto PP0404 en DMSO, comparado con datos de la literatura para la nicotiflorina en DMSO .....	50
Tabla 5- 1. Tiempos de retención obtenidos para la rutina en cada una de las matrices	72
Tabla 5- 2. Evaluación de linealidad en el sistema .....	74
Tabla 5- 3. Parámetros estadísticos “t” student para la evaluación de la linealidad de rutina en el sistema .....	74

Tabla 5- 4. Parámetros estadísticos ANOVA para la evaluación linealidad de rutina en el sistema .....	74
Tabla 5- 5. Test de Cochran para la evaluación de la linealidad de rutina en el sistema .....	75
Tabla 5- 6. Evaluación de linealidad en el método 1: Extracto de cálices de <i>Physalis peruviana</i> .....	76
Tabla 5- 7. Parámetros estadísticos “t” student para la evaluación de la linealidad de rutina en el método 1: Extracto de cálices de <i>Physalis peruviana</i> .....	76
Tabla 5- 8. Parámetros estadísticos ANOVA para la evaluación de la linealidad de rutina en el método 1: Extracto de cálices de <i>Physalis peruviana</i> .....	76
Tabla 5- 9. Test de Cochran para la evaluación de la linealidad de rutina en el método 1: Extracto de cálices de <i>Physalis peruviana</i> .....	77
Tabla 5- 10. Evaluación de linealidad en el método 2: Micropartículas con Eudragit® E PO .....	78
Tabla 5- 11. Parámetros estadísticos “t” student para la evaluación de la linealidad de rutina en el método 2: Micropartículas con Eudragit® E PO .....	78
Tabla 5- 12. Parámetros estadísticos ANOVA para la evaluación de la linealidad de rutina en el método 2: Micropartículas con Eudragit® E PO .....	78
Tabla 5- 13. Test de Cochran para la evaluación de la linealidad de rutina en el método 2: Micropartículas con Eudragit® E PO .....	79
Tabla 5- 14. Evaluación de linealidad en el método 3: Micropartículas con Eudragit® RS 100 .....	80
Tabla 5- 15. Parámetros estadísticos “t” student para la evaluación de la linealidad de rutina en el método 3: Micropartículas con Eudragit® RS 100 .....	80
Tabla 5- 16. Parámetros estadísticos ANOVA para la evaluación de la linealidad de rutina en el método 3: Micropartículas con Eudragit® RS 100 .....	80
Tabla 5- 17. Test de Cochran para la evaluación de la linealidad de rutina en el método 3: Micropartículas con Eudragit® RS 100 .....	81
Tabla 5- 18. Precisión intradía (Repetibilidad) evaluada en el sistema y en cada una de las matrices .....	84
Tabla 5- 19. Precisión interdía (precisión intermedia) evaluada en el sistema y en cada una de las matrices a una concentración de 2,5 µg/mL .....	84
Tabla 5- 20. Exactitud evaluada en cada una de las matrices, expresada como %recuperación .....	85
Tabla 6- 1. Diseño experimental factorial reducido para la elaboración de micropartículas por secado por aspersion (Statgraphics®) .....	91
Tabla 6- 2. Diseño experimental factorial reducido para la elaboración de micropartículas por emulsificación – evaporación del solvente (Statgraphics®) .....	91
Tabla 6- 3. Tamaños de partícula de las micropartículas elaboradas .....	94
Tabla 6- 4. Rendimiento de la microencapsulación por el método de <i>spray - drying</i> .....	95
Tabla 6- 5. Carga, rendimiento y eficiencia de encapsulación del extracto de <i>Physalis peruviana</i> en la elaboración de micropartículas por el método de <i>spray – drying</i> .....	96

---

Tabla 6- 6. Rendimiento de la microencapsulación por el método de emulsificación – evaporación del solvente.....	96
Tabla 6- 7. Carga, rendimiento y eficiencia de encapsulación del extracto de <i>Physalis peruviana</i> en la elaboración de micropartículas por el método de emulsificación – evaporación del solvente.....	97

## Lista de gráficas

	Pág.
Figura 4- 1. Capacidad antioxidante <i>in vitro</i> de las fracciones de los cálices de <i>Physalis peruviana</i> .....	37
Gráfica 4- 2. Capacidad antioxidante de las fracciones de los cálices de <i>Physalis peruviana</i> frente al radical superóxido.....	39
Gráfica 4- 3. Capacidad antioxidante de las fracciones de los cálices de <i>Physalis peruviana</i> frente al radical óxido nítrico.....	40
Gráfica 4- 4. Actividad antiinflamatoria <i>in-vivo</i> de las fracciones de los cálices de <i>Physalis peruviana</i> .....	43
Gráfica 4- 5. Evaluación de la actividad antiinflamatoria y la capacidad antioxidante (frente a los radicales superóxido y óxido nítrico) de la rutina y la nicotoflorina.....	51
Gráfica 5- 1. Gradientes de elución de la fase móvil respecto al solvente A (MeOH), para el desarrollo del método cromatográfico. A) <i>Gradiente A</i> , B) <i>Gradiente B</i> , C) <i>Gradiente C</i> , D) <i>Gradiente D</i> .....	62
Gráfica 5- 2. Gradiente de elución de la fase móvil respecto al solvente A (MeOH con 0,5% de ác. acético), para el desarrollo del método de cuantificación de rutina.....	64
Gráfica 5- 3. Curva de calibración para rutina en el sistema (metanol) .....	75
Gráfica 5- 4. Curva de calibración para rutina en el método 1: Extracto de cálices de <i>Physalis peruviana</i> .....	77
Gráfica 5- 5. Curva de calibración para rutina en el método 2: Micropartículas con Eudragit® E PO .....	79
Gráfica 5- 6. Curva de calibración para rutina en el método 3: Micropartículas con Eudragit® RS 100.....	81

---

## Lista de ecuaciones

	<b>Pág.</b>
Ecuación 4- 1. Porcentaje de inhibición de edema auricular.....	34
Ecuación 5- 1. Cálculo del factor de capacidad .....	67
Ecuación 5- 2. Cálculo del factor de selectividad.....	67
Ecuación 5- 3. Cálculo de la resolución.....	68
Ecuación 6- 1. Rendimiento de las micropartículas .....	92
Ecuación 6- 2. Carga en las micropartículas .....	93
Ecuación 6- 3. Eficiencia de encapsulación.....	93
Ecuación 6- 4. Rendimiento de encapsulación .....	93

## Lista de Símbolos y abreviaturas

### Abreviaturas

Abreviatura	Término
-------------	---------

ROS	Especie reactiva del oxígeno
$O_2^{\cdot -}$	Radical superóxido
HO·	Radical hidroxilo
$ROO^{\cdot}$	Radical peróxido
$RO^{\cdot}$	Radical peróxilo
SOD	Superóxido dismutasa
HAT	Transferencia de átomos de hidrógeno
SET	Transferencia de electrones
CCD	Cromatografía en capa delgada
CC	Cromatografía en columna
HPLC	Cromatografía de alta eficiencia
DAD	Detector de arreglo de diodos
RMN- $^1H$	Resonancia magnética nuclear protónica
RMN- $^{13}C$	Resonancia magnética nuclear de carbono
FRAP	Ferric Reducing/Antioxidant Power
ABTS	Ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)
DPPH	Radical 2,2difeníl-1-picrilhidrazil
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
TPA	13-O-tetradecanoilforbol
LC	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección

---

**Abreviatura Término**

---

PVA	Alcohol polivinílico
-----	----------------------



# Introducción

La uchuva (*Physalis peruviana* L.), es una especie andina que pertenece a la familia Solanácea y que ha adquirido gran importancia en el país por su potencial para la exportación como fruta fresca, generando divisas por varios millones de dólares al año. Se caracteriza porque sus frutos están encerrados dentro de un cáliz o capacho, el cual se convierte en material de desecho en las operaciones de poscosecha de la uchuva ya que sólo se comercializa el fruto [1, 2]. En estudios realizados, se ha logrado determinar que extractos a partir de hojas y tallos obtenidos de ésta especie poseen una importante actividad antioxidante [3, 4], asociada a la presencia de flavonoides y otros compuestos con características antioxidantes [5, 6]. Por lo tanto, la incorporación de extractos de cálices de esta especie en productos alimenticios, productos nutracéuticos o productos cosméticos es de gran pertinencia en cuanto al aprovechamiento de residuos, otorgándoles un valor agregado. Adicionalmente, su capacidad antioxidante permite prevenir enfermedades causadas por radicales libres, como el envejecimiento, enfermedades cardiovasculares y hepáticas, inflamación, derrame cerebral, diabetes mellitus, reumatismo, insuficiencia renal y cáncer [7-9].

Los sistemas que modifican la liberación de principios activos, entre los que destacan las micropartículas, han tenido un gran desarrollo en los últimos años. Las micropartículas poliméricas esféricas con tamaños que oscilan en el rango micrométrico, poseen la capacidad de mejorar la estabilidad de los compuestos antioxidantes y controlar su liberación [10], así como transformar sus características farmacotécnicas mejorando sus propiedades de fluidez, compactabilidad y densidad. Lo anterior, dado que el comportamiento de las partículas depende de las propiedades fisicoquímicas del transportador y no de la sustancia incorporada.

En el diseño de sistemas microparticulados a partir de extractos vegetales existe una limitación en el seguimiento de los procesos de microencapsulación en comparación con

el uso de moléculas puras, ya que es necesario identificar un marcador analítico, sin que sea necesariamente el responsable de la actividad biológica, que permita desarrollar los estudios de caracterización correspondientes. Por lo anterior, en el presente trabajo se busca identificar un marcador analítico como herramienta en la microencapsulación de un extracto de *Physalis peruviana* con actividad antioxidante, dado que este tipo de sistemas transportadores le confieren estabilidad a los componentes del extracto, mejoran sus características farmacotécnicas y controlan su liberación en el organismo.

# 1. Marco Teórico

## 1.1 *Physalis peruviana* L.

**Figura 1- 1.** Voucher de *Physalis peruviana* L. encontrado en el Museo de Historia Natural de Suecia. Fuente: <http://linnaeus.nrm.se/botany/fbo/p/physis/physper.html.en>



*Physalis peruviana* Linnaeus es una especie tropical herbácea anual y perenne, originaria de los Andes Suramericanos, que crece como planta silvestre y semi-silvestre en zonas altas de 1500 a 3000 msnm, a temperaturas entre los 13 y los 18°C y con una pluviosidad entre 1.000 y 2.000 mm anuales bien distribuidos, además, de requerir una humedad relativa promedio de 70 a 80% [11, 12]. Según la National Plant Center USDA [13], su clasificación taxonómica es:

**Tabla 1- 1.** Clasificación taxonómica de *Physalis peruviana*

<b>FAMILIA</b>	<i>Solanaceae</i>
<b>GÉNERO</b>	<i>Physalis</i>
<b>ESPECIE</b>	<i>Physalis peruviana</i> L.

Conocida comúnmente como uchuva, uvilla, tomatillo, topotopo, aguaymanto, capulí; la *P. peruviana* se caracteriza por poseer un fruto color naranja, redondeado u ovoide, de aproximadamente dos centímetros de diámetro; encerrado en un cáliz acrescente con forma de vejiga y de color verde, que cuando la fruta madura se torna más delgado y de color pardo [14]. El cáliz gamosépalo está formado por cinco sépalos persistentes, es veloso con venas salientes y con una longitud de unos 4 a 5 cm, cubre completamente el fruto durante todo su desarrollo y madurez [11], protegiéndolo de insectos, pájaros, enfermedades y situaciones climáticas adversas. Además, el cáliz representa una fuente esencial de carbohidratos durante los primeros 20 días de crecimiento y desarrollo del fruto [15, 16].

### 1.1.1 Usos Tradicionales

*P. peruviana* es una planta ampliamente utilizada en la medicina popular. En diferentes regiones de Colombia, se ha manejado el jugo del fruto en forma de colirio para el tratamiento de pterigion y catarata, en infusión como expectorante, mezclas de los frutos exprimidos con agua para la albuminuria; además, se ha empleado como calcificante y para el control de la amibiasis [14, 17]. Por otro lado, infusiones de la flor se han utilizado para el tratamiento de la tos, así como las hojas se utilizan como diurético, antiespasmódico, en el tratamiento de la litiasis renal, gota, tuberculosis y depresión nerviosa. Por su parte, los cálices preparados en forma de infusión son utilizados para el alivio de los síntomas de la artritis, debido a sus efectos antiinflamatorios [14].

En Perú, la uchuva es usada empíricamente para el tratamiento del cáncer y otras enfermedades como la hepatitis, asma, malaria y dermatitis [18].

Tribus Muthuvan y nativos Tamil que viven en las regiones forestales de Shola en Kerala, consumen decocciones concentradas de las hojas de *P. peruviana* para curar la ictericia [19].

Además, se ha reportado que el consumo de frutos de *P. peruviana* reduce los niveles de glucosa en la sangre después de 90 minutos en adultos jóvenes, causando un gran efecto hipoglucémico después de este periodo [20].

En la Tabla 2-1 se presentan algunos usos terapéuticos de *P. peruviana* en la medicina tradicional.

**Tabla 1- 2.** Usos tradicionales de *Physalis peruviana* en la medicina popular

<b>Parte de la planta</b>	<b>Uso tradicional</b>	<b>Forma de administración</b>	<b>Referencia</b>
<b>Frutos</b>	Pterigión y catarata	Colirio	[21]
	Expectorante	Infusión	
	Tratamiento de albuminuria	Frutos exprimidos mezclados con agua	
	Antidiabético	Consumo diario del fruto	[20, 21]
	Cáncer, hepatitis, asma, malaria y dermatitis	-----	[18]
<b>Flor</b>	Tratamiento de la tos rebelde	Infusión	[22]
<b>Hojas</b>	Diurético, antiespasmódico, antiasmático, tratamiento de la litiasis renal, gota, tuberculosis y depresión nerviosa	Infusión	
	Antiséptico y cicatrizante de heridas	Pulverizadas mezcladas con cenizas de leña	
	Ictericia	Decocciones concentradas	[19]
<b>Hojas y tallos</b>	Contusiones	Frescos o secos en forma de pomada como cataplasma	[22]
<b>Planta entera</b>	Diurético, antilitásico y antipirético	Macerada en alcohol	
<b>Cálices</b>	Alivio de los síntomas de la artritis	Infusión	[23]

### 1.1.2 Estudios de Actividad Farmacológica

Dado el uso de *P. peruviana* en la medicina tradicional, se han desarrollado diferentes estudios farmacológicos con la finalidad de verificar bajo condiciones controladas, las diferentes propiedades atribuidas a la planta, además de estudiar nuevos posibles usos.

Wu *et al.* (2005), demostraron que el extracto etanólico de la planta entera (100 mg/mL) presenta una potente inhibición (82,3%) de la peroxidación lipídica inducida por ácido ascórbico – FeCl<sub>2</sub>, en homogenados de hígado de rata. Además, a concentraciones entre 10 – 100 mg/mL, el extracto posee un importante efecto inhibitorio de la actividad de la xantina oxidasa y captura del anión superóxido. En general, el estudio concluye que el extracto etanólico presenta una mayor actividad antioxidante respecto al control ( $\alpha$ -tocoferol) [3]. En estudios posteriores, Wu *et al.* (2006) obtuvieron diferentes extractos de hojas de *P. peruviana* empleando agua caliente, etanol y extracción con un fluido supercrítico (CO<sub>2</sub>), siendo este último el que presentó mayor actividad antioxidante, 49,04  $\pm$  1,57%, 67,78  $\pm$  2,26%, 69,48  $\pm$  3,34% a una concentración de 30  $\mu$ g/mL, respectivamente, según un modelo de captación de radical superóxido. Además, el extracto obtenido con fluido supercrítico demostró una significativa inhibición de la producción de óxido nítrico (NO) inducida por lipopolisacárico (LPS) de *E. coli* y la producción de prostaglandina E<sub>2</sub>, así como de la expresión de óxido nítrico sintetasa (iNOS) y ciclooxigenasa – 2 (COX-2) en células RAW 264,7; por lo que estos resultados proporcionan evidencia de que el extracto posee actividad anti-inflamatoria *in vitro* [4].

Arun y Asha (2007) estudiaron la actividad hepatoprotectora del extracto acuoso, etanólico y de hexano de hojas de *P. peruviana* (500 mg/kg) en un modelo experimental en ratas, a través de la inducción de hepatotoxicidad con CCl<sub>4</sub> por vía oral [24]. El estrés oxidativo generado por la formación de radicales libres, es uno de los mecanismos que se presentan como consecuencia de la biotransformación del CCl<sub>4</sub>, por lo que las propiedades antioxidantes de *P. peruviana* pueden generar el efecto hepatoprotector observado en los estudios. Por otro lado, Toro *et al.* (2013) demostraron que el extracto de cálices de *P. peruviana* inhibió significativamente ( $p < 0,001$ ) el estrés oxidativo

---

hepático causado por CCl<sub>4</sub>, mantenimiento normales los niveles de la superóxido dismutasa y catalasa [25].

El posible efecto hipoglicemiente de las fracciones del extracto etanólico, obtenido a partir de frutos frescos de *P. peruviana* fue evaluado mediante la administración oral a ratones normoglicémicos y diabéticos, sin encontrar efectos aparentes sobre la glicemia, pero en interacción con insulina exógena encontraron que potencia el efecto de ésta [26].

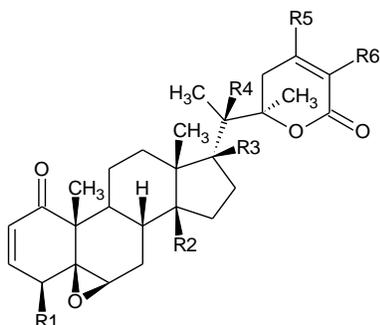
Franco *et al.* (2007) confirmaron la actividad antiinflamatoria atribuida a los cálices de *P. peruviana* en un modelo de edema auricular en ratones [27]. Por su parte, Pardo (2005) evaluó el efecto del jugo de los frutos como inhibidor del crecimiento de fibroblastos responsables de la formación de pterigios [28].

Entre otros, se ha demostrado en diferentes estudios que *P. peruviana* presenta actividad antihepatoma [29], antinociceptiva [30], citotóxica frente a las líneas celulares colo-205 (cáncer de colon) y K562 (leucemia mieloide crónica) [31], así como actividad hipoglicemiente y mejora del estado antioxidante de animales con diabetes inducida con estreptozotocina [32].

### 1.1.3 Fitoquímica

En *P. peruviana* se han identificado gran variedad de witanólidos en diferentes partes de la planta. Dinan *et al.* (1997) aislaron el 28-hidroxiwitanólido E y el 4β-hidroxiwitanólido E a partir de extractos de los cálices (Figura 1-2) [33]. Por otra parte, Lan *et al.* (2009) identificaron diecisiete witanólidos a partir de las partes aéreas (tallos y hojas) de la planta (phyperunolide A, phyperunolide B, phyperunolide C, phyperunolide D, peruvianoxide, phyperunolide E, phyperunolide F, 4β-hidroxiwitanólido E, witanólido E, witanólido S, witanólido C, withaperuvin, physalolactone, withaphysanolide, physalactone, withaperuvin D, y loliolide) [34], Fang *et al.* (2012) caracterizaron diez witanólidos nuevos, entre ellos cuatro perulactonas (perulactonas E, F, G y H), tres nuevos 28-hidroxiwitanólidos, withaperuvins I, J, K, L, M y N, junto con seis witanólidos conocidos, phyperunolides A y B, 5-metiléterwitanólido S, witanólido C, witanólido S y physalactone [35].

**Figura 1- 2.** Estructura química de witanóidos presentes en los cálices de *Physalis peruviana*



**28-Hidroxiwitanólido E**

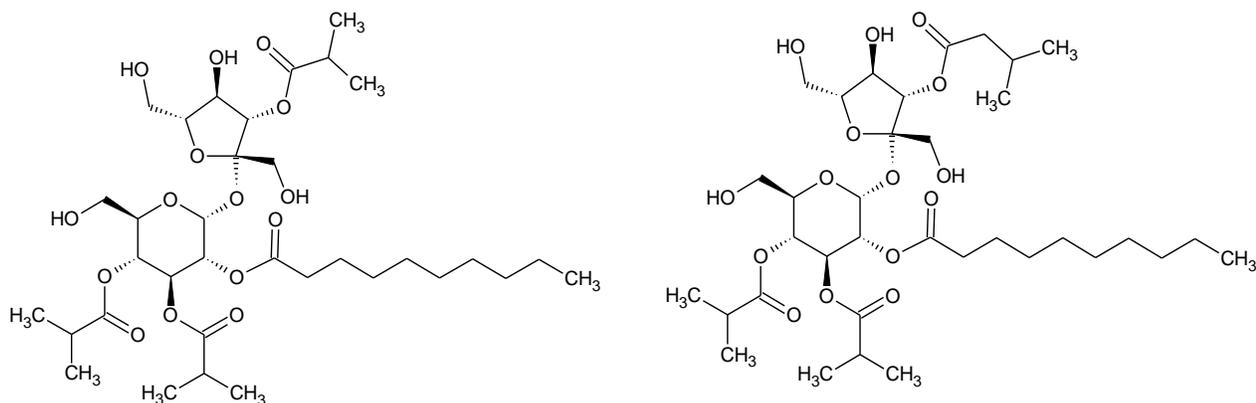
R5 = R6 = H  
R1 = R3 = R4 = (β) OH  
R2 = (α) OH

**4β-Hidroxiwitanólido E**

R1 = R5 = H  
R3 = R4 = R5 = (β) OH  
R2 = (α) OH  
R6 = CH<sub>2</sub>OH

Franco (2006) a partir de un extracto inicial etéreo obtenido de los cálices de *P. peruviana* aisló dos ésteres glicosidados que presentaban una importante actividad antiinflamatoria (Figura 1-3) [36]. Por otro lado, en esta especie se ha identificado la presencia de carotenoides [37, 38], fitoesteros [39], alcaloides [40, 41] y physalins (A, B, D y F) [42]. Además, se han cuantificado fenoles y flavonoides [3, 43], compuestos con importantes actividades antioxidantes.

**Figura 1- 3.** Estructura química de ésteres glicosidados presentes en los cálices de *Physalis peruviana*



En la Tabla 1-3 se resumen los compuestos encontrados en diferentes partes de la planta.

**Tabla 1- 3.** Compuestos químicos aislados de *Physalis peruviana*

Parte de la planta	Tipo de compuesto	Compuesto aislado	Referencia
Hojas	Alcaloides	3 $\beta$ -Acetoxitropano Dos isómeros N-metilpirrolidinilhigrina	[41]
	Witanólidos	Phyperunólido A Phyperunólido B Phyperunólido C Phyperunólido D Peruvianóxido Phyperunólido E Phyperunólido F 1,10-Witaperuvina C 4 $\beta$ -Hidroxiwitanólido E 2,3-Dihidroxiwitanólido E Visconólido Witanólido E Witanólido F Witanólido S Witafisanólido Witaperuvina D Physalolactone Physalolactone B Physalolactone C 23-Hidroxiophysalolactone 3-o- $\beta$ -d-Glucopiranosido de physalolactone B	[44-48]
	Otros esteroideos	Physaline A Perulactona Perulactona B Sitosterol 24-Metilnocolesterol	[49]
Cálices	Witanólidos	4 $\beta$ -Hidroxiwitanólido E 28- Hidroxiwitanólido E	[33]
	Ésteres glicósidos	C <sub>34</sub> H <sub>58</sub> O <sub>15</sub> C <sub>35</sub> H <sub>60</sub> O <sub>15</sub>	[36]
Fruto	Glucósidos	1-o-Trans-cinamoil- $\beta$ -d-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -d-glucopiranososa	[50, 51]

10 Propuesta de un marcador analítico como herramienta en la microencapsulación de un extracto con actividad antioxidante de cálices de *Physalis peruviana*

		(1s,2s)-1-Fenilpropano-1,2-diol 2-o-β-d-glucopiranosido p-Ment-4(8)-ene-1,2-diol 1-o-α-l-arabinopiranosil-(1-6)-β-d-glucopiranosido 1-Fenilpropane-1,2-diol y p-ment-4(8)-ene-1,2-diol 3-o-β-d-Glucopiranosil-(1→6)-β-d-glucopiranosido de etil3-hidroxi octanoato 3-o-β-l-Arabinopiranosil-(1→6)-β-d-glucopiranosido de butil (3r)-hidroxibutanoato 3-o-α-l-Arabinopiranosil-(1→6)-β-d-glucopiranosido de butil(3s)-hidroxibutanoato	
	Vitaminas	α, β y γ-Tocoferol Vitamina K1 Vitamina C Vitamina A β-Caroteno Ácidos grasos	[52]
	Witanóidos	4β-Hidroxiwitanólido E Witanólido E	[53]
	Alcaloides 41	Calisteginas A3, B1, B2, y C1	[54]
	Ésteres 42	Ésteres del ácido cinámico Ácido ascórbico Ácido 16-hidroxi oxohexadecanoico	[55]
<b>Raiz</b>	Alcaloides	Figrina Tigloidina Higrina	[40, 56]
	Witanóidos 48	Witaperuvina B Witaperuvina C Witaperuvina E Witaperuvina F Witaperuvina G Witaperuvina H Physoperuvin n-n-Dimetilisoperuvina	[33, 57-60]
<b>Planta entera</b>	Witanóidos 49, 50	17β-Hidroxi-14,20-epoxi-1-oxo-[22R]-3β-[O-β-D-glucopiranosil]-wita-5,24-dienólido 4β-Hidroxiwitanólido E (20R,22R)-5α,6β,14α,20,27-Pentahidroxi-1-oxowit-24-enólido (20S,22R)-5β,6β-Epoxy-4β,14β,15α-trihidroxi-1-oxowit-2,24-dienólido	[61, 62]
	Flavonoides 51	Quercetina Campferol	[24]
	Alcaloides 29, 52, 53	(+)-Physoperuvina trigloidina 3-α-tigloiloxitropano	[41, 63, 64]

Tomado de Bernal (2012) [65]

---

## 1.2 Marcadores químicos de un producto vegetal

Según la European Medicines Agency (EMA) [66], los marcadores son constituyentes químicos definidos o grupos de constituyentes de una preparación a base de plantas medicinales, que son de interés para propósitos de control de calidad; independientemente de su actividad terapéutica. Los marcadores, sirven para calcular la cantidad de sustancia vegetal en los productos de plantas medicinales; siempre y cuando, el marcador haya sido determinado cuantitativamente en la sustancia o preparación vegetal.

Los componentes activos en una sustancia vegetal y/o de preparación a base de hierbas en medicamentos herbarios consisten en mezclas complejas de componentes fitoquímicos. Un número limitado de preparados vegetales poseen componentes que son aceptados generalmente como los que contribuyen sustancialmente a su actividad terapéutica. Estos se definen como “componentes con actividad terapéutica conocida”. Sin embargo, para la mayoría de preparados vegetales, no se conocen los componentes o grupos de componentes responsables de la actividad terapéutica. En algunos casos, ciertos componentes o grupos de componentes pueden ser generalmente aceptados como que favorecen a la actividad terapéutica, pero no son responsables del efecto terapéutico completo. Tales componentes o grupos de componentes son útiles para fines de control y se definen como “marcadores activos”. Los marcadores analíticos son componentes o grupos de componentes que sirven únicamente para fines analíticos [66]. En resumen, la EMA reconoce:

- Constituyentes con actividad terapéutica conocida: Componentes que generalmente son aceptados por contribuir sustancialmente con la actividad terapéutica del material vegetal.
- Marcadores activos: Constituyentes o grupos de constituyentes que son aceptados por contribuir a la actividad terapéutica, pero no son responsables del efecto terapéutico completo.
- Marcadores analíticos: Los marcadores analíticos, corresponden a compuestos o clases de metabolitos secundarios que apoyan el seguimiento analítico en procesos de normalización o estandarización, así como el control de calidad de material

vegetal, extractos y fitoterapéuticos. Estos constituyentes no tienen actividad terapéutica necesariamente o ésta no ha sido evaluada. Se utilizan cuando no se conocen o no están disponibles principios activos o marcadores activos [67].

En general, los marcadores constituyen una herramienta importante para vincular la droga activa (preparación a base de material vegetal) al producto vegetal terminado independientemente de si tienen alguna actividad terapéutica o no. Es importante tener en cuenta que si están presentes los componentes con actividad terapéutica conocida, su contenido debe ser determinado cuantitativamente, sólo si no se conocen, pero se conoce un marcador activo, este marcador activo debe ser seleccionado para el análisis cuantitativo a menos que se justifique lo contrario. Sin embargo, si no es posible la selección de componentes responsables de la actividad terapéutica o de un marcador activo, para el análisis cuantitativo; debe seleccionarse un marcador analítico [66].

### 1.3 Sistemas Transportadores

Un sistema transportador o “carrier” se define como un sistema de entrega que incluye al fármaco, de tal manera que su estructura química es responsable de las propiedades del conjunto “vector - fármaco”. Por tanto, las propiedades físicoquímicas del transportador (tamaño, carga, mecanismo de liberación, etc.) son las responsables de las características del sistema, logrando entonces, dirigir su liberación hacia un blanco específico, mantener una liberación controlada y mejorar su estabilidad frente a condiciones ambientales y sistémicas [68, 69]. Por lo tanto, entre las múltiples ventajas aportadas a los fármacos, se pueden señalar las siguientes [70]:

- Protección del fármaco contra la inactivación.
- Mejoramiento del transporte de fármacos hasta los sitios diana.
- Aumento de la especificidad de acción y eficacia a nivel celular y/o molecular.
- Incremento de la vida media del fármaco en el organismo.
- Alteración de las características físico-químicas del fármaco y reducción de su inmunogenicidad y antigenicidad.
- Modificación de la distribución tisular del fármaco.

- 
- Modular la liberación del principio activo en el tiempo.
  - Mejoramiento en la penetración intracelular.

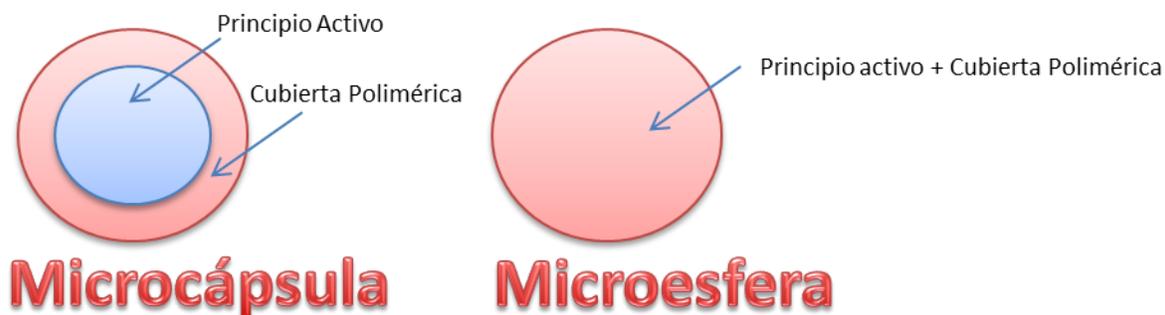
Según su naturaleza, los transportadores pueden ser de tipo biológico (eritrocitos, bacterias, virus, priones) y físico-químico [71]. Estos últimos, se pueden clasificar con base a su magnitud estructural, considerándose dos grandes grupos: Los moleculares que incluyen dendrímeros y ciclodextrinas, y los coloidales que incluyen micropartículas, nanopartículas y liposomas.

Los sistemas coloidales, principalmente las nano y micropartículas, son los transportadores más estudiados y exitosamente utilizados hasta el momento. Su reducido tamaño de partícula permite el fácil ingreso a nivel celular donde libera el fármaco permitiendo que ejerza su efecto. Esto ha hecho posible su utilización para la incorporación de compuestos sintéticos [72], proteínas [73], oligonucleótidos en terapias génicas [74], antirretrovirales [75], analgésicos [76], insecticidas [77], extractos de origen vegetal [78], entre otros.

### **1.3.1 Micropartículas**

Las micropartículas son partículas poliméricas esféricas con tamaños que oscilan en el rango micrométrico, en las que el principio activo se encuentra disuelto, atrapado, encapsulado y/o adsorbido en el seno de la matriz que forma el vehículo portador o vector [71]. En este grupo se encuentran las microcápsulas y las microesferas (Figura 1-4). Las microcápsulas son sistemas poliméricos de tipo reservorio o capsular, formados por una pared de polímero que posee en su interior un núcleo en donde se encuentra el material activo, que puede ser sólido o líquido, de tipo lipídico o no. Las microesferas son sistemas de tipo matricial, donde el material activo se encuentra disperso o solubilizado en el interior de una matriz polimérica [79].

**Figura 1- 4.** Tipos de Micropartículas



La microencapsulación de una sustancia se puede dar por una variedad de razones, algunas de estas se indican a continuación [80, 81]:

- Desarrollar sistemas de liberación modificada tipo “target” o de liberación controlada.
- Enmascarar características organolépticas desagradables de ciertos principios activos.
- Facilitar el manejo de fármacos nocivos.
- Transformar sustancias volátiles y oleosas o, extractos en materiales para compresión directa de tabletas evitando procesos de granulación, además de mejorar sus propiedades de flujo.
- Proteger los fármacos de condiciones ambientales que puedan inestabilizarlo, tales como humedad, luz, oxígeno o calor y biodegradación gastrointestinal.
- Mejorar la compatibilidad entre fármacos y excipientes formulados conjuntamente, como es el caso de vitaminas hidrosolubles y liposolubles en un mismo sistema de entrega.
- Facilitar el manejo de sustancias higroscópicas y tóxicas, tales como fumigantes, herbicidas, insecticidas y pesticidas.
- Reducir el efecto irritante causado por algunos fármacos en la mucosa gástrica.
- Modificar el estado físico, la microencapsulación permite transformar líquidos o gases en sólidos, de granulometría controlada, facilitando su manipulación, almacenamiento y transporte.
- Modificar la solubilidad de un fármaco.

- 
- Modificar la densidad de un principio activo para evitar su sedimentación en una suspensión.

Para la selección del método de elaboración de sistemas particulados se deben considerar las características fisicoquímicas de la sustancia activa y el efecto que se pretende lograr, en cuanto a absorción, distribución y eliminación [82, 83]. La formación de la partícula puede generarse a partir de polímeros generados *in situ*, macromoléculas naturales o polímeros preformados. Por otro lado, para el desarrollo de estos sistemas transportadores es necesario tener presente: Tipo de material, metodología de preparación, tamaño de las micropartículas, cantidad de fármaco incorporado, carga, fármaco liberado, efecto del almacenamiento, propiedades de la superficie, antigenicidad, biofase y toxicidad del sistema de liberación [84].

### **1.3.2 Microencapsulación de extractos vegetales**

Generalmente, los productos fitoterapéuticos se administran por vía oral, ya que es una vía segura, cómoda y económica. Sin embargo, es posible evidenciar desventajas para esta vía de administración, al emplear terapias basadas en preparaciones a base de sustancias vegetales, entre las que se pueden mencionar, baja absorción de metabolitos secundarios debido a su gran tamaño molecular, degradación por el pH gástrico, rápida metabolización por el hígado y eliminación rápida del cuerpo. Como consecuencia, la actividad farmacológica decrece. Por otro lado, desde el punto de vista físico-químico, estos materiales exhiben ya sea de baja permeabilidad o baja solubilidad en función de su composición, lo que dificulta su formulación en las formas de dosificación convencionales [85]. Por tal motivo, el estudio basado en la formulación de preparaciones a base de hierbas en sistemas transportadores tales como liposomas, micropartículas, nanopartículas, microemulsiones, nanoemulsiones y ciclodextrinas, son de gran pertinencia.

Entre los materiales vegetales empleados para el desarrollo de nuevos sistemas transportadores se encuentran, extractos de partes aéreas (como hojas, flores, frutos, semillas, tallos, madera, corteza, raíces, rizomas y otras partes de la planta), zumos naturales, gomas, aceites esenciales, resinas, entre otros. Cada uno de estos materiales,

empleados dada la presencia de metabolitos secundarios como los polifenoles, terpenos, alcaloides y cumarinas, en general, responsables de actividades farmacológicas tales como antioxidantes, anti-trombótica, hepatoprotectora, antitumoral, antibacteriana, anti-obesidad, antiulceroso, antifúngico, y cardioprotector (Tabla 1-4) [85].

**Tabla 1- 4.** Metabolitos secundarios estudiados para el desarrollo de nuevos sistemas de transporte de extractos vegetales

<b>Metabolito secundario</b>	<b>Actividad biológica</b>	<b>Sistema de transporte</b>	<b>Referencia</b>
<b>Polifenoles</b>	Antioxidante	Micropartículas	[86]
	Anti-inflamatorio	Liposomas	[87]
	Analgésico	Nanopartículas	[88]
	Hepatoprotector	Micro y nanoemulsiones	[89]
<b>Terpenos</b>	Hepatoprotector	Micropartículas	[90]
	Anticancerígeno	Liposomas	[91]
	Antibacterial	Nanopartículas	[92]
	Anticoagulante	Micro y nanoemulsiones	[93]
	Laxante	Ciclodextrinas	[94, 95]
	Regulador lipídico		
<b>Alcaloides</b>	Anorexígeno	Micropartículas	[96]
	Estimulante sexual	Liposomas	[97]
	Anti-inflamatorio		
	Analgésico		
	Inmunosupresor		
	Anticancerígeno		

<b>Anfetaminas</b>	Anorexígeno	Micropartículas	[96, 98]
	Estimulante sexual		
<b>Cumarinas</b>	Antioxidante	Micropartículas	[99]
	Antibacterial	Liposomas	[100]

En relación con las micropartículas, estas se han preparado a partir de materiales biocompatibles, no tóxicos y biodegradables, tales como polímeros semi-sintéticos (celulosas) y materiales naturales como, proteínas (ovoalbúmina, gelatina, caseína), gomas (acacia, alginato), carbohidratos (maltodextrinas, almidón modificado, ciclodextrinas) y quitosan. Diversas técnicas han sido utilizadas para obtener micropartículas entre las que se incluyen, emulsificación – evaporación del solvente, coacervación, gelificación iónica, y *spray-drying*. Este último, es el método más utilizado, ya que permite un fácil escalado de los procesos para ser empleados a nivel industrial [85].

Los polifenoles son metabolitos secundarios presentes en todas las plantas vasculares, y constituyen una gran familia de sustancias, las cuales tienen en común la presencia de uno o varios ciclos bencénicos que llevan una o varias funciones hidroxilo. Los polifenoles actúan como potentes inhibidores de enzimas que generan especies reactivas del oxígeno (ROS), como xantina oxidasa, la ciclooxigenasa y la lipoxigenasa. En la literatura se reportan variadas aplicaciones terapéuticas de estos compuestos además, son ampliamente utilizados en numerosos sectores de la industria alimentaria como aditivos naturales, así como en la industria cosméticas y fitofarmacéutica [101].

El uso de estos compuestos naturales se limita de acuerdo a la vía de administración, dependiendo su eficacia de la biodisponibilidad e integridad de la molécula. Por un lado, la administración por vía oral se ve limitada por el tiempo de residencia gástrica, la permeabilidad y/o solubilidad; además, se puede presentar inestabilidad en el tracto gastrointestinal (Tabla 1-5). Por su parte, el uso tópico de los polifenoles naturales se ve afectado debido a la sensibilidad a factores ambientales, ya que se pueden oxidar. Por otro lado, es importante tener en cuenta que un gran número de compuestos

polifenólicos procedentes de fuentes naturales en su forma libre, pueden mostrar una baja solubilidad en agua, además de presentar un sabor desagradable que debe ser enmascarado antes de su incorporación en los productos. Por lo tanto, en la administración de compuestos fenólicos podrían emplearse sistemas de transporte capaces de mantener la integridad estructural de la molécula hasta su administración, enmascarar su sabor, aumentar su solubilidad en agua y biodisponibilidad [101].

**Tabla 1- 5.** Absorción de compuestos fenólicos [102]

<b>Polifenoles</b>	<b>Fuentes</b>	<b>Absorción</b>
Antocianinas	Bayas	< 1%
Flavan-3-ols	Té, chocolate y extracto de semilla de uva	< 5%
Isoflavonas	Soya	< 1%
Flavonoles (Quercetina)	Alimentos de origen vegetal	3 – 7%
Flavanonas (Hesperidina)	Cítricos	3 – 9%
Estilbenos (Resveratrol)	Uva y vino	< 1%
Ácidos hidroxicinámicos	Café, tomate y cereales	1 – 25%

En la tabla 1-6, se resumen algunos reportes de estudios en los que se elaboran micropartículas a partir de polifenoles de fuentes naturales, aplicando diferentes tipos de métodos de obtención de las micropartículas.

**Tabla 1- 6.** Ejemplos de sistemas microparticulados como vehículos para polifenoles de fuentes naturales

<b>Fuente natural</b>	<b>Tipo de material herbal</b>	<b>Materiales de partida</b>	<b>Método preparación</b>	<b>Referencia</b>
<i>Ilex paraguensis</i>	No reportado	Clorhidrato de quitosano, tripolifosfato pentasódico	<i>Spray – drying</i>	[10]
<i>Olea europaea</i>	Extracto de hoja de olivo	HPMC, PVA, diclorometano, acetona, dióxido de silicio coloidal, talco, SDS	Emulsificación – evaporación del solvente	[86]
<i>Curcuma longa</i> L.	Curcumina - Oleoresina	Goma árabe, pululano, maltodextrina	<i>Spray – drying</i>	[103]
Hoja de frambuesa, Espino blanco, Hiedra, Milenrama, Ortiga y Hoja de olivo	Extracto fluido	Alginato de sodio, quitosano, ácido ascórbico, cloruro de calcio	Extrusión electrostática	[104]
<i>Ilex paraguariensis</i>	Extracto seco	Alginato de sodio, cloruro de calcio, quitosano, ácido acético	Gelificación iónica	[105]
<i>Ilex paraguariensis</i>	Extracto fluido	Alginato de sodio, cloruro de calcio, Buffer acetatos pH 5,5	Gelificación iónica	[106]
<i>Curcuma longa</i> L.	Extracto fluido	Dióxido de silicio coloidal, PVP	<i>Spray – drying</i>	[107]
Silimarina	Compuesto puro	HPMC - EC	Emulsificación – evaporación del solvente	[108]
		Eudragit® S 100 - Eudragit® RL	Emulsificación – evaporación del solvente	
(-)- Epigallocatechin-3-gallate	Compuesto puro	Eudragit® S 100, PVA	Emulsificación – evaporación del solvente	[109]
Quercetina	Compuesto puro	Quitosano – Goma xantana	<i>Spray – drying</i>	[110]
Curcumina	Compuesto puro	Eudragit® S 100	Emulsificación – evaporación del solvente	[111]
<i>Quercus resinosa</i>	Extracto	Caseinato de sodio, lactosa	<i>Spray – drying</i>	[112]
Gunpowder tea	Extracto	PLC	Precipitación inducida por un antisolvente supercrítico	[113]
<i>Ribes nigrum</i>	Extracto	B-glucano	Enfriamiento de emulsiones	[114]
Rutina y quercetina	Compuestos puros	Trimelitato de acetato de celulosa, acetato ftalato de celulosa	<i>Spray – drying</i>	[115]

## 1.4 Especies Reactivas del Oxígeno: Actividad antioxidante

Un radical libre es "cualquier especie química que en su estructura atómica posee uno o más electrones no apareados, por lo que presentan una configuración espacial que genera gran inestabilidad". El oxígeno molecular ( $O_2$ ) es, de hecho un birradical, que tiene dos electrones desapareados de espín paralelo, en sus orbitales exteriores ( $\uparrow$ ) ( $\uparrow$ ). Sin embargo, la reactividad del  $O_2$  se reduce debido a las direcciones paralelas de giro de estos electrones no apareados. Cuando el  $O_2$  reacciona con un átomo o molécula que presente la configuración de electrones desapareados más habitual ( $\uparrow$ ) ( $\downarrow$ ), este tiene la tendencia de tomar un electrón a la vez, lo que resulta en la formación del radical superóxido,  $O_2^{\cdot-}$  ( $\uparrow\downarrow$ ) ( $\uparrow$ ) [116]. El radical superóxido, que surge ya sea a través de procesos metabólicos o radiación física, es considerado como la principal especie reactiva del oxígeno (ROS), pudiendo interactuar con otras moléculas para generar ROS "secundarias", ya sea directamente o predominantemente a través de procesos catalizados por enzimas o metales [117].

La producción de superóxido se genera principalmente en la mitocondria celular. La cadena de transporte de electrones mitocondrial es la principal fuente de ATP en las células, por lo tanto es esencial para la vida. Sin embargo, durante la transducción de energía, un pequeño número de electrones se "fugan" al oxígeno prematuramente, formando el radical libre superóxido, el cual ha sido implicado en la fisiopatología de gran variedad de enfermedades [117].

El radical superóxido puede generar otros poderosos agentes oxidantes como el radical hidroxilo ( $HO\cdot$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Estas sustancias, incluyendo el superóxido, representan una amenaza potencial sobre muchas biomoléculas, particularmente proteínas y lípidos produciendo hidroperóxidos ( $ROOH$ ) que en presencia de iones metálicos como el hierro pueden generar radicales peróxido ( $ROO\cdot$ ) y peróxilo ( $RO\cdot$ ), los cuales pueden igualmente deteriorar ácidos grasos y otras biomoléculas [118].

A altas concentraciones, ROS pueden ser mediadores importantes de daños a estructuras celulares, ácidos nucleicos, lípidos y proteínas. El radical hidroxilo puede reaccionar con todos los componentes de la molécula de ADN, dañando las bases de purina y pirimidina, así como la columna de desoxirribosa [117].

Existen antioxidantes de origen natural para proteger las células y tejidos contra la producción continua de ROS durante el metabolismo normal. Estas defensas están compuestas de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (Tabla 1-7). Los antioxidantes enzimáticos como, superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa proporcionan la primera línea de defensa. Los captadores de radicales libres representan otra clase de antioxidantes, los cuales pueden retrasar o inhibir la oxidación de un sustrato. Además, aunque las proteínas plasmáticas que pueden quelar metales (transferrina, ceruloplasmina, albúmina, haptoglobina, y hemopexina) no interactúan ni descomponen directamente las ROS, se consideran antioxidantes porque se unen a metales activos redox, limitando la producción de radicales libres catalizados por metales [119].

**Tabla 1- 7.** Antioxidantes de origen natural propios del metabolismo normal [119]

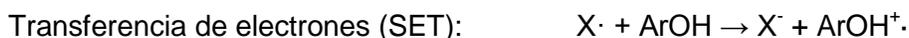
<b>Antioxidantes propios del metabolismo normal</b>		
<b>Enzimáticos</b>	<b>No enzimáticos</b>	
Superóxido dismutasa	Albúmina	Hemopexina
Catalasa	Ácido ascórbico	Piruvato
Glutatión peroxidasa	Bilirrubina	Grupos sulfidril
	Carotenoides	α – Tocoferol
	Ceruloplasmina	Transferrina
	Glucosa	Ubiquinol – 10
	Haptoglobina	Ácido úrico

Por otro lado, el daño generado por los radicales libres puede ser parcialmente limitado por la acción de compuestos antioxidantes naturales exógenos como los polifenoles. Este

grupo de compuestos comparten dos propiedades fundamentales que facilitan sus capacidades antioxidantes: la interacción con iones y/o proteínas, y la actividad de captación de radicales libres; por lo que pueden actuar a través de diferentes modos de acción: por complejación molecular con proteínas pro-oxidantes, por quelación de iones metálicos potencialmente pro-oxidantes ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ) o mediante la captura directa de las ROS [101].

Numerosos estudios *in vitro* han demostrado que los compuestos polifenólicos pueden captar directamente las especies moleculares de oxígeno activo, tales como el  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{HO}\cdot$ ,  $\text{RO}\cdot$ . De hecho, los polifenoles poseen características estructurales ideales para su acción antioxidante, debido principalmente a su capacidad para donar átomos de hidrógeno o electrones [101].

En el mecanismo de transferencia de átomos de hidrógeno (HAT), el antioxidante fenólico ( $\text{ArOH}$ ) reacciona con los radicales libres ( $\text{X}\cdot$ ) y se convierte en un radical libre ( $\text{ArO}\cdot$ ) mediante la transferencia de un átomo de hidrógeno a través de la ruptura homolítica del enlace OH. El segundo mecanismo es la transferencia de electrones (SET) de  $\text{ArOH}$  a un radical libre  $\text{X}\cdot$  con la formación de un catión radical estable ( $\text{ArOH}^{\cdot+}$ ). La estabilización de los radicales fenoxi resultantes,  $\text{ArO}\cdot$  y  $\text{ArOH}^{\cdot+}$ , es un resultado de la deslocalización de su electrón desapareado sobre el anillo aromático por resonancia o por efectos de hiperconjugación [101].



Para determinar la capacidad antioxidante mediante mecanismo SET, se pueden emplear ensayos *in vitro* como FRAP (*Ferric Reducing/Antioxidant Power*), ABTS (*ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)*) y DPPH (*radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil*), para el caso de mecanismos tipo HAT se emplea el ensayo *in vitro* de ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*).

## 2. Justificación

En las últimas décadas, se han invertido múltiples esfuerzos en la investigación de productos naturales, principalmente de tipo vegetal, descubriendo una importante potencialidad de estos materiales para el tratamiento de diferentes patologías, validando de esta manera su uso en la medicina tradicional.

Actualmente, la investigación para el desarrollo de productos a partir de materiales vegetales, se ha volcado hacia el uso de extractos vegetales, dado el alto costo a nivel industrial, que implica la purificación de compuestos desde productos naturales. Por lo tanto, a nivel tecnológico es de vital importancia el desarrollo de estrategias que permitan transformar las características fisicoquímicas, farmacocinéticas, farmacotécnicas y de estabilidad de los extractos, para su incorporación en una forma farmacéutica.

Una estrategia promisoría para la solución de estos problemas que se presentan en el sistema de entrega de extractos vegetales, es el desarrollo de los sistemas transportadores o “carriers”, los cuales permiten la incorporación de sustancias de tipo sólido y líquido, confiriéndoles las características del sistema transportador [68]. Los tres principales tipos de transportadores físicos son liposomas, micropartículas y nanopartículas.

La microencapsulación es el recubrimiento de materiales sólidos, líquidos o gaseosos con una película de material polimérico o graso, que origina partículas micrométricas de flujo libre. El producto de este proceso tecnológico se denomina “micropartícula”, que pueden ser de dos tipos: Microcápsula o microesfera, sistemas que se diferencian en su morfología y estructura interna [120].

En la elaboración de micropartículas a partir de compuestos sintéticos, naturales o biológicos, es necesario el seguimiento y control del proceso de microencapsulación a través de la caracterización de las micropartículas resultantes, para lo cual se desarrollan metodologías de cuantificación de los materiales que se pretenden incorporar en el sistema. En el caso de extractos vegetales, por ser mezclas de muchos compuestos, se

debe identificar plenamente una molécula, la cual será el marcador analítico que permitirá caracterizar las micropartículas. Por lo tanto, en el presente trabajo se pretende identificar un marcador analítico, como herramienta en la microencapsulación de un extracto de *P. peruviana* con actividad antioxidante.

## **3. Objetivos**

### **3.1 Objetivo General**

Proponer un marcador analítico como herramienta en la microencapsulación de un extracto o fracción de cálices de *Physalis peruviana* con actividad antioxidante.

### **3.2 Objetivos específicos**

- Evaluar la actividad antioxidante *in vitro* de extractos y fracciones de cálices de *Physalis peruviana*.
- Proponer un marcador analítico que permita realizar seguimiento al proceso de microencapsulación de un extracto o fracción de cálices de *Physalis peruviana* con actividad antioxidante.
- Desarrollar una metodología analítica para la cuantificación del marcador analítico propuesto para el seguimiento del proceso de microencapsulación.

## **4. Aislamiento e identificación de compuestos. Evaluación de la actividad antioxidante**

### **4.1 Metodología**

#### **4.1.1 Generalidades**

La cromatografía en capa delgada (CCD) se desarrolló en cromatoplasmas de sílica gel (0,2 mm de espesor), se eluyó con una fase móvil compuesta de AcOEt – Ac<sub>2</sub>O – AcOOH – Agua (6:2:1:1), revelando con una solución de sulfato cérico amónico al 1% en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (65% en EtOH) seguido de calentamiento. Para la cromatografía en columna (CC) se usó sílica gel (0,043-0,060 mm, Merck) y Sephadex® LH-20.

La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) preparativa, se realizó en un equipo Merck-Hitachi equipado con una bomba binaria isocrática L-6000A y un detector de arreglo de diodos (DAD) L-4250 (a 210 nm). Para el aislamiento, se utilizó una columna LiChrospher 100 RP-18 (250 x 10 mm i.d., 10 µm) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Los espectros de RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C mono- y bidimensionales se registraron en un espectrómetro Bruker AV-400 MHz (Bruker, Billerica, MA, EE.UU.) empleando solventes deuterados. Los espectros de ESI-MS fueron obtenidos en un equipo Shimadzu LC-MS que consta de una bomba LC-10Vp, desgasificador DGU-14a, detector UV-Vis SDP-Avp, interfaz SCL-10AVvp y detector de masas MS 2010 EV Shimadzu. Ionización por electrospray (ESI) en modo positivo, gas nebulizador de flujo de 1,5 L/min, detector de voltaje 1,5 kV, temperatura CDL 250°C. Se utilizaron solventes grado analítico (Merck-Alemania) y grado HPLC (Merck-Alemania).

### **4.1.2 Material vegetal**

Los cálices de *Physalis peruviana* fueron recolectados directamente por los comerciantes del fruto, en cultivos ubicados en Granada, Cundinamarca, los cuales fueron cuidadosamente seleccionados, eliminando aquellos dañados o contaminados. Un espécimen completo de la planta fue identificado y clasificado por el Herbario Nacional de Colombia – Universidad Nacional de Colombia y una muestra quedó depositada en sus archivos como referencia (COL-512200).

El material fue sometido a sequedad en un horno con flujo de aire a 40°C durante 48 horas. Posteriormente, el material seco fue molido.

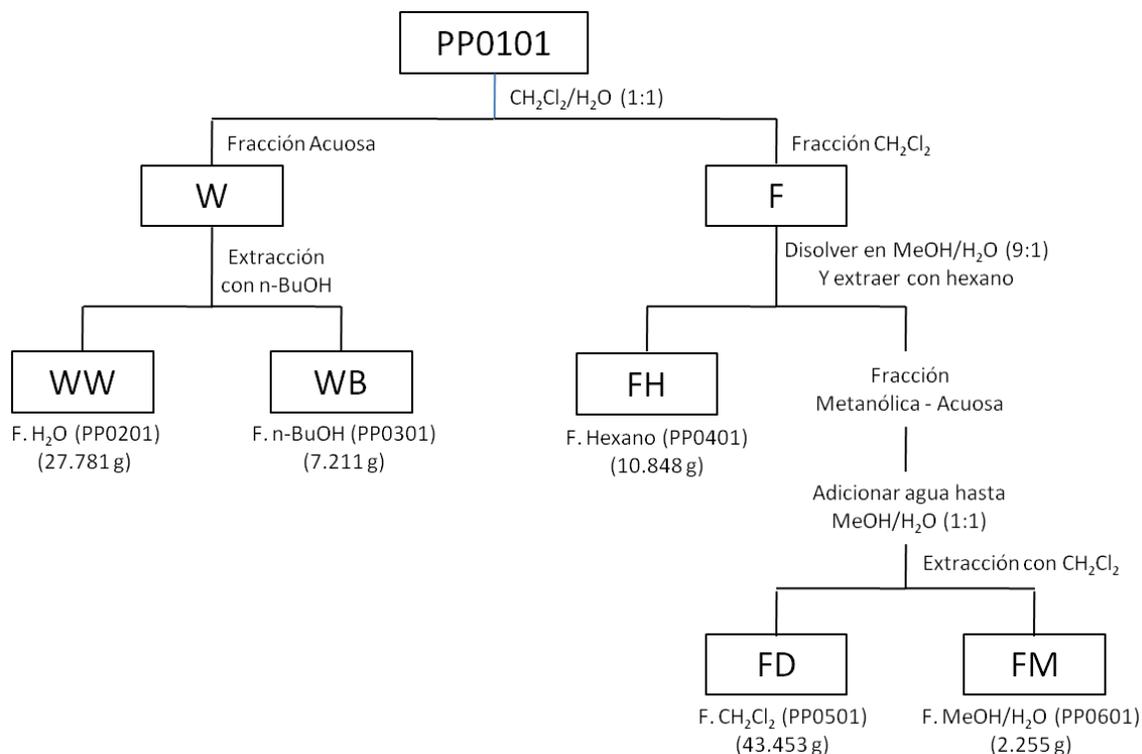
### **4.1.3 Obtención del extracto crudo**

El material vegetal seco y molido (840,0 g) fue extraído tres veces por percolación con EtOH, cada vez con 9,5 L durante 48 horas. El extracto obtenido (172,4 g) se concentró bajo presión reducida en un rotaevaporador hasta obtener un extracto de consistencia semiblanda, el cual fue identificado como PP0101.

### **4.1.4 Fraccionamiento del extracto crudo**

El extracto crudo PP0101 (100,17 g) se fraccionó siguiendo el método modificado de Kupchan [121] (Figura 4-1).

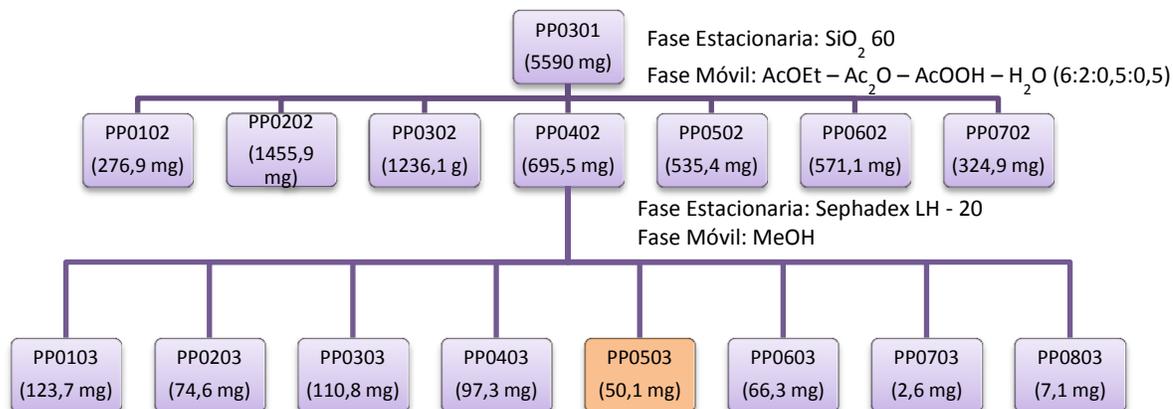
**Figura 4- 1.** Método modificado de Kupchan para el fraccionamiento del extracto crudo (PP0101) de *Physalis peruviana*



En adelante, el aislamiento del marcador analítico se hizo de manera bioguiada, en función de los resultados obtenidos en los modelos de actividad antioxidante *in vitro* (Ver Tabla 4-1). A partir de estos ensayos, se seleccionó la fracción butanólica (PP0301) para realizar la purificación e identificar el marcador analítico, dada su actividad antioxidante en las diferentes metodologías de evaluación.

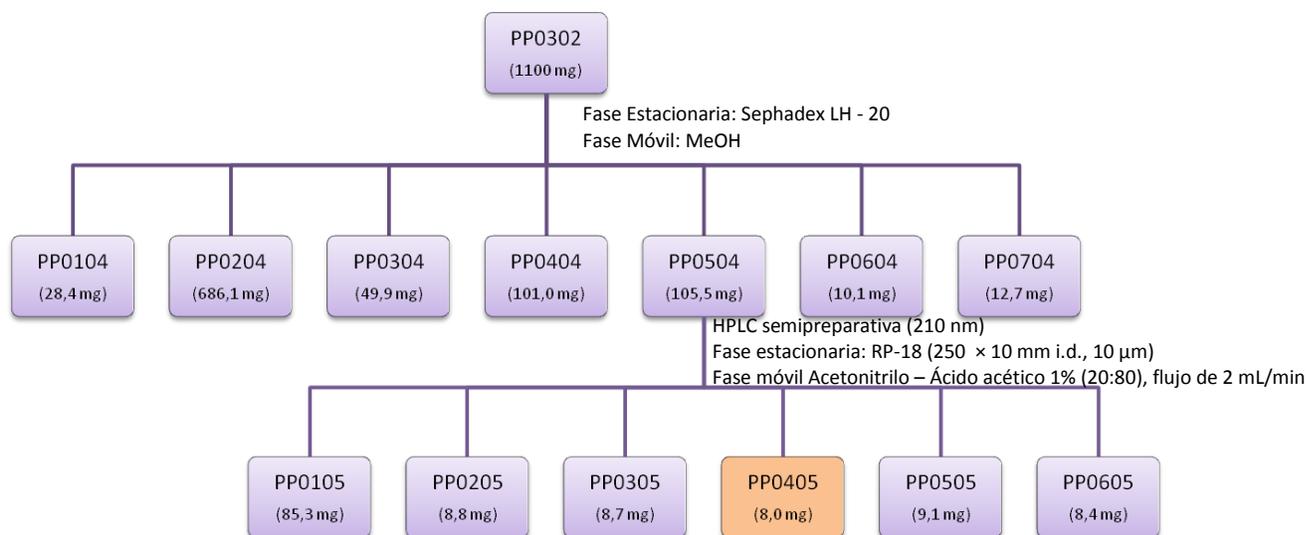
Inicialmente, la fracción PP0301 se eluyó en una columna por gravedad con sílica 60 utilizando como fase móvil  $\text{AcOEt} - \text{Ac}_2\text{O} - \text{AcOOH} - \text{H}_2\text{O}$  (6:2:0,5:0,5), obteniendo 7 fracciones. Posteriormente, la fracción PP0402 fue separada por Sephadex LH-20 utilizando como fase móvil MeOH, obteniendo 8 fracciones, de las cuales la fracción PP0503 correspondió a un compuesto puro. El seguimiento a las fracciones en cada una de las cromatografías en columna se realizó por CCD con la metodología descrita en la sección 4.1.1. En la figura 4-2 se resume la partición de la fracción PP0301.

**Figura 4- 2.** Esquema de fraccionamiento de la fracción PP0301 a través de cromatografía en columna



Por otra parte, la fracción PP0302, obtenida a partir del fraccionamiento de la fracción butanólica PP0301 (Figura 4-2), se eluyó en una columna Sephadex LH-20 utilizando como fase móvil MeOH, obteniendo 7 fracciones. Posteriormente, la fracción PP0504 se separó por HPLC semipreparativa utilizando una fase estacionaria RP-18 (250 × 10 mm i.d., 10  $\mu\text{m}$ ) y como fase móvil Acetonitrilo – Ácido acético 1% (20:80) con un flujo de 2 mL/min, realizando la detección a una longitud de onda de 210 nm. Se obtuvieron 6 fracciones, siendo la fracción PP0405 un compuesto puro. En la figura 4-3 se resume la partición de la fracción PP0302.

**Figura 4- 3.** Esquema de fraccionamiento de la fracción PP0302 a través de cromatografía en columna y HPLC semipreparativa



Las fracciones identificadas como PP0503 y PP0405 fueron caracterizadas a través de RMN- $H^1$ , RMN- $C^{13}$  y espectroscopía de masas.

#### 4.1.5 Actividad Antioxidante *in vitro*

Para determinar la fracción a utilizar en los procedimientos de purificación del marcador analítico, se realizó una primera evaluación de la capacidad antioxidante *in vitro* mediante metodologías estandarizadas, como FRAP, ABTS, DPPH y ORAC. Posteriormente, se realizaron pruebas de captación de radicales específicos (superóxido y óxido nítrico) con metodologías previamente estandarizadas en el Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia [122].

##### 4.1.5.1 FRAP (*Ferric Reducing/Antioxidant Power*)

El ensayo de FRAP consiste en la reducción del complejo de la tripiridiltriazina férrica al complejo ferroso por un antioxidante en medio ácido [123], generando un cambio de color que es monitorizado midiendo la absorbancia a 595 nm durante 30 minutos (Anexo A) [124].

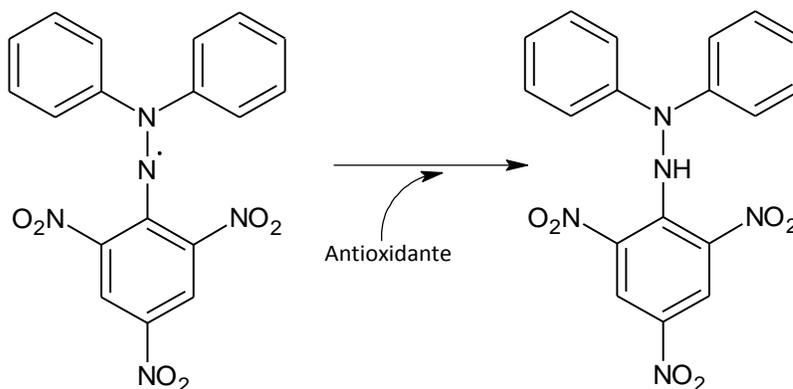
#### 4.1.5.2 ABTS (*ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico*)

El ensayo de ABTS se basa en la capacidad de los antioxidantes para capturar el radical catiónico ABTS<sup>•+</sup> (ácido 2,2' azinobis-3-etilbenzotiazolina-6- sulfónico), captura que produce un descenso en la absorbancia a 658 nm (Anexo A) [125].

#### 4.1.5.3 DPPH (*radical 2,2difeníl-1-picrilhidrazi*)

En este método se sitúa el DPPH<sup>•</sup>, un radical orgánico, en presencia del antioxidante y se ve en qué grado es capturado (Figura 4-4), lo que produce un descenso de la absorbancia a 515 nm (Anexo A) [126].

**Figura 4- 4.** Captación del radical DPPH



#### 4.1.5.4 ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*)

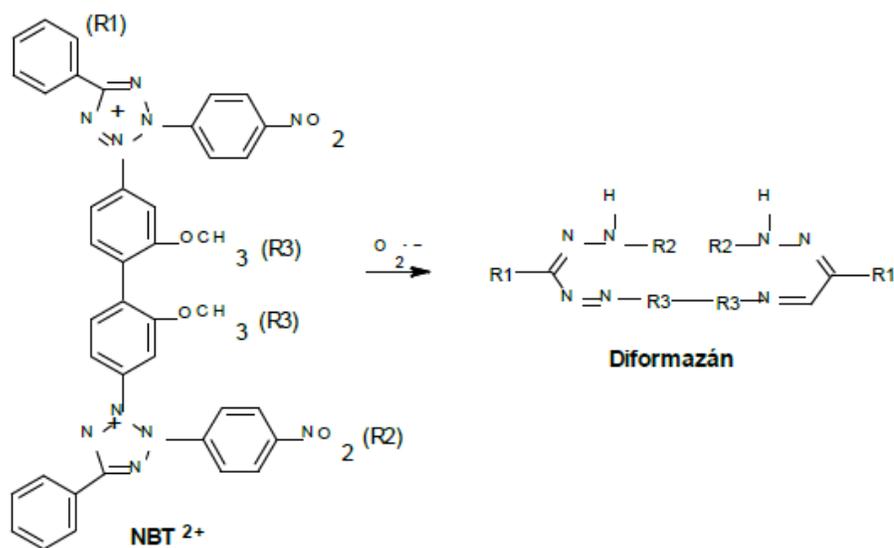
En este método se mide la capacidad de captación de un radical específico, el peroxilo, generado a partir de la molécula orgánica AAPH, que se trata de un iniciador de tipo azo. Estos radicales atacan a la molécula de fluoresceína, produciendo fluoresceína oxidada, que ya no emite fluorescencia (longitud de onda de excitación 493 nm y de emisión 515 nm). En presencia de antioxidantes, éstos reaccionan con los radicales peroxilo y la fluoresceína mantendrá la misma emisión de fluorescencia (Anexo A) [127].

Los resultados que aportan los ensayos de actividad antioxidante con radicales sintéticos permiten un acercamiento inicial al conocimiento de la capacidad antioxidante del extracto evaluado pero muy poco a su posible uso terapéutico. Por ese motivo es recomendable desafiar el extracto frente a radicales libres de relevancia biológica tales como los radicales superóxido y óxido nítrico.

#### 4.1.5.5 Captación del anión superóxido generado por el sistema Hipoxantina/Xantina Oxidasa

En este ensayo el radical superóxido generado por la acción de la xantina oxidasa sobre el sustrato hipoxantina produce radicales superóxido los cuales reaccionan con el NBT (Nitro Blue Tetrazolium) para formar un compuesto diformazán que posee un máximo de absorbancia de 560 nm (Figura 4-5). Los captadores del radical disminuyen la velocidad de formación del cromóforo, disminuyendo el delta de absorción producido a esta longitud de onda (Ver Anexo A) [128].

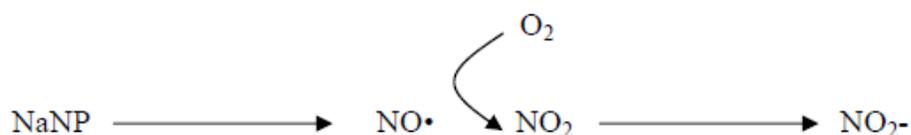
Figura 4- 5. Reducción del NBT a diformazán por efecto del radical superóxido



#### 4.1.5.6 Medida de la captación de óxido nítrico (NO•)

En este ensayo el óxido nítrico es generado por el nitroprusiato de sodio (NaNP), produciéndose de manera espontánea en solución acuosa a pH 7.4. El óxido nítrico reacciona con el oxígeno para producir nitritos (Figura 4-6), por tanto, aquellos compuestos que tengan la capacidad de captar el óxido nítrico van a reducir la formación de estos. Los iones nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) son muy estables y pueden ser fácilmente determinados mediante un sencillo ensayo espectrofotométrico basado en la reacción de Griess (Anexo A) [36].

Figura 4- 6. Formación del óxido nítrico y su reacción con oxígeno



De acuerdo a los resultados obtenidos en la captación de óxido nítrico se decidió realizar un ensayo de actividad antiinflamatoria *in vivo* y determinar si las muestras presentan alguna acción terapéutica de este tipo.

#### 4.1.5.7 Edema Auricular inducido por TPA

Para evaluar la actividad antiinflamatoria *in vivo* se empleó el ensayo de edema auricular inducido por TPA, el cual consiste en la inducción de la inflamación en la oreja del ratón, por aplicación de un agente irritante como es el acetato de 13-O-tetradecanoilforbol (TPA), logrando determinar el posible efecto antiinflamatorio de una sustancia, mediante la administración de esta a un grupo de animales y comparando el edema alcanzado en este grupo frente a un grupo control.

En el ensayo se emplearon ratones ICR hembras de 14 – 18 semanas de edad y con un peso aproximado de 30 g. Los animales fueron suministrados por el Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, donde se mantuvieron en un

ambiente controlado ( $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ ,  $70\pm 5\%$  de humedad relativa y ciclos de 12h de luz/oscuridad), con alimento y agua *ad libitum*. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo a las consideraciones éticas de cuidado y uso de animales. Esta investigación fue aprobada por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia (Ley 04/2013).

Para el desarrollo del ensayo se administra a cada ratón ( $n = 10$  ratones por grupo) el tratamiento (extractos e indometacina) por vía tópica en la superficie interna y externa de la oreja derecha (0,5 mg/oreja). Para inducir la inflamación, inmediatamente después de la administración del tratamiento, una solución de TPA en acetona (0,125 mg/mL) se aplicó por vía tópica en la superficie interna y externa de la oreja derecha (10  $\mu\text{L}$ /lado). Después de cuatro horas, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se tomaron secciones circulares (7 mm de diámetro) de la oreja derecha e izquierda, las cuales se pesaron para determinar el edema.

Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición del edema (Ecuación 4-2).

**Ecuación 4- 1.** Porcentaje de inhibición de edema auricular

$$\%Inhibición = \frac{(P_t - P_{nt})_{control} - (P_t - P_{nt})_{tratamiento}}{(P_t - P_{nt})_{control}}$$

$P_t$  es el peso de la sección de la oreja tratada y  $P_{nt}$  es el peso de la sección de la oreja no tratada [27].

#### 4.1.5.8 Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos fueron expresados como la media aritmética de los valores  $\pm$  desviación estándar. Los datos fueron analizados mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de test de Tukey. Para procesar los datos se utilizó el paquete estadístico comercial GrapPadPrism®.

## 4.2 Resultados y discusión

### 4.2.1 Obtención de extractos

La extracción de los cálices de *P. peruviana* con EtOH (Figura 4-7) presentó un rendimiento de 20,5% con respecto al material vegetal pulverizado. El extracto crudo (PP0101) se mantuvo bajo refrigeración hasta su fraccionamiento con solventes de alta, media y baja polaridad. A partir del fraccionamiento de PP0101 se obtuvieron cinco fracciones, PP0201 (Acuosa), PP0301 (n-BuOH), PP0401 (Hexano), PP0501 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) y PP0601 (MeOH/H<sub>2</sub>O), con rendimientos de 27,7%, 7,2%, 10,8%, 43,4% y 2,2%, respectivamente.

**Figura 4- 7.** Extracción de los cálices de *Physalis peruviana* por percolación con Etanol



### 4.2.2 Actividad antioxidante

Con la finalidad de seleccionar una fracción para la purificación del marcador analítico del extracto de cálices de *P. peruviana*, se evaluó la capacidad antioxidante de cada una de

las fracciones, incluyendo el extracto crudo, utilizando diferentes metodologías. Los resultados de esta valoración se encuentran consignados en las Tabla 4-1.

**Tabla 4- 1.** Capacidad antioxidante *in vitro* de las fracciones de los cálices de *Physalis peruviana*

Fracción	ABTS ( $\mu\text{mol Trolox/g F}$ )	ORAC ( $\mu\text{mol Trolox /g F}$ )	DPPH ( $\mu\text{mol Trolox/g F}$ )	FRAP ( $\mu\text{mol Trolox/g F}$ )
PP0101	405,41 $\pm$ 19,48 <sup>a</sup>	50,83 $\pm$ 2,05 <sup>c, d, e, f</sup>	198,29 $\pm$ 1,40 <sup>m</sup>	42,96 $\pm$ 3,50
PP0201	245,40 $\pm$ 15,74	50,07 $\pm$ 1,13 <sup>c, g, h, i</sup>	187,50 $\pm$ 1,08	138,58 $\pm$ 6,17
PP0301	656,31 $\pm$ 6,43	51,29 $\pm$ 1,66 <sup>d, g, j, k</sup>	198,03 $\pm$ 1,54 <sup>m</sup>	922,88 $\pm$ 20,77
PP0401	12,60 $\pm$ 3,30 <sup>b</sup>	45,12 $\pm$ 2,05 <sup>l</sup>	157,58 $\pm$ 0,32	75,19 $\pm$ 7,71 <sup>n</sup>
PP0501	5,66 $\pm$ 1,72 <sup>b</sup>	48,97 $\pm$ 1,26 <sup>e, h, j, l</sup>	178,28 $\pm$ 1,02	82,35 $\pm$ 8,70 <sup>n</sup>
PP0601	429,83 $\pm$ 9,23 <sup>a</sup>	54,37 $\pm$ 1,46 <sup>f, i, k</sup>	240,81 $\pm$ 1,37	231,14 $\pm$ 13,60

F: Fracción. Los datos se presentan como la media de las observaciones  $\pm$  desviación estándar.

Los resultados fueron analizados mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de test de Tukey, las fracciones que no presentan diferencias significativas ( $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$ ,  $P < 0,001$ ) fueron identificadas con las letras a – n.

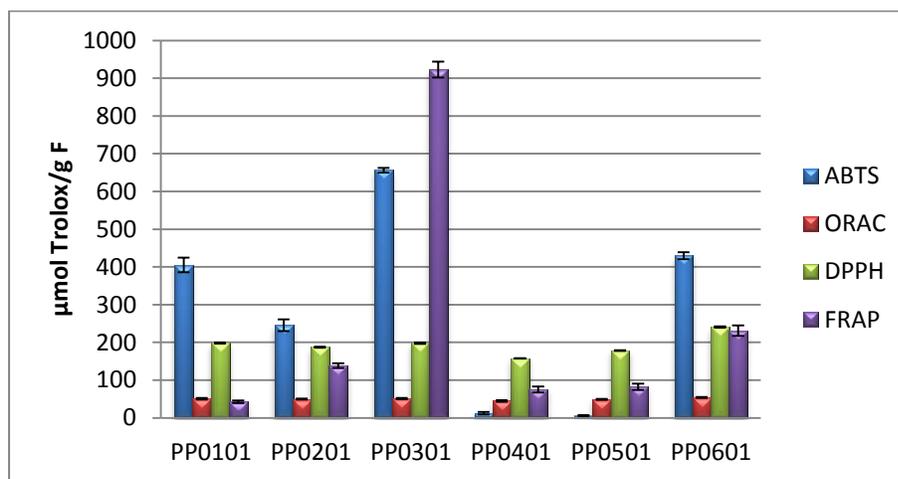
Los ensayos de actividad antioxidante con radicales sintéticos se desarrollaron utilizando una curva de calibración de actividad de Trolox en cada uno de los casos (ABTS, ORAC, DPPH y FRAP), con la finalidad de interpolar los resultados de cada una de las fracciones y expresarlos en función de equivalentes de Trolox. Lo anterior, dado que el objetivo es la comparación entre grupos para definir la fracción a utilizar en los subsiguientes procesos de aislamiento y purificación del marcador analítico.

Los resultados de actividad antioxidante fueron analizados mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de test de Tukey, con la finalidad de determinar si existen diferencias significativas entre cada fracción, y así seleccionar aquella que presente mejor actividad frente a las demás fracciones (Tabla 4-1).

Al comparar los resultados de actividad antioxidante en los ensayos de ABTS, DPPH y FRAP a través de la prueba de Tukey, se tiene que los resultados son significativamente diferentes, a excepción de las duplas: PP0101 - PP0601 y PP0401 – PP0501 que no son estadísticamente diferentes en el ensayo de ABTS, PP0101 – PP0301 que no son estadísticamente diferentes en el ensayo de DPPH y, PP0401 – PP0501 que no son estadísticamente diferentes en el ensayo de FRAP. Por otro lado, en el caso del ensayo de ORAC se tiene que los resultados no son estadísticamente diferentes, a excepción de la fracción PP0401 que resulta ser significativamente diferente a las demás.

Por lo anterior, para tomar una decisión en torno a la selección de la fracción a aislar se deben tener en cuenta principalmente los ensayos de ABTS, DPPH y FRAP. En este sentido, la fracción **PP0301** es la que expone una mejor actividad respecto a las demás fracciones, como se puede evidenciar con mayor claridad en la gráfica 4-1.

**Figura 4- 1.** Capacidad antioxidante *in vitro* de las fracciones de los cálices de *Physalis peruviana*



Los datos se presentan como la media de las observaciones  $\pm$  desviación estándar

Con el fin de complementar la información obtenida con los radicales sintéticos, se decidió llevar a cabo ensayos de generación de radicales *in situ* tales como superóxido y óxido nítrico, propios de un sistema vivo. Los resultados de estos se presentan en las tablas 4-3 y 4-4.

**Tabla 4- 2.** Capacidad antioxidante de las fracciones de los cálices de *Physalis peruviana* frente al radical superóxido

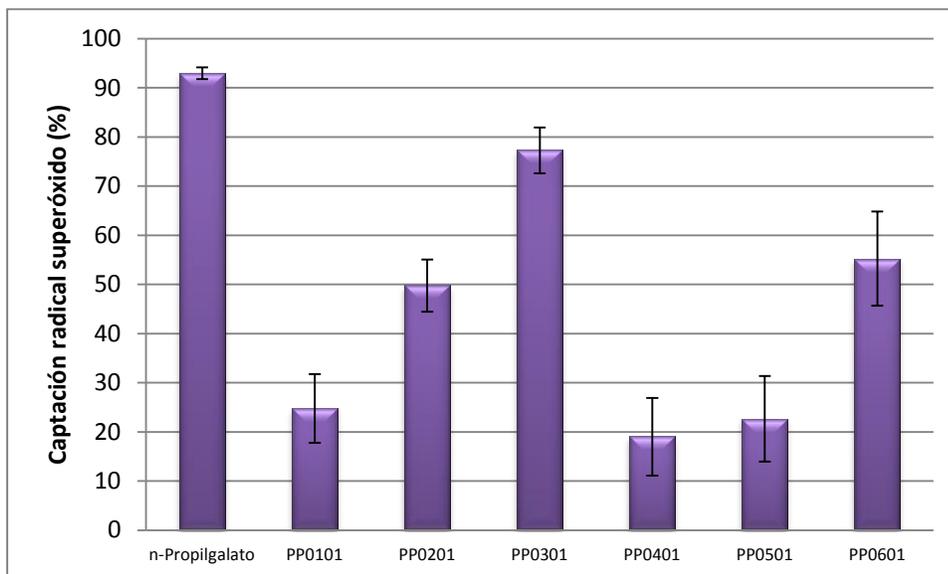
Muestra	Delta de la Absorbancia x 1000	Captación del radical superóxido (%)
Control	464,17 ± 19,70	0
n-propilgalato	31,24 ± 5,31***	92,9 ± 1,2
PP0101	353,25 ± 11,14**	24,8 ± 7,0
PP0201	212,65 ± 10,64***	49,7 ± 5,3
PP0301	97,06 ± 15,93***	77,3 ± 4,6
PP0401	412,90 ± 36,20*	19,0 ± 7,9
PP0501	365,50 ± 27,76**	22,6 ± 8,7
PP0601	228,10 ± 5,76***	55,2 ± 9,6

Los datos se presentan como la media de las observaciones ± desviación estándar. Prueba de Dunnett,

\*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001 en comparación con el grupo de control

En el sistema xantina/xantina oxidasa el radical superóxido promueve la conversión del NBT a diformazán, por tanto un captador del radical inhibirá esta transformación. Para este ensayo se utilizó como patrón el n-propilgalato, produciendo una inhibición de 92,9 ± 1,2%. Por su parte, cada una de las fracciones evaluadas presentaron inhibición del radical superóxido entre un 19,0 ± 7,9% (PP0501) y un 77,3 ± 4,7% (PP0301). La mejor actividad captadora de superóxido la presentaron las fracciones PP0201 (49,8 ± 5,3%), PP0301 (77,3 ± 4,6%) y PP0601 (55,2 ± 9,6) (Gráfica 4-2).

**Gráfica 4- 2.** Capacidad antioxidante de las fracciones de los cálices de *Physalis peruviana* frente al radical superóxido



Los datos se presentan como la media de las observaciones  $\pm$  desviación estándar

**Tabla 4- 3.** Capacidad antioxidante de las fracciones de los cálices de *Physalis peruviana* frente al radical óxido nítrico

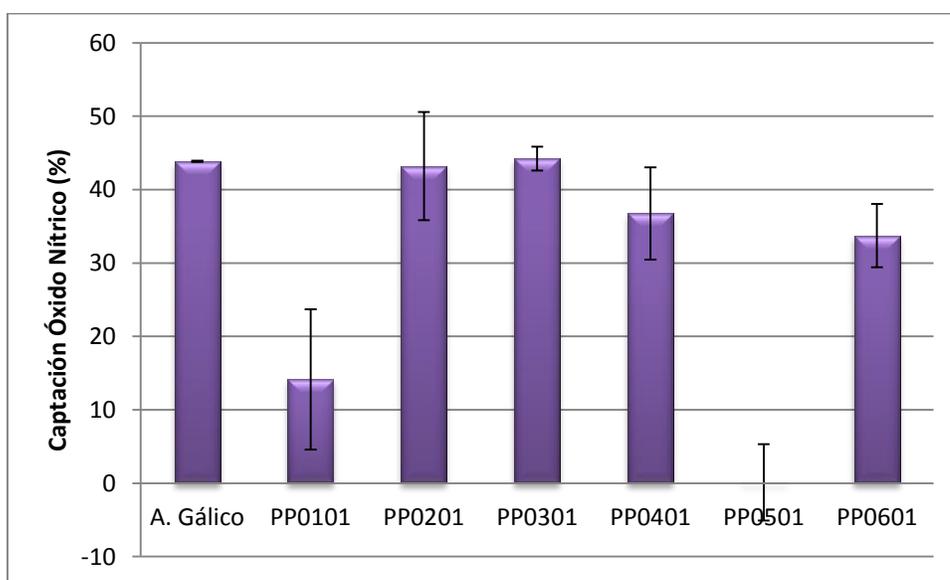
Muestra	Absorbancia	Captación del óxido nítrico (%)
Control	0,867 $\pm$ 0,101	-----
Ácido gálico	0,552 $\pm$ 0,001***	43,9 $\pm$ 0,1
PP0101	0,765 $\pm$ 0,069	14,1 $\pm$ 9,6
PP0201	0,556 $\pm$ 0,053***	43,2 $\pm$ 7,4
PP0301	0,549 $\pm$ 0,012***	44,2 $\pm$ 1,6
PP0401	0,603 $\pm$ 0,045***	36,7 $\pm$ 6,3
PP0501	0,866 $\pm$ 0,037	0,1 $\pm$ 5,2
PP0601	0,624 $\pm$ 0,031***	33,7 $\pm$ 4,0

Los datos se presentan como la media de las observaciones  $\pm$  desviación estándar. Prueba de Dunnett,

\*\*\*P<0,001 en comparación con el grupo de control

El ácido gálico muestra un significativo efecto captador de radicales NO•, con un porcentaje de captación de  $43,9 \pm 0,1\%$ . Por su parte, las fracciones de *P. peruviana* a 10 mg/mL también muestran un significativo efecto captador con porcentajes de captación alrededor del 40%, con excepción de las fracciones PP0101 con un porcentaje  $14,1 \pm 9,6\%$  y PP0501 que no expone actividad (Gráfica 4-3).

**Gráfica 4- 3.** Capacidad antioxidante de las fracciones de los cálices de *Physalis peruviana* frente al radical óxido nítrico



Los datos se presentan como la media de las observaciones  $\pm$  desviación estándar

Numerosos artículos publican una alta capacidad antioxidante de *P. peruviana*, tanto de frutos como de partes aéreas, donde se exponen correlaciones entre la capacidad antioxidante y el contenido de fenoles. Encina *et al.* (2004), determinaron la capacidad antioxidante de frutos por el método de DPPH y ABTS, resultando en  $249,23 \pm 8,01 \mu\text{g eq trolox/g}$  y  $288,95 \pm 3,62 \mu\text{g eq trolox/g}$ , respectivamente, y presentando un contenido de compuestos fenólicos de  $79,23 \pm 0,41 \text{ mg ácido clorogénico/100 g}$  [129]. Por otro lado, Wu *et al.* (2005), determinaron que a partir de un extracto etanólico de la planta entera a  $100 \mu\text{g/mL}$ , se obtiene un potente efecto inhibidor ( $82,3\%$ ) de la peroxidación lipídica *in-vitro* inducida por  $\text{FeCl}_2$  - ácido ascórbico, en homogenizado de hígado de ratas. Los resultados también mostraron que la inhibición de la formación de malondialdehído (MDA), producto de la peroxidación lipídica, aumenta con concentraciones crecientes de

---

los extractos de *P. peruviana* y  $\alpha$ -tocoferol. Además, a concentraciones de 10 – 100  $\mu\text{g/mL}$ , este extracto también demostró una considerable captación del anión superóxido (49,2 – 100,0%) y un importante efecto inhibitor sobre la actividad de la xantina oxidasa (59,1 – 100,0%) [3]. Resultados comparables con estudios posteriores de Wu *et al.* (2006), en los que se determinó la actividad antioxidante a hojas de *P. peruviana* extraídas con fluidos supercríticos, los cuales tenían alto contenido de flavonoides ( $234,63 \pm 9,61$  mg/g) y fenoles totales ( $90,80 \pm 2,21$  mg/g), encontrando que a concentraciones de 0,1 – 30  $\mu\text{g/mL}$ , este extracto presenta una considerable captación del anión superóxido (29,24 – 69,48%) y un importante efecto inhibitor sobre la actividad de la xantina oxidasa (30,69 – 67,22%) [4].

Ramadán y Moersel (2007) determinaron la actividad antioxidante del jugo del fruto de *P. peruviana* en un modelo de DPPH, señalando que la capacidad antioxidante de esta fruta se relaciona con su contenido bioactivo liposoluble, tocoferoles, esteroides y carotenoides [130]. Demir *et al.* (2014), investigaron la capacidad captadora de DPPH en frutos, reportando un  $\text{IC}_{50}$  de  $0.43 \pm 0.003$  mg/mL [131]. Por su parte, Vasco *et al.* (2008), reporta una actividad antioxidante de  $0,7 \pm 0,4$   $\mu\text{mol trolox/g}$  frente a DPPH y valores menores a 20  $\mu\text{mol trolox/g}$  para ABTS y FRAP, lo anterior relacionado al bajo contenido de fenoles totales encontrados ( $87 \pm 19$  mg equivalentes ácido gálico/100 g muestra) [132].

Por otro lado, la actividad antioxidante *in vivo* a través de modelos como el de hepatotoxicidad inducida con  $\text{CCl}_4$ , se ha reportado. Toro *et al.* (2013), determinaron que el extracto evaluado de cálices de *P. peruviana* inhibió significativamente ( $P < 0,001$ ) el estrés oxidativo causado a nivel hepático por el  $\text{CCl}_4$ , manteniendo las actividades de superóxido dismutasa y catalasa con valores cercanos a los normales. Además, el extracto también redujo significativamente los niveles de las enzimas hepáticas que fueron incrementados después de la administración de  $\text{CCl}_4$ , por lo que estos resultados sugieren que el extracto posee un efecto hepatoprotector relacionado con su actividad antioxidante, especialmente en lo referente a la inhibición de la peroxidación lipídica [25]. Arun *et al.* (2006), exponen que extractos de *P. peruviana* muestran actividad antihepatotóxica evaluada a partir de enzimas marcadoras y cambios histopatológicos

inducidos por CCl<sub>4</sub>, los cuales se redujeron significativamente por la administración de los extractos [24].

Con el fin de establecer si la actividad antioxidante observada estaba relacionada con la actividad anti-inflamatoria, el extracto crudo y las fracciones obtenidas de los cálices de *P. peruviana* se evaluaron a través del modelo de edema auricular con TPA. Los resultados de la actividad anti-inflamatoria estudiada se muestran en la Tabla 4-5. Lo anterior dado que, el óxido nítrico es sintetizado por muchos tipos de células implicadas en procesos de inmunidad e inflamación. A altas concentraciones, el NO se oxida rápidamente a especies reactivas de nitrógeno (RNS) que median la mayor parte de los efectos inmunológicos [133]. Ciertos tipos de lesión tisular inflamatoria están mediados por ROS y RNS. Tanto ROS y RNS pueden perpetuar la inflamación. En particular, el óxido nítrico es una molécula mensajera importante para las enfermedades inflamatorias. La administración de antioxidantes específicos son efectivos para atenuar la inflamación de los tejidos [134]. Por esta razón, se examinó el efecto antiinflamatorio del extracto crudo y fracciones.

**Tabla 4- 4.** Actividad antiinflamatoria *in-vivo* de las fracciones de los cálices de *Physalis peruviana*

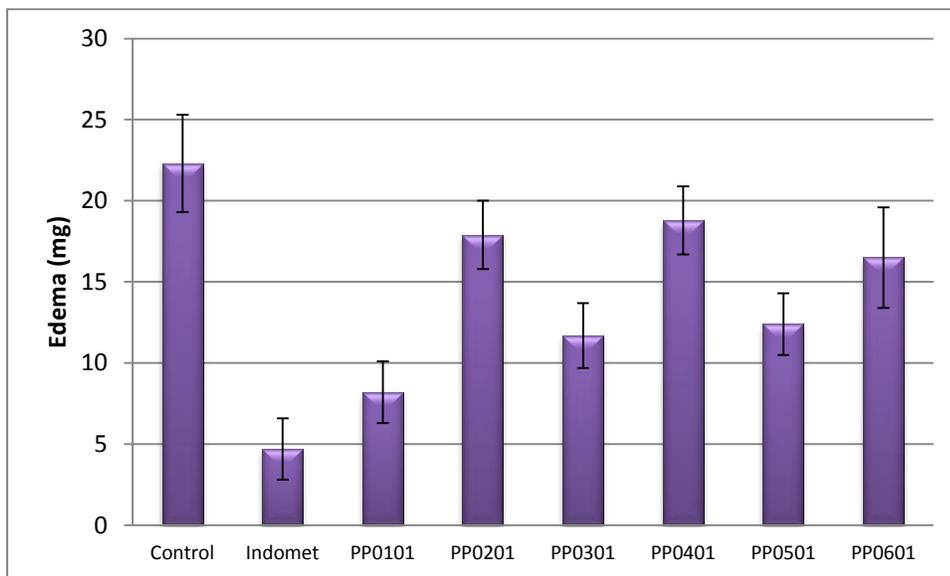
Grupo	Edema (mg)	%Inhibición
Control	22,3 ± 3,0	-----
Indometacina	4,7 ± 1,9***	78,9 ± 8,7
PP0101	8,2 ± 1,9***	63,5 ± 8,6
PP0201	17,9 ± 2,1***	19,6 ± 9,4
PP0301	11,7 ± 2,0***	47,6 ± 8,9
PP0401	18,8 ± 2,1*	15,9 ± 9,3
PP0501	12,4 ± 1,9***	44,2 ± 8,6
PP0601	16,5 ± 3,1***	26,0 ± 14,1

Los datos se presentan como la media de las observaciones ± desviación estándar. (n = 10 ratones ICR).

Prueba de Dunnett, \*P<0,05, \*\*\*P<0,001 en comparación con el grupo de control

La administración tópica de las fracciones reduce significativamente el edema auricular inducido por el TPA, mostrando la más alta actividad las fracciones PP0101, PP0301 y PP0501, con porcentajes de inhibición de 63,5%, 47,6% y 44,2%, respectivamente (Gráfica 4-4).

**Gráfica 4- 4.** Actividad antiinflamatoria *in-vivo* de las fracciones de los cálices de *Physalis peruviana*



Los datos se presentan como la media de las observaciones  $\pm$  desviación estándar

Franco *et al.* (2007), evaluó seis fracciones provenientes de un extracto etéreo de cálices de *P. peruviana* en el modelo inflamatorio de TPA, encontrando una actividad significativa ( $P < 0,05$ ), en la que la fracción mayoritaria presentó una respuesta dosis – dependiente con significativa inhibición del edema en dosis superiores a 250  $\mu\text{g}/\text{oreja}$  ( $P < 0,05$ ) [27]. Por su parte, Wu *et al.* (2006) estudiaron la liberación de  $\text{PGE}_2$  como indicativo de respuesta inflamatoria celular, los resultados mostraron un aumento dramático en la producción de  $\text{PGE}_2$  ( $3,92 \pm 0,30 \text{ ng/mL}$ ) en las células sin tratamiento en comparación con el grupo control ( $0,55 \pm 0,10 \text{ ng/mL}$ ). Sin embargo, la adición del extracto de hojas de *P. peruviana* suprimieron significativamente la producción de  $\text{PGE}_2$  (a concentraciones de 10 – 50  $\mu\text{g/mL}$ , este extracto bloquea fuertemente la producción de  $\text{PGE}_2$  en 1,50 – 0,93  $\text{ng/mL}$ ) [4].

### 4.2.3 Aislamiento y purificación

De acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos de actividad biológica, se continuó con el fraccionamiento de la fracción **PP0301**, dada su importante respuesta en los diferentes modelos de actividad, razón por la cual fue elegida para su estudio químico, con el objeto de aislar compuestos responsables de tal actividad. De este modo, dicha fracción fue sometida a cromatografía en columna y HPLC preparativa obteniendo

los compuestos **PP0503** (50,1 mg) y **PP0405** (8,0 mg) como se describe en la metodología (Figura 4-2 y 4-3).

### 4.2.3.1 Elucidación estructural del compuesto PP0503

El compuesto PP0503 fue obtenido como un polvo amorfo amarillo, y por medio de CCD con una fase móvil de AcOEt – Ac<sub>2</sub>O – AcOOH – Agua (6:2:1:1), se determinó su pureza cualitativamente, presentando un R<sub>f</sub> de 0,3 y una coloración amarilla al ser revelado con sulfato cérico amónico, por lo que se esperaría que el compuesto fuera un flavonoide. Su espectro ESI-MS presentó un ion  $m/z$  609 [M-H]<sup>+</sup>, consistente con la fórmula molecular C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>16</sub>. En el Anexo B se presentan los espectros de RMN (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, HMBC, HMQC y COSY) y masas, tomados al compuesto aislado PP0503.

Las señales del espectro de protón (<sup>1</sup>H) con su desplazamiento ( $\delta$ ), el tipo de señal (m) y la constante de acoplamiento (J, Hz), así como los desplazamientos ( $\delta$ ) del espectro de carbono (<sup>13</sup>C), asignados al compuesto PP0503, se presentan en la Tabla 4-6, donde también se presentan las correlaciones HMBC observadas.

En el espectro RMN - <sup>1</sup>H se tienen señales típicas para los protones en C-6 (6,18 ppm), C-8 (6,36 ppm), C-2' (7,67 ppm), C-5' (6,87 ppm) y C-6' (7,62 ppm). Los dobletes  $\delta$  5,08 ppm y 4,53 ppm corresponden a los protones anoméricos de los azúcares, cuya ubicación en la molécula se confirma por los contactos HMBC y COSY <sup>1</sup>H – <sup>1</sup>H. Entre  $\delta$  3,27 – 3,81 ppm se localizan las señales para los otros protones de los azúcares, los cuales se confirman por las correlaciones COSY <sup>1</sup>H – <sup>1</sup>H. El desplazamiento de la señal del protón metilo (1,13 ppm) correlacionado por HMQC con el carbono de desplazamiento 17,8 ppm, sugiere ramosa como una de las probables unidades de azúcar, la cual según correlaciones por HMBC, es posible ubicarla como el segundo azúcar de la cadena, ya que el hidrógeno C-6'' correlaciona con el carbono C-1''', siendo el primer azúcar la glucosa dadas sus características espectrales en comparación con datos reportados en la literatura (Tabla 4-7), la cual se encuentra ligada a la aglicona dadas las correlaciones observadas por HMBC, donde el protón C-1'' correlaciona con el carbono C-3.

En el espectro de RMN-<sup>13</sup>C se observan las señales típicas de una sustitución 3', 4', 149,7 y 145,7 ppm, respectivamente, sin correlaciones con protones por HMQC; de igual manera; según el espectro RMN-<sup>13</sup>C se deduce que las señales para carbonos alifáticos oxigenados corresponden a 4 metinos asignables a los carbonos C2'' – C6'' y C2''' – C5''', las señales en δ 105,5 y 102,4 ppm corresponden a los carbonos anoméricos de los azúcares. En la región aromática se localizan cinco señales, que corresponden a cinco carbonos metínicos, asignables a C-6, C-8, C-2', C-5' y C-6'. En la tabla 4-8 se muestran las asignaciones hechas para todas las señales, las cuales también fueron comparadas con las publicadas para compuestos glicosídicos similares.

**Tabla 4- 5.** Datos de RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C y 2D-HMBC para el compuesto PP0503 (MeOD, 400 MHz)

Posición	<sup>1</sup> H [δ (ppm), m, J (Hz)]	<sup>13</sup> C [δ (ppm)]	HMBC
<b>Aglicona</b>			
2		159,3	
3		135,6	
4		179,3	
5		162,8	
6	6,18 d, 2	100,0	C <sub>5</sub> , C <sub>7</sub> , C <sub>8</sub> , C <sub>10</sub>
7		166,0	
8	6,36 d, 2	94,9	C <sub>6</sub> , C <sub>7</sub> , C <sub>9</sub> , C <sub>10</sub>
9		158,4	
10		104,8	
1'		123,6	
2'	7,67 d, 2,1	117,7	C <sub>2</sub> , C <sub>1'</sub> , C <sub>3'</sub> , C <sub>4'</sub>
3'		149,7	
4'		145,7	

5'	6,87 dd, 8,5	116,0	C <sub>3'</sub> , C <sub>4'</sub> , C <sub>6'</sub>
6'	7,62 dd, 8,5/2,2	123,1	C <sub>2</sub> , C <sub>2'</sub>
<b>Glucosa</b>			
1''	5,08 d, 7,5	105,5	C <sub>3</sub>
2''		75,6	C <sub>1''</sub> , C <sub>4''</sub>
3''		71,3	
4''		78,1	C <sub>2''</sub> , C <sub>3''</sub>
5''		77,1	
6''	3,34 d, 5,4	68,6	C <sub>1'''</sub>
	3,81 d, 9,5		C <sub>1''</sub>
<b>Ramnosa</b>			
1'''	4,53 d, 1,4	102,4	C <sub>2'''</sub> , C <sub>3'''</sub> , C <sub>5'''</sub>
2'''	3,67 dd, 3,4/1,6	72,0	C <sub>1'''</sub> , C <sub>4'''</sub>
3'''	3,56 dd, 9,5/3,4	72,2	C <sub>4'''</sub>
4'''	3,27 s	73,9	C <sub>6'''</sub>
5'''	3,43 d, 2,1	69,7	C <sub>4'''</sub>
6'''	1,13 d, 6,2	17,8	C <sub>5'''</sub> , C <sub>4'''</sub>

A partir de la información expuesta, se identifica el compuesto como un flavonol 3', 4' sustituido, con dos azúcares unidos en C-3, y que corresponden a ramnosa y glucosa. Por lo que, teniendo en cuenta que el peso molecular es de 610 *m/z*, se deduce que la estructura del compuesto PP0503 corresponde al flavonoide glicosidado rutina [quercetina-3-O-rutinosido] (Figura 4-8).

**Tabla 4- 6.** RMN-<sup>1</sup>H (δppm) y RMN-<sup>13</sup>C (δppm) del compuesto PP0503 en MeOD, comparado con datos de la literatura para rutina en MeOD

Posición	PP0503			Demirezer <i>et al.</i> , 2006 [135]			Güvenalp <i>et al.</i> , 2006 [136]		
	δ <sup>13</sup> C (ppm)	δ <sup>1</sup> H (ppm)	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)	δ <sup>1</sup> H (ppm)	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)	δ <sup>1</sup> H (ppm)	J (Hz)
<b>Aglicona</b>									
2	159,3			158,5			158,5		
3	135,6			135,6			135,6		
4	179,3			179,2			179,4		
5	162,8			162,8			162,5		
6	100,0	6,18 d	2	100,4	6,16 d	2	99,9	6,20 d	1,8
7	166,0			167,4			166,0		
8	94,9	6,36 d	2	95,2	6,34 d	1,5	94,8	6,39 d	2,2
9	158,4			159,1			159,3		
10	104,8			105,2			105,6		
1'	123,6			123,0			123,1		
2'	117,7	7,67 d	2,1	117,6	7,68 d	1,5	117,6	7,66 d	1,8
3'	149,7			145,8			145,8		
4'	145,7			149,9			149,7		
5'	116,0	6,87 dd	8,7/3,3	116,0	6,86 d	8,5	116,1	6,86 d	8
6'	123,1	7,62 dd	8,5/2,2	123,6	7,62 dd	8,5/2,0	123,5	7,60 dd	8,0/1,8
<b>Glucosa</b>									
1''	105,5	5,08 d	7,5	104,9	5,07 d	8,5	104,7	5,09 d	7,8
2''	75,6			75,7	3,47 m		75,7		
3''	71,3			77,2	3,32 m		77,2		

<b>4"</b>	78,1			71,3	3,27 m		71,4		
<b>5"</b>	77,1			78,2	3,42 m		78,1		
<b>6"</b>	68,6	3,34 d	5,4		3,38 m	10,5	68,6	3,38 m	
		3,81 d	9,5	68,6	3,80 d			3,80 d	10,5
<b>Ramnosa</b>									
<b>1'''</b>	102,4	4,53 d	1,4	102,4	4,51 d	1	102,4	4,51 d	1,8
<b>2'''</b>	72,0	3,67 dd	3,3/1,6	72,1	3,63 dd	3,5/1,5	72,0	3,63 dd	3,5/1,5
<b>3'''</b>	72,2	3,56 dd	9,5/3,4	72,2	3,53 dd	9,5/3,5	72,2	3,53 dd	9,5/3,5
<b>4'''</b>	73,9	3,27 s		73,9	3,28 m		73,9	3,28 m	
<b>5'''</b>	69,7	3,43 d	2,1	69,7	3,44 m		69,7	3,44 m	
<b>6'''</b>	17,8	1,13 d	6,2	17,9	1,12 d	6,5	17,9	1,11 d	6

#### 4.2.3.2 Elucidación estructural del compuesto PP0405

El compuesto PP0405 fue obtenido como un polvo amorfo marrón, que por medio de CCD con una fase móvil de AcOEt – Ac<sub>2</sub>O – AcOOH – Agua (6:2:1:1), se determinó su pureza cualitativamente, presentando un R<sub>f</sub> de 0,42 y una coloración amarilla al ser revelado con sulfato cérico amónico, por lo que se esperaría que el compuesto fuera un flavonoide de menor polaridad con respecto al compuesto PP0503. Su espectro ESI-MS presentó un ion molecular de 593 *m/z* [M-H]<sup>+</sup>, consistente con la fórmula molecular C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>15</sub>. En el Anexo C se presenta el espectro de RMN-<sup>1</sup>H y masas, tomados al compuesto aislado PP0405.

Las señales del espectro de protón (<sup>1</sup>H) con su desplazamiento (δ), el tipo de señal (m) y la constante de acoplamiento (J, Hz), asignados al compuesto PP0405, se presentan en la Tabla 4-8.

En el espectro de RMN-<sup>1</sup>H se encuentran señales típicas para los protones en C-6 (6,34 ppm), C-8 (6,14 ppm), C-2' (7,97 ppm), C-5' (6,87 ppm) y C-6' (7,97 ppm), donde a diferencia del compuesto PP0405, es posible identificar una señal para el protón C-3'

(6,87 ppm), lo que indicaría que para este caso tan sólo se tiene sustitución en 4', lo que también explicaría la menor polaridad del compuesto y un menor peso molecular, respecto a PP0503, dada la pérdida de un OH. Los dobletes  $\delta$  5,28 ppm y 4,38 ppm corresponden a los protones anoméricos de los azúcares. Entre  $\delta$  3,00 – 3,55 ppm se localizan las señales para los otros protones de los azúcares. El desplazamiento de la señal del protón metilo (0,99 ppm) sugiere la presencia de ramnosa como uno de los azúcares, y el otro azúcar sería la glucosa dadas sus características espectrales en comparación con datos reportados en la literatura (Tabla 4-9).

**Tabla 4- 7.** Datos de RMN-<sup>1</sup>H para el compuesto PP0405 (DMSO, 400 MHz)

Posición	<sup>1</sup> H [ $\delta$ , m, J (Hz)]
<b>Aglicona</b>	
6	6,34
8	6,14
2'	7,97 d, 8,1
3'	6,87 d, 8,0
5'	6,87 d, 8,01
6'	7,97 d, 8m1
<b>Glucosa</b>	
1''	5,28 d, 7,2
<b>Ramnosa</b>	
1'''	4,38
6'''	0,99 d, 5,8

Dada la poca cantidad del compuesto no fue posible indicar claramente todas las señales de los protones

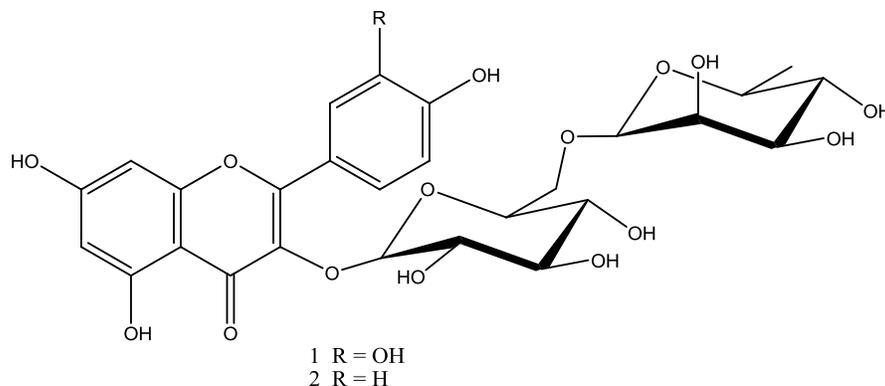
A partir de la información expuesta, se espera que el compuesto corresponda a un flavonol 4' sustituido, con dos azúcares, y que corresponden a ramnosa y glucosa. Por lo

que, teniendo en cuenta que el peso molecular es de 593 *m/z*, se deduce que la estructura del compuesto PP0405 corresponde al flavonoide glicosidado nicotoflorina [kaempferol-3-O-rutinosido] (Figura 4-8).

**Tabla 4- 8.** RMN-<sup>1</sup>H (δppm) del compuesto PP0404 en DMSO, comparado con datos de la literatura para la nicotoflorina en DMSO

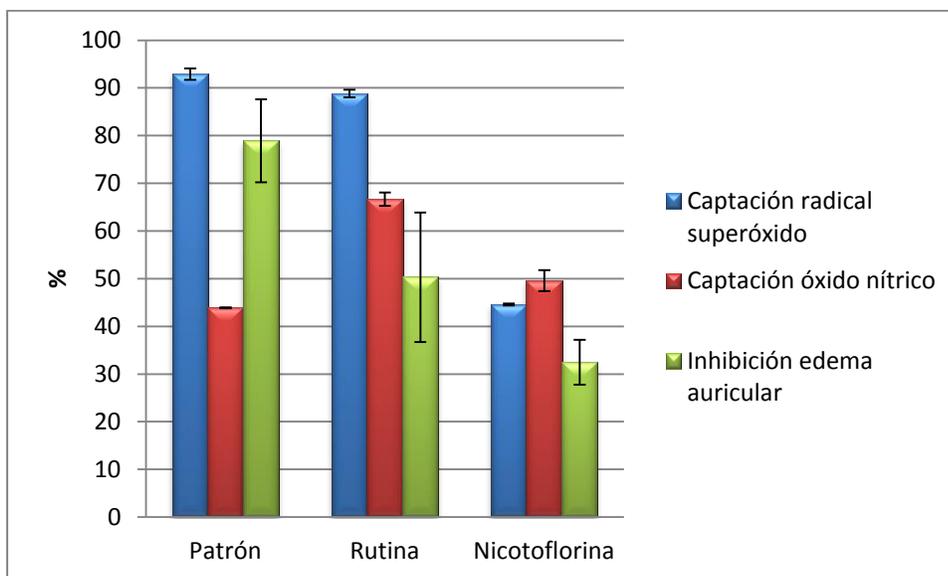
Posición	PP0405		Song <i>et al.</i> , 2007[137]		Takemura <i>et al.</i> , 2005[138]		Nassar <i>et al.</i> , 2010[139]		El-Kader <i>et al.</i> , 2006[140]	
	δH <sup>1</sup> (ppm)	J (Hz)	δH <sup>1</sup> (ppm)	J (Hz)	δH <sup>1</sup> (ppm)	J (Hz)	δH <sup>1</sup> (ppm)	J (Hz)	δH <sup>1</sup> (ppm)	J (Hz)
<b>Aglicona</b>										
6	6,34		6,2		6,47	2,0 d	6	1,8 d	6,21	2,0 d
8	6,14		6,4		6,26	2,0 d	6,2	1,8 d	6,42	2,0 d
2'	7,97	8,1 d	7,98	8,7 d	8,04	1,8 dd	7,61	8,5 d	7,99	8,9 d
3'	6,87	8,0 d	6,88	8,7 d	6,94	1,9 dd	6,77	8,5 d	6,89	8,9 d
5'	6,87	8,0 d	6,88	8,7 d	6,94	1,9 dd	6,77	8,5 d	6,89	8,9 d
6'	7,97	8,1 d	7,98	8,7 d	8,04	1,8 dd	7,61	8,5 d	7,99	8,9 d
<b>Glucosa</b>										
1''	5,28	7,2 d	5,3	6,9 d	5,37	7,6 d	5,21	7,6 d	5,31	7,5 d
<b>Ramnosa</b>										
1'''	4,38		4,39		4,43	1,1 d	4,4		4,45	
6'''	0,99	5,8 d	1,1	6,4 d	1,04	6,2 d	1,04	6,1 d	0,99	6,2 d

**Figura 4- 8.** Rutina (1) y Nicotoflorina (2), flavonoides aislados de los cálices de *Physalis peruviana*



La rutina y la nicotoflorina fueron evaluadas en los modelos de radicales superóxido y óxido nítrico, además del modelo de edema auricular, con el fin de establecer la actividad antioxidante y anti-inflamatoria frente a los ensayos empleados en el extracto vegetal. Los resultados se presentan en la gráfica 4-5.

**Gráfica 4- 5.** Evaluación de la actividad antiinflamatoria y la capacidad antioxidante (frente a los radicales superóxido y óxido nítrico) de la rutina y la nicotoflorina



Patrón en la captación del radical superóxido: n-propilgalato. Patrón en la captación del radical óxido nítrico: Ácido gálico. Patrón en el edema auricular: Indometacina.

Los datos se presentan como la media de las observaciones  $\pm$  desviación estándar

En el ensayo de captación de radical superóxido la rutina con un resultado de  $88,8 \pm 0,8\%$  a  $10 \text{ mg/mL}$  no presenta diferencias significativas respecto al n-propilgalato ( $92,9 \pm 1,2\%$ ). En el caso del ensayo de captación del radical óxido nítrico, la rutina ( $66,7 \pm 1,4\%$ ) es significativamente diferente ( $P < 0,05$ ) a la respuesta del ácido gálico ( $43,9 \pm 0,1\%$ ). Por otra parte, en el ensayo de actividad antiinflamatoria se observaron diferencias significativas ( $P < 0,001$ ) entre la rutina ( $50,3 \pm 13,6\%$ ) y la indometacina ( $78,9 \pm 8,7\%$ ). Es importante señalar, que en cada caso la rutina presentó diferencias significativas respecto al control ( $P < 0,001$ ).

Por su parte, en los ensayos de captación de radical superóxido, óxido nítrico y edema auricular, la nicotoflorina a  $10 \text{ mg/mL}$  con resultados de  $44,6 \pm 0,2\%$ ,  $49,6 \pm 2,2\%$  y  $32,5 \pm 4,7\%$ , respectivamente, presenta diferencias significativas ( $P < 0,001$ ) respecto a cada

patrón. Es importante señalar, que en cada caso la nicotoflorina presentó diferencias significativas respecto al control ( $P < 0,001$ ).

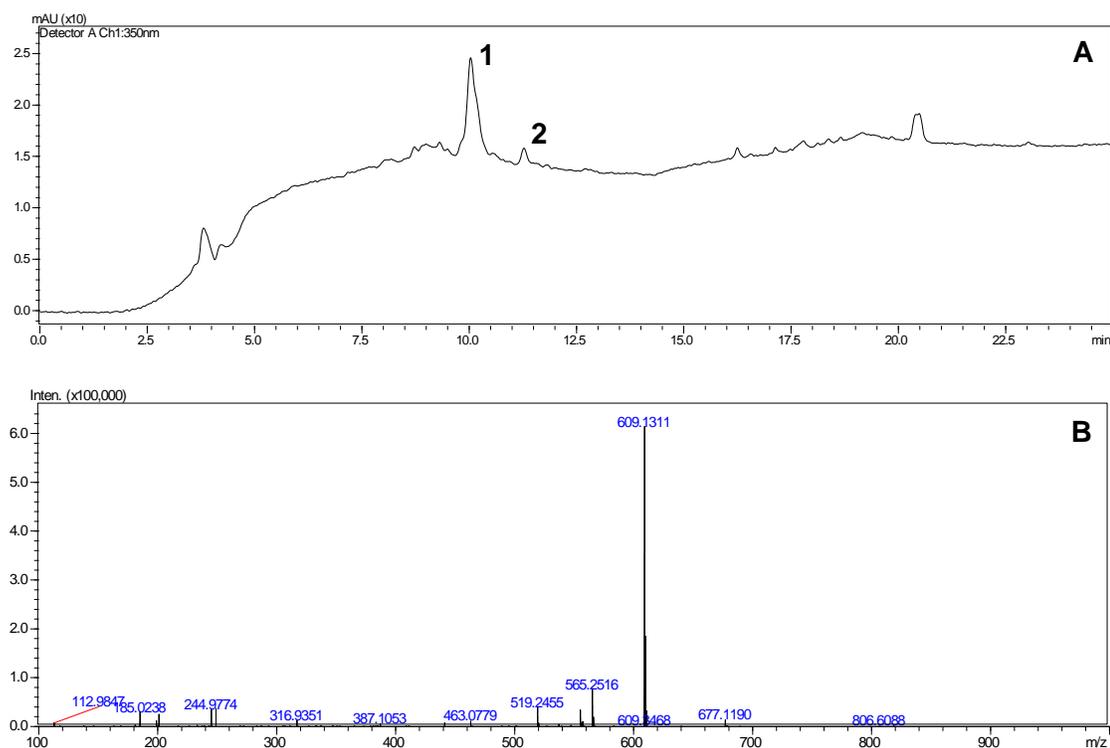
Este resultado es esperado ya que el mecanismo de acción de los polifenoles como agentes antioxidantes, consiste en que los grupos OH de los anillos pueden donar un hidrógeno y un electrón a radicales hidroxilo, peroxilo y peroxinitrito, estabilizándolos y transformándose en un radical relativamente estable [141]. De acuerdo a Halliwelly Gutteridge (1992) [142], los flavonoides ejercen su acción antioxidante mediante diferentes mecanismos: suprimiendo la formación de especies reactivas del oxígeno por inhibición de enzimas o quelando elementos trazas involucrados en la producción de radicales libres, capturando especies reactivas del oxígeno o bien protegiendo las defensas antioxidantes. Estos fitocompuestos intervienen en los sistemas redox biológicos, ligándose a un número de proteínas antioxidantes, tales como la transferrina, la ceruloplasmina y la proteína quinasa. De otra parte, se sabe que tanto el estrés oxidativo como el nitrosativo, por diversas circunstancias, tanto de carácter intrínseco como extrínseco, inducen a que los mecanismos biológicos pierdan el control sobre los radicales libres con el desbalance consecuente entre las condiciones oxidantes y las defensas antioxidantes celulares [143]. Por lo que resulta de particular interés evaluar no sólo el potencial antioxidante de un material vegetal sino además su capacidad antinitrosativa, tal como se demostró para la rutina y la nicotoflorina.

La rutina es un compuesto ampliamente utilizado, ya que exhibe múltiples actividades farmacológicas incluyendo antibacteriana y antiviral, antiprotozoaria, antitumoral, antialérgica, antiinflamatoria y antiplaquetaria; además, también se ha reportado actividad antidiarreica, antiulcerosa, antiespasmódica, antimutagenesis, vasodilatadora e inmunomoduladora [144]. Por otro lado, la nicotoflorina es un compuesto conocido por su potente actividad antioxidante, antiinflamatoria, antinociceptiva, analgésica y antihipertensiva; además, se han reportado sus efectos protectores contra el estrés oxidativo en ratas [145].

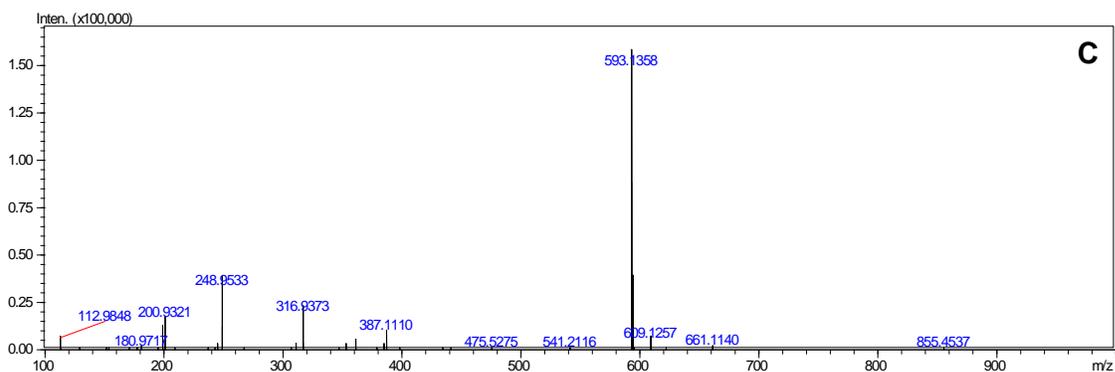
En resumen, a partir del extracto etanólico de cálices de *P. peruviana* fue posible purificar y elucidar dos compuestos tipo flavonoide que presentan actividad antioxidante y antiinflamatoria. Sin embargo, como se puede observar en la Figura 4-5, la rutina

presentó una mayor actividad antioxidante respecto a la nicotiflorina, en todos los casos. Por otra parte, como se observa en la Figura 4-9, en la que se presenta un perfil cromatográfico del extracto etanólico con señales para la rutina y la nicotiflorina detectadas por sus espectros de masas, es posible verificar que la rutina se encuentra en mayor proporción que la nicotiflorina. Por estos motivos, se seleccionó la rutina como el marcador analítico del extracto de cálices de *P. peruviana*. Adicionalmente, este compuesto puede también cumplir el papel de marcador terapéutico o activo, por lo que se convierte en la molécula ideal para caracterizar el material vegetal en procesos de desarrollo de productos farmacéuticos o cosméticos a partir del extracto trabajado. Por otro lado, es importante añadir que la rutina por ser un compuesto ampliamente conocido puede ser fácilmente adquirida como estándar, lo cual facilita su acceso y la implementación de metodologías analíticas para su cuantificación.

**Figura 4- 9.** A) Cromatograma obtenido a partir de una solución de extracto etanólico de cálices de *Physalis peruviana* [1) Rutina,  $t_r$  : 10,1 min, 2) Nicotiflorina,  $t_r$  : 11,3 min]. B) ESI [-] Pico 10,1 min. C) ESI [-] Pico 11,3 min



54 Propuesta de un marcador analítico como herramienta en la microencapsulación de un extracto con actividad antioxidante de cálices de *Physalis peruviana*



Fase estacionaria: Columna Shimadzu Premier C-18 (150 x 4,6 mm i.d.; 3,0  $\mu$ m) a una temperatura de 35°C.  
Fase móvil: Gradiente combinando Solvente A (MeOH con 0,5% de ác. fórmico) y Solvente B (H<sub>2</sub>O con 0,5% de ác. fórmico) de la siguiente manera: 10 – 50% A (0 – 5 min), 50% A (5 – 10 min), 50 – 80% A (10 – 15 min) y 80% A (15 – 25 min). Volumen de inyección 10  $\mu$ L y flujo de 0,5 mL/min. El cromatograma se registró a 350 nm.

# **5. Cuantificación de Rutina por HPLC-DAD**

## **5.1 Metodología**

### **5.1.1 Equipos**

La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), se realizó en un equipo Shimadzu® equipado con una bomba binaria LC-6AD, detector de arreglo de diodos (DAD) SPD-M20A (a 350 nm), horno CTO-20A, desgasificador DGU-20As y automuestreador SIL-20A HT. Columna en fase reversa Phenomenex® 10µm C-18 (150 x 3,9 mm).

Los datos se recogieron mediante el software LCsolution®.

### **5.1.2 Reactivos**

Rutina [quercetina-3-O-rutinosido] adquirida de Sigma. Ácido acético (Grado reactivo analítico) de Merck. Metanol (Grado HPLC) de JT Baker. Agua de calidad HPLC obtenida a través del sistema Milli-Q de Millipore Co®.

### **5.1.3 Desarrollo del método analítico por HPLC**

#### **5.1.3.1 Condiciones cromatográficas**

Teniendo en cuenta estudios previos para Rutina en extractos vegetales [144-146], se desarrolló un método cromatográfico de acuerdo a las necesidades y condiciones de trabajo, para este fin se empleó HPLC en fase reversa con detector de arreglo de diodos. Se realizaron diferentes análisis para la determinación del gradiente de elución, la temperatura de la columna y las condiciones de las fases móviles.

Como fase estacionaria se utilizó una columna Phenomenex® 10µm C-18 (150 x 3,9 mm) a una temperatura de 35°C. Para el método se manejó como fase móvil un gradiente combinando Solvente A (MeOH con 0,5% de ác. acético) y Solvente B (H<sub>2</sub>O con 0,5% de ác. acético) de la siguiente manera: 10 – 50% A (0 – 5 min), 50% A (5 – 10 min), 50 – 80% A (10 – 15 min) y 80% A (15 – 25 min). El volumen de inyección fue de 10 µL y la velocidad de flujo se mantuvo constante a 1.0 mL/min. Los cromatogramas se registraron a 350 nm. Cada solución fue filtrada a través de una membrana de 0,45 µm antes de inyectar en el HPLC.

### 5.1.3.2 Preparación de las muestras

#### *Soluciones estándares:*

La rutina (10.0 mg con 95% de pureza) fue disuelta en 10 mL de metanol, y usada para la validación del método analítico. A partir de ésta solución madre se prepararon las demás concentraciones del método a través de diluciones sucesivas. Esta solución fue preparada por triplicado tanto para la validación del sistema como del método.

Para determinar el límite de detección y cuantificación se prepararon diluciones seriadas.

Para la validación en cada matriz se utilizaron soluciones preparadas al doble de cada concentración de la curva de calibración para el sistema, con la finalidad de adicionarlas a cada matriz “muestras enriquecidas”, en proporción 1:1, y que la concentración final sea la indicada para cada nivel de la curva de calibración. Cada matriz se preparó a 2 mg/mL.

#### *Preparación de las muestras:*

El extracto seco es diluido a 1 mg/mL en metanol. La solución fue filtrada a través de una membrana de 0.45 µm antes de inyectar en el HPLC.

### 5.1.3.3 Idoneidad del sistema

Para considerar que el método es idóneo y fiable para la cuantificación de rutina se determinaron los parámetros de tiempo de retención ( $t_r$ ), factor de retención ( $k$ ), factor de selectividad ( $\alpha$ ) y resolución ( $R$ ). Lo anterior respecto al extracto etanólico de los cálices de *P. peruviana*, siendo ésta la matriz más crítica.

### 5.1.3.4 Validación de la metodología analítica

Los parámetros a validar para metodologías analíticas sugeridos por la ICH (1996) [147] son: especificidad, linealidad, exactitud, precisión, límite de detección y límite de cuantificación. Cada uno de estos parámetros fue evaluado para determinar la fiabilidad de la metodología analítica desarrollada para la cuantificación de rutina en extractos de cálices de *P. peruviana* y en micropartículas a partir de Eudragit® E PO y Eudragit® RS 100.

#### 5.1.3.4.1 Especificidad y selectividad

La especificidad es la capacidad de un método para diferenciar y cuantificar uno o varios analitos en presencia de otros componentes que se sospecha puedan estar presentes en la mezcla [148]; es decir, que otros componentes presentes en la muestra no influyen en el resultado del compuesto de interés. Las sustancias potencialmente interferentes en un extracto vegetal incluyen componentes endógenos de la matriz y productos de degradación; en el caso de las micropartículas, serían el polímero y posibles residuos de materiales utilizados en el proceso de elaboración de las mismas. Para evaluar este parámetro se comparó el cromatograma de diez muestras de metanol (blanco) y soluciones de micropartículas vacías preparadas con Eudragit® E PO y Eudragit® RS 100 a 2 mg/mL, con la finalidad de detectar cualquier co-elución interferente. Por otro lado, se expuso el extracto etanólico a diferentes condiciones de estrés, como hidrólisis alcalina, hidrólisis ácida y oxidación. En cada caso, se prepararon soluciones del extracto a un volumen final de 10 mL, ésta solución se expuso a reflujo a una temperatura de 100°C con adición de NaOH 0,1 N, HCl 0,1 N y, para la oxidación H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1%, manteniendo

las muestras protegidas de la luz por un periodo de tres horas a temperatura ambiente[149]. El criterio de aceptabilidad fue el tiempo de retención del pico de rutina en los cromatogramas para cada matriz y, además la pureza del pico para cada caso de estrés.

Por su parte, la selectividad se refiere a la respuesta para un número de entidades químicas, por lo que para un analito de interés la respuesta debe ser distinguida de todas las otras respuestas, es decir, se debe comprobar que entre las interferencias propias de la matriz es posible detectar la respuesta para la molécula de interés [148]. Para ello, se analizó el espectro UV del pico de rutina en el extracto y en una solución estándar de rutina a 40 µg/mL, teniendo como criterio de aceptabilidad el tiempo de retención, así como la similitud de los espectros UV y la pureza de pico en el extracto.

#### **5.1.3.4.2 Linealidad**

Se considera que un método es lineal cuando existe una relación directamente proporcional entre la respuesta obtenida cuando se aplica el método y la concentración del analito en la matriz dentro del rango de concentraciones del analito buscado (rango de trabajo). Por su parte, el rango de trabajo viene definido por la finalidad del método y puede representar sólo una parte de la totalidad de la línea recta [150]. Este parámetro se evalúa mediante el desarrollo experimental de una curva de calibración, que es la relación existente entre la respuesta experimental que produce un determinado analito y las concentraciones del mismo.

El rango utilizado fue 0,1 a 40,0 µg/mL con el objetivo que las concentraciones encontradas en muestras de extracto vegetal y de micropartículas estuvieran dentro de éste. En la determinación de la linealidad para rutina en el sistema y en cada una de las matrices se trabajaron 3 réplicas y 6 niveles de concentración. Para la linealidad del método en cada matriz fue utilizada la prueba estadística “t” Student, posterior a una prueba “ANOVA” para análisis de varianza. En ambos casos el nivel de significancia fue  $P < 0,05$ .

#### 5.1.3.4.3 Precisión

La precisión mide el grado de similitud entre resultados analíticos obtenidos de una serie de mediciones repetidas del analito realizadas en las condiciones previstas en el método. La precisión refleja los errores aleatorios que se producen cuando se utiliza un método. Las condiciones en que se mide la precisión se dividen, en condiciones repetibles y condiciones reproducibles. La repetibilidad de las condiciones existe cuando el mismo analista analiza muestras el mismo día y con el mismo instrumento en el mismo laboratorio. Cualquier cambio de estas condiciones implica que las condiciones sólo serán reproducibles [150].

La precisión del método fue calculada con mediciones intra e interdía. El ensayo intradía se estimó mediante análisis por triplicado de tres niveles de concentración en el mismo día. El ensayo interdía se determinó por el análisis por triplicado a un nivel de concentración (2,5 µg/mL, como uno de los puntos medios de la curva de calibración), en tres días diferentes. El valor de aceptación para cada caso CV 5%. Además, se realizó un análisis estadístico empleando el análisis de varianza (ANOVA).

#### 5.1.3.4.4 Exactitud

La exactitud de un método de análisis ha sido definida, como la diferencia entre el valor de una respuesta (concentración, cantidad), aceptado como verdadero y el valor encontrado experimentalmente. La falta de concordancia entre estos valores es debida a los errores aleatorios y a los errores sistemáticos del método [151].

La exactitud del método fue demostrada mediante el porcentaje de recuperación del analito en cada matriz. Para esto se realizaron mediciones por triplicado de solución estándar a 2,5 µg/mL y soluciones de cada matriz a 1 mg/mL, añadiendo a cada una metanol en proporción 1:1. Posteriormente, se realiza una medición por triplicado de una muestra que contenga solución estándar a 2,5 µg/mL y solución de la matriz a 1 mg/mL en proporción 1:1.

#### 5.1.3.4.5 Límite de detección y límite de cuantificación

El límite de cuantificación (LC) de un método corresponde a la mínima cantidad de analito presente en la muestra que se puede cuantificar, bajo condiciones experimentales determinadas, con una adecuada precisión y exactitud. Por su parte, el límite de detección (LD) determina la mínima cantidad de analito en la muestra que se puede detectar aunque no necesariamente cuantificar bajo las condiciones experimentales de trabajo [152].

Para estimar el LC y el LD se hicieron diluciones descendentes, desde el último punto de concentración del rango evaluado. Para el LC se buscó una concentración en la que se pudiera encontrar en el cromatograma un área adecuada para integrar y que el coeficiente de variación no superara el 5%, además se esperaba que la señal fuera 10 veces el ruido. En el caso del LD se identificó una concentración en la que la señal fuera 3 veces el ruido.

## 5.2 Resultados y discusión

### 5.2.1 Desarrollo del método analítico por HPLC

El desarrollo del método cromatográfico se basó en estudios previos reportados en la literatura, para la cuantificación de rutina en extractos vegetales [146-148], en los cuales se propone un sistema constituido por una fase orgánica compuesta de metanol o acetonitrilo, y una fase acuosa acidificada. Para la evaluación de los sistemas cromatográficos se trabajó con el extracto etanólico de cálices de *P. peruviana*.

Inicialmente se trabajó con metanol como fase orgánica y ácido acético en la fase acuosa (0,5%) empleando el gradiente A expuesto en la gráfica 5-1. Dado que se utilizó un detector con arreglo de diodos, fue posible observar los resultados cromatográficos a diferentes longitudes de onda, determinando que a 350 nm se obtienen los mejores resultados en cuanto a estabilidad de la línea base. Como se observa en la figura 5-1A,

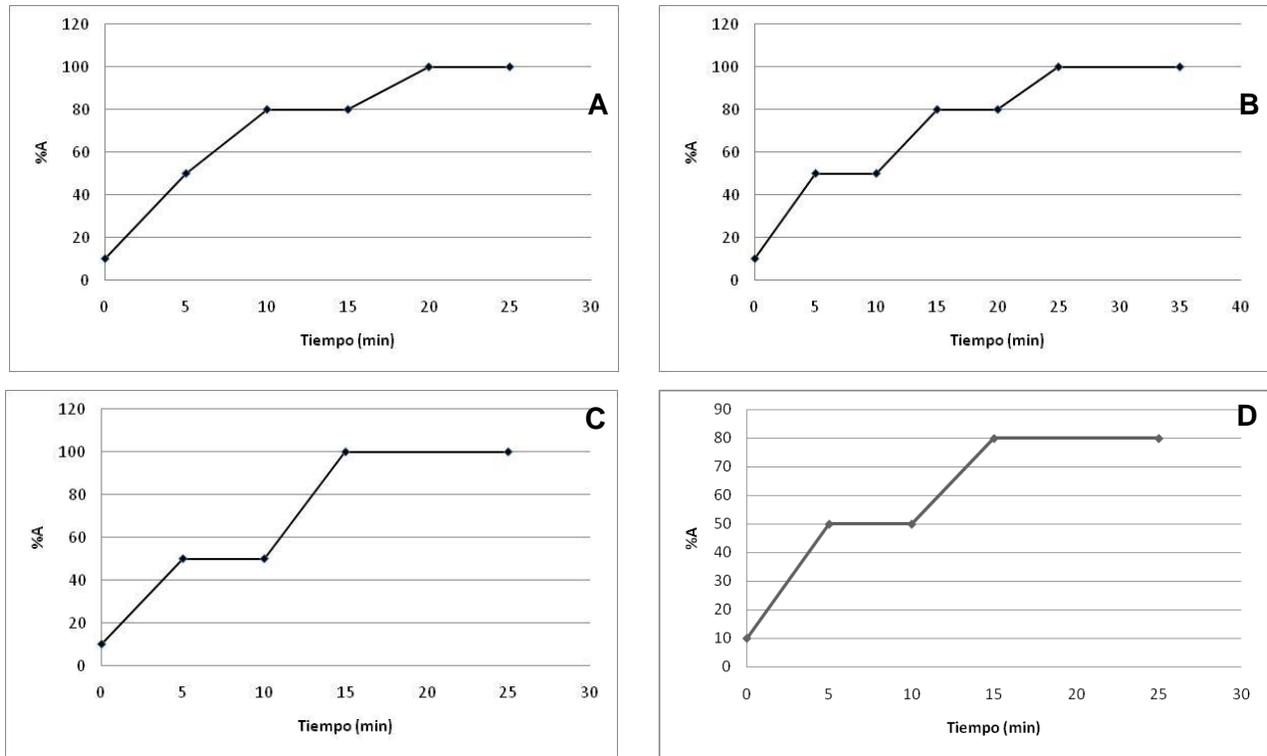
---

no hay una adecuada separación del pico de rutina, por esta razón el gradiente se modificó pretendiendo hacer más lento el cambio de polaridad de la fase móvil para dar un mayor tiempo de contacto de los componentes del extracto con la fase estacionaria (Gráfica 5-1 B, Figura 5-1 B).

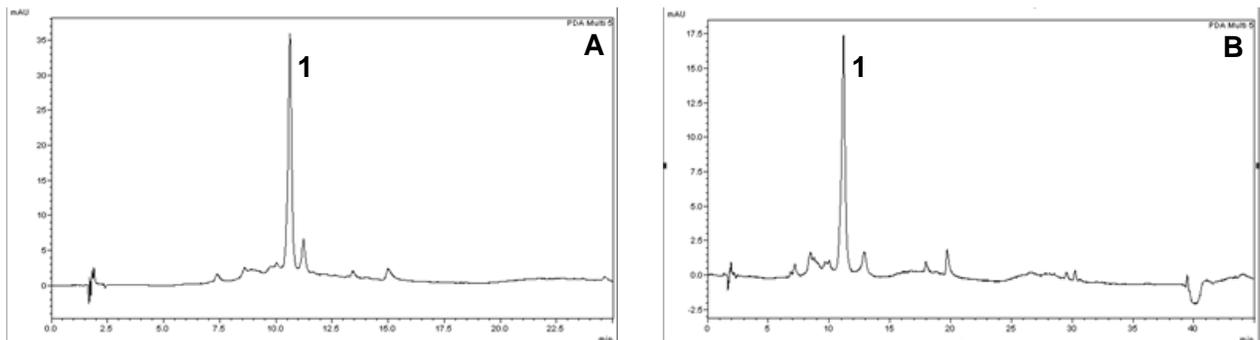
Posteriormente, se decidió acidificar la fase orgánica con ácido acético empleando el gradiente B, para lo cual se obtuvo una mejor estabilización de la línea base y se mejoró la resolución del pico de rutina (Figura 5-1 C). Sin embargo, el tiempo de corrida fue bastante largo (35 minutos), por lo que se planteó el gradiente C, teniendo en cuenta que se debe hacer un cambio lento de polaridad de la fase móvil y que ésta debe estar acidificada (Figura 5-1 D). A continuación, se trabajó con una temperatura de 35°C, empleando el gradiente anterior (C), determinando que éste parámetro mejora la estabilidad de la línea base (Figura 5-1 E). Con la finalidad de verificar el efecto de acetonitrilo como fase móvil, se empleó el gradiente C, observando que no hay una adecuada separación del pico de rutina (Figura 5-1 F).

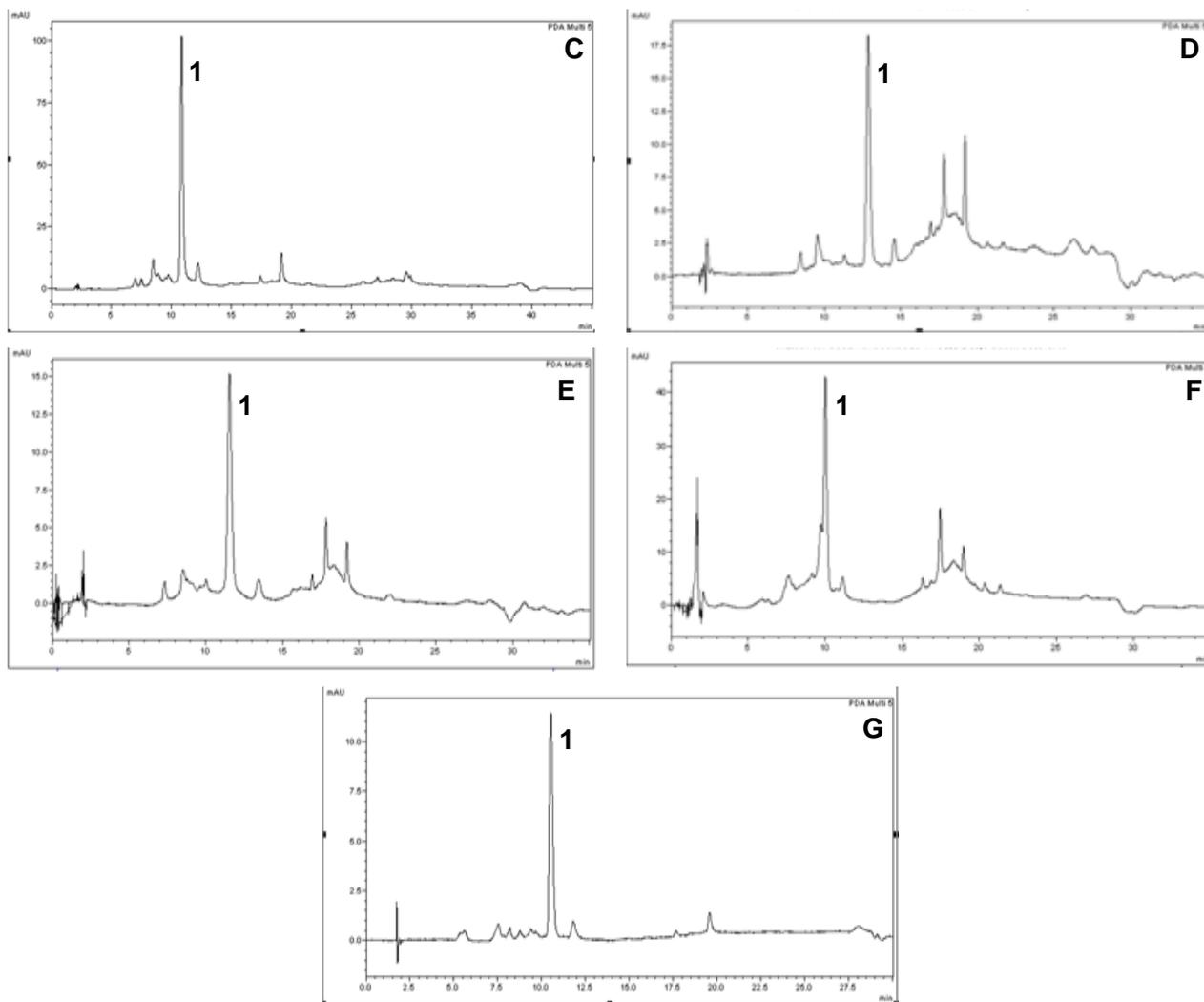
Finalmente, dado que después de 15 minutos se presentó una alta inestabilidad de la línea base (Figura 5-1 E), cuando la fase móvil es 100% metanol, se decidió trabajar a un porcentaje de fase orgánica de 80% teniendo en cuenta las demás consideraciones (temperatura 35°C y fase orgánica acidificada). De esta manera se obtiene un cromatograma con línea base estable, adecuada resolución de la señal de rutina y un tiempo de corrida de 25 min.

**Gráfica 5- 1.** Gradientes de elución de la fase móvil respecto al solvente A (MeOH), para el desarrollo del método cromatográfico. A) *Gradiente A*, B) *Gradiente B*, C) *Gradiente C*, D) *Gradiente D*



**Figura 5- 1.** Cromatogramas obtenidos a partir de una solución de extracto etanólico de cálices de *Physalis peruviana* empleando diferentes sistemas cromatográficos. 1) *Rutina*. A) *Gradiente A*, B) *Gradiente B*, C) *Gradiente B acidificando la fase móvil*, D) *Gradiente C acidificando la fase móvil*, E) *Gradiente C acidificando la fase móvil y °T = 35°C*, F) *Gradiente C empleando acetonitrilo acidificado y °T = 35°C*, G) *Gradiente D acidificando la fase móvil y °T = 35°C*





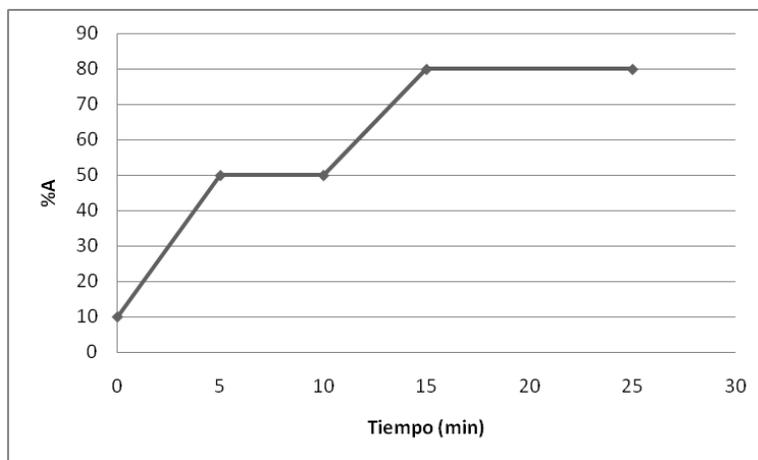
Fase estacionaria: Columna Phenomenex® 10 $\mu$ m C-18 (150 x 3,9 mm). Volumen de inyección 10  $\mu$ L y flujo de 1.0mL/min. Los cromatogramas se registraron a 350 nm.

En resumen, para el desarrollo del método cromatográfico se mantuvo constante el flujo y la columna de trabajo, variando principalmente la fase móvil y su gradiente, realizando análisis con metanol – agua y acetonitrilo – agua, añadiendo ácido acético en algunos casos. Después de definir la fase móvil se definió una temperatura de trabajo para la columna.

Las condiciones cromatográficas que se definieron, según los ensayos realizados, fueron:

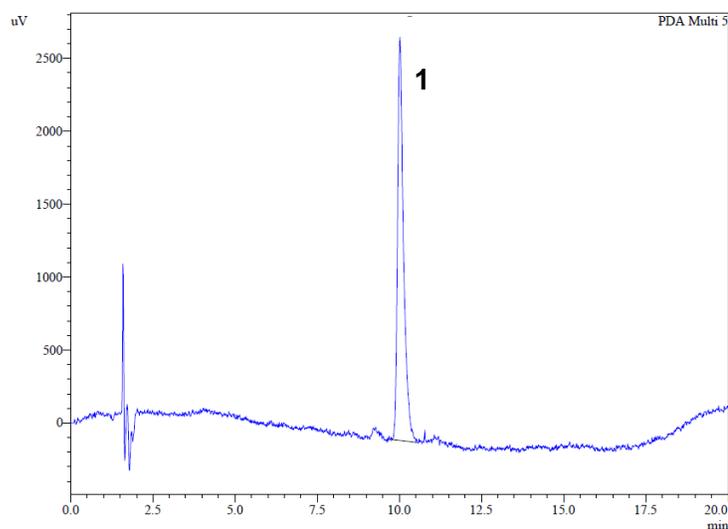
- Tiempo de corrida cromatográfica: 25 minutos
- Flujo: 1.0 mL/min
- Temperatura de la columna: 35°C
- Volumen de inyección: 10mL
- Fase móvil: Gradiente combinando Solvente A (MeOH con 0,5% de ác. acético) y Solvente B (H<sub>2</sub>O con 0,5% de ác. acético) (Gráfica 5-2).

**Gráfica 5- 2.** Gradiente de elución de la fase móvil respecto al solvente A (MeOH con 0,5% de ác. acético), para el desarrollo del método de cuantificación de rutina



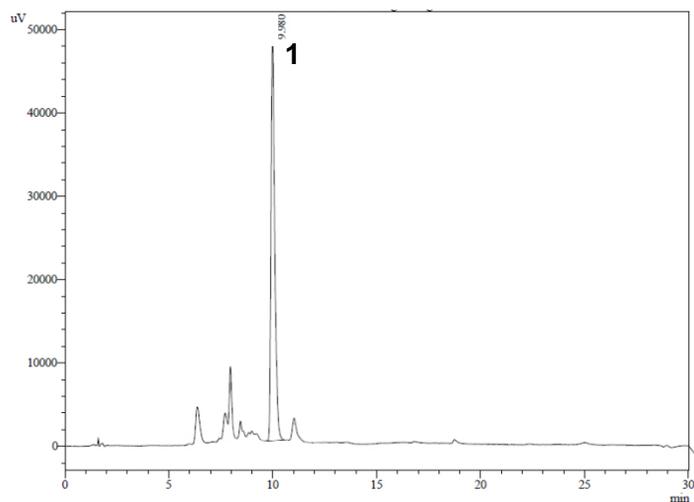
Como se observa en la gráfica 5-2, el gradiente consiste en un incremento de la fase orgánica disminuyendo la polaridad del sistema para que las moléculas retenidas en la fase estacionaria C-18 puedan eluir. Este cambio de polaridad se hace progresivo para permitir una adecuada separación de la rutina en la columna. Posterior a la elución de la rutina es necesario aumentar la concentración de la fase orgánica, con la finalidad de permitir la elución de los compuestos de baja polaridad que podrían estar presentes en el extracto. En la figura 5-2 y 5-3, se presenta el cromatograma obtenido para una solución de rutina y de extracto etanólico de cálices de *P. peruviana*, respectivamente.

**Figura 5- 2.** Cromatograma obtenido a partir de una solución de rutina estándar. 1) Rutina,  $t_r$ : 10,0 min



Fase estacionaria: Columna Phenomenex® 10 $\mu$ m C-18 (150 x 3,9 mm) a una temperatura de 35°C. Fase móvil: Gradiente combinando Solvente A (MeOH con 0,5% de ác. acético) y Solvente B (H<sub>2</sub>O con 0,5% de ác. acético) de la siguiente manera: 10 – 50% A (0 – 5 min), 50% A (5 – 10 min), 50 – 80% A (10 – 15 min) y 80% A (15 – 25 min). Volumen de inyección 10  $\mu$ L y flujo de 1,0mL/min. El cromatograma se registró a 350 nm

**Figura 5- 3.** Cromatograma obtenido a partir de una solución de extracto etanólico de cálices de *Physalis peruviana*. 1) Rutina,  $t_r$ : 10,0 min



Fase estacionaria: Columna Phenomenex® 10 $\mu$ m C-18 (150 x 3,9 mm) a una temperatura de 35°C. Fase móvil: Gradiente combinando Solvente A (MeOH con 0,5% de ác. acético) y Solvente B (H<sub>2</sub>O con 0,5% de ác. acético) de la siguiente manera: 10 – 50% A (0 – 5 min), 50% A (5 – 10 min), 50 – 80% A (10 – 15 min) y 80% A (15 – 25 min). Volumen de inyección 10  $\mu$ L y flujo de 1,0mL/min. El cromatograma se registró a 350 nm

De acuerdo a la figura 5-2 y 5-3 es posible identificar que el componente de mayor abundancia en el extracto etanólico de *P. peruviana* es la rutina, compuesto que como se describió anteriormente, también es responsable de parte de la actividad antioxidante y antiinflamatoria del extracto. Por lo tanto, la pertinencia de cuantificar los procesos de microencapsulación respecto a la rutina, es bastante alta. Por lo que se puede inferir que la rutina es el compuesto adecuado terapéutica y analíticamente, para los objetivos deseados.

## 5.2.2 Validación de la metodología

### 5.2.2.1 Idoneidad del sistema

Cada parámetro que determina la idoneidad del sistema fue evaluado respecto al extracto etanólico de los cálices de *P. peruviana*, siendo ésta la matriz de trabajo más crítica.

*Tiempo de retención:*

Como se observa en la figura 12 el tiempo de retención correspondiente a la rutina es de 10,0 min (Tabla 18) a las condiciones cromatográficas descritas.

*Factor de retención:*

El factor de retención se interpreta como el número de volúmenes de fase móvil necesarios para eluir el compuesto de interés después del volumen inicial contenido en la columna (tiempo muerto); entre mayor es este valor, más lejano del frente de solvente se encuentra el analito de interés. Se recomiendan valores entre  $0,5 < k < 20$  para matrices complejas como los extractos vegetales [149].

El factor de retención para la rutina se calculó mediante la Ecuación 5-1.

**Ecuación 5- 1.** Cálculo del factor de retención

$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

$t_0$  es el tiempo muerto, y  $t_r$  es el tiempo de retención de la rutina.

El factor de retención para la rutina fue de 4,22. Este resultado se encuentra dentro de lo esperado para un sistema que busca una óptima resolución, ya que el analito permanece suficiente tiempo en la columna para permitir una adecuada separación de los demás componentes.

*Factor de selectividad:*

El factor de selectividad permite definir la capacidad de un sistema para separar dos picos adyacentes, lo cual depende de la naturaleza de las fases estacionaria y móvil, y la temperatura de operación de la columna. Este parámetro fue calculado mediante la Ecuación 5-2.

**Ecuación 5- 2.** Cálculo del factor de selectividad

$$\alpha = \frac{t_{r(B)} - t_0}{t_{r(A)} - t_0}$$

$t_{r(B)}$  es el tiempo de retención para el compuesto B, y  $t_{r(A)}$  es el tiempo de retención para el compuesto A, siendo A el compuesto que primero eluye,  $t_0$  es el tiempo muerto.

El factor de selectividad de la rutina se calculó para los compuestos inmediatamente anterior y posterior, con resultados de 1,16 y 1,13, respectivamente. Indicando que no hay superposición de los picos, y que si se presenta separación entre estos y la rutina.

**Resolución:**

La resolución es la medida de separación entre dos picos considerándose adecuada con valores superiores a 2. Este parámetro se calculó mediante la Ecuación 5-3.

**Ecuación 5- 3.** Cálculo de la resolución

$$R = \frac{2(t_{r(B)} - t_{r(A)})}{W_A + W_B}$$

$t_{r(B)}$  es el tiempo de retención para el compuesto B, y  $t_{r(A)}$  es el tiempo de retención para el compuesto A, siendo A el compuesto que primero eluye,  $W_A$  ancho de base a media altura del pico A, y  $W_B$  ancho de base a media altura del pico 2.

La resolución de la rutina se calculó para los compuestos inmediatamente anterior y posterior, con resultados de 6,9 y 6,7, respectivamente. Indicando una adecuada separación de los picos en la línea base.

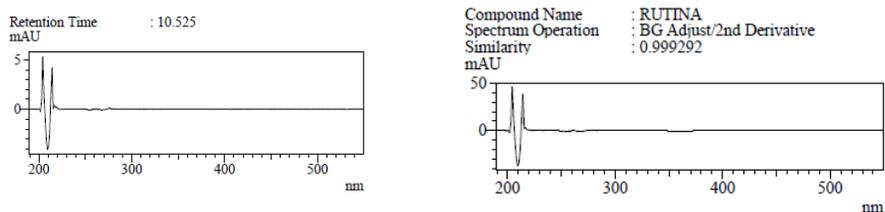
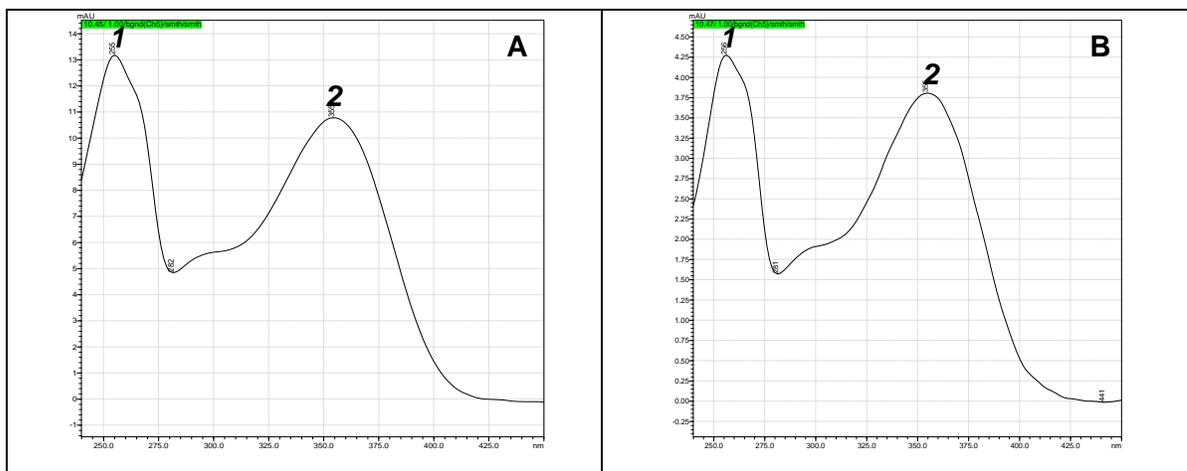
A partir de los resultados expuestos, es posible inferir que el sistema cromatográfico es idóneo y se puede utilizar para iniciar la validación del método de cuantificación de rutina por HPLC-DAD.

## 5.2.2.2 Parámetros de validación

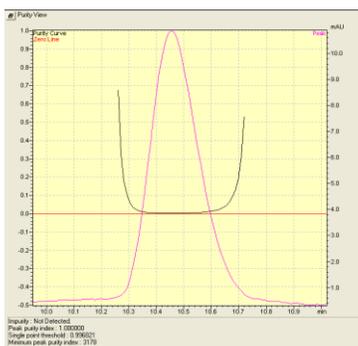
### 5.2.2.2.1 Selectividad y especificidad

Para evaluar la selectividad del método, se analizó el espectro UV del pico de rutina en el extracto y se comparó con el de la rutina estándar, verificando la similitud de los espectros UV y la pureza de pico en el extracto (figuras 5-4 y 5-5).

**Figura 5- 4.** Similitud de espectros UV del pico de rutina del extracto de cálices de *Physalis peruviana* (A) y el estándar de rutina (B). Picos de máxima absorción, 1) 255 nm, 2) 355nm. Datos procesado con el software LCsolution®



**Figura 5- 5.** Pureza del pico de rutina en el extracto. Datos procesados con el software LCsolution®



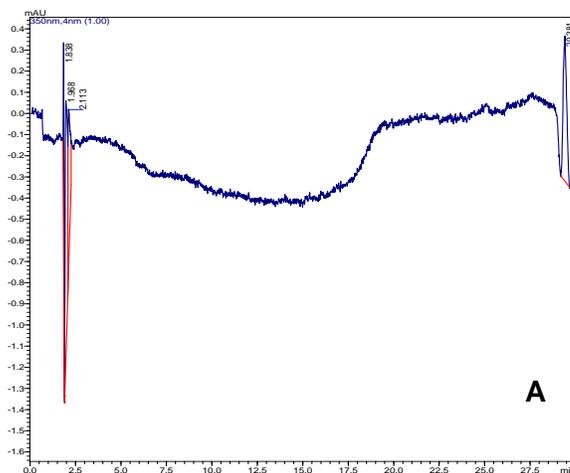
A partir de los resultados, se tiene que el espectro UV de la rutina en ambos casos presenta una similitud del 99,9% y la pureza del pico en el extracto es del 100,0%, lo anterior según análisis realizado a través del software LCsolution®, indicando que a

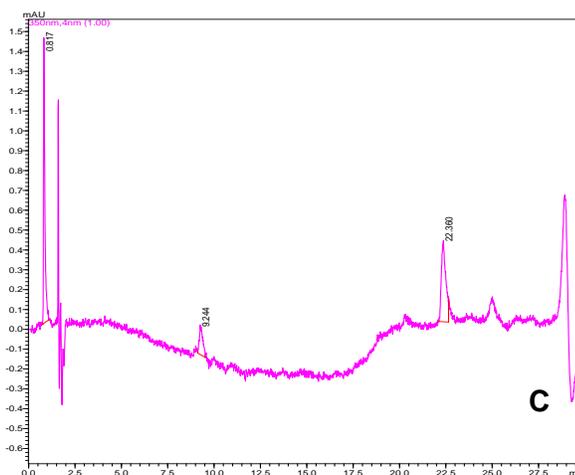
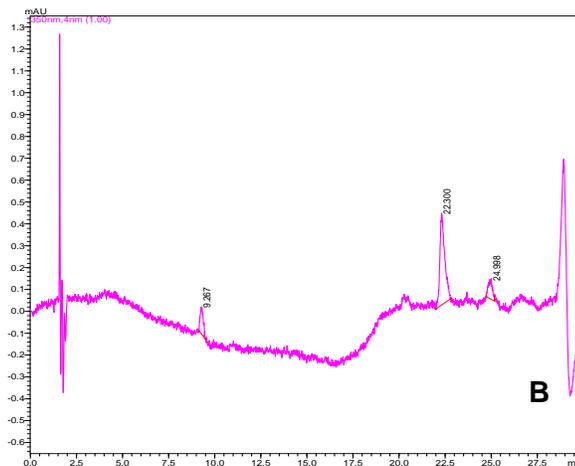
través de la metodología de trabajo empleada es posible obtener una señal que corresponde inequívocamente a la rutina sin presencia de interferencia por co-elución de otros componentes de la matriz.

Cuando se requiere cuantificar algún analito presente en una matriz vegetal, uno de los principales retos en el desarrollo y validación del método cromatográfico es lograr que éste sea específico y selectivo, dada la complejidad de éstas matrices, ya que generalmente presentan grupos de compuestos de características similares. Por esta razón, es necesario comprobar que los componentes endógenos de la matriz no generan ninguna interferencia con la molécula de interés, así como los posibles productos de degradación.

Para la evaluación de la especificidad en el sistema se hicieron lecturas de las matrices sin adición de rutina para identificar si éstas presentan algún tipo de interferencia. Se evaluó metanol, sin observar interferencias en el tiempo de retención de la rutina (Tabla 5-1). Así mismo, se analizaron cada una de las matrices (soluciones de micropartículas vacías preparadas con Eudragit® E PO y Eudragit® RS 100 a 2 mg/mL en metanol), incluyendo el metanol, y en ninguna se encontraron interferencias en el tiempo de retención de la rutina como se observa en la Figura 5-6.

**Figura 5- 6.** Cromatograma obtenido a partir de, A) Metanol, B) Eudragit® E PO en metanol 2 mg/mL, C) Eudragit® RS 100 en metanol 2 mg/mL





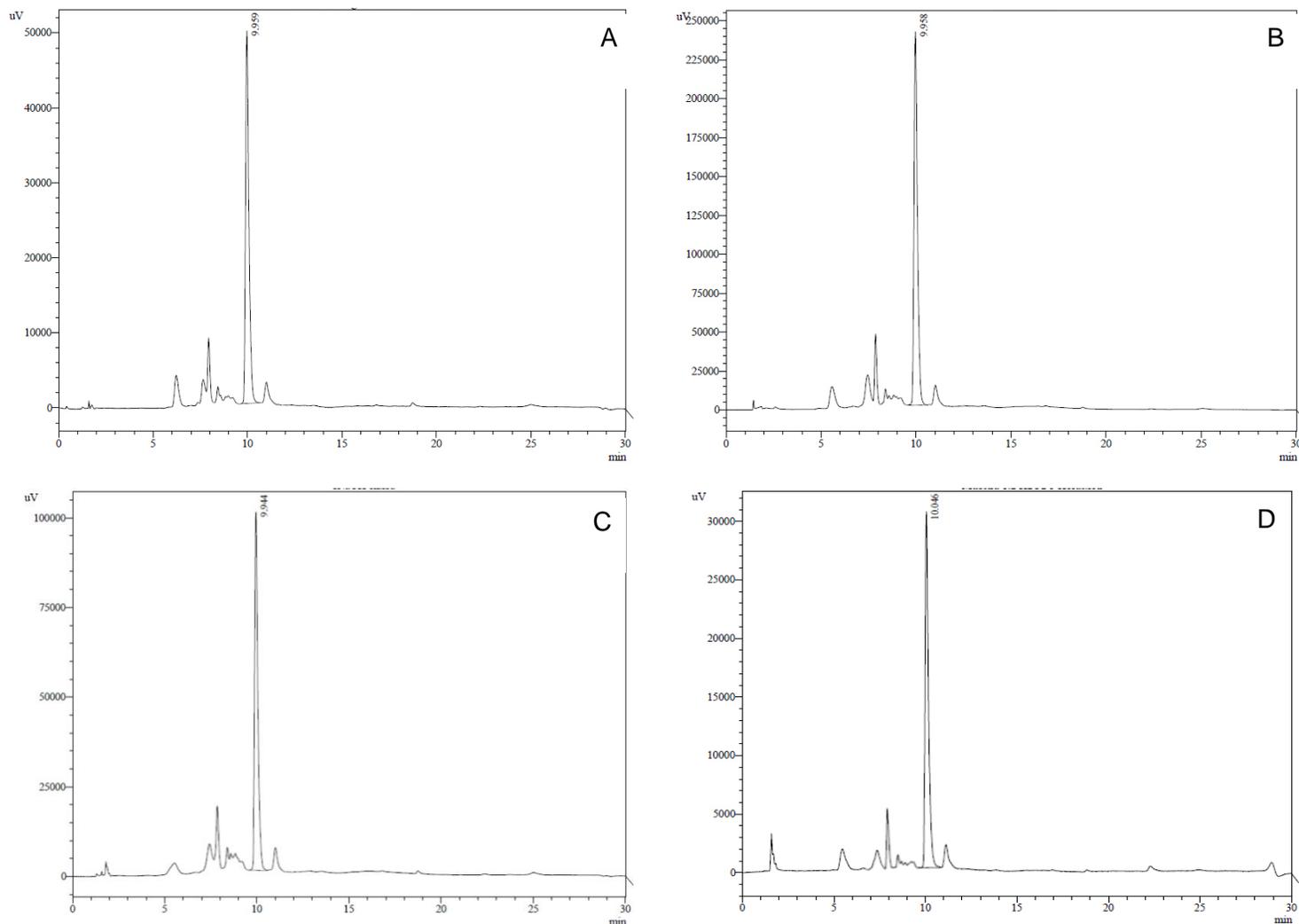
Fase estacionaria: Columna Phenomenex® 10 $\mu$ m C-18 (150 x 3,9 mm) a una temperatura de 35°C. Fase móvil: Gradiente combinando Solvente A (MeOH con 0,5% de ác. acético) y Solvente B (H<sub>2</sub>O con 0,5% de ác. acético) de la siguiente manera: 10 – 50% A (0 – 5 min), 50% A (5 – 10 min), 50 – 80% A (10 – 15 min) y 80% A (15 – 25 min). Volumen de inyección 10  $\mu$ L y flujo de 1,0mL/min. El cromatograma se registró a 350 nm

**Tabla 5- 1.** Tiempos de retención obtenidos para la rutina en cada una de las matrices

<b>Tiempo retención (min)</b>				
	<b>Rutina estándar</b>	<b>Rutina + Extracto</b>	<b>Rutina + Eudragit® E PO</b>	<b>Rutina + Eudragit® RS 100</b>
	10,02	9,98	10,00	10,04
	10,04	10,00	10,04	10,03
	10,01	10,01	10,02	10,02
	10,00	10,03	10,00	10,00
	9,99	10,01	10,03	10,07
	10,01	9,99	9,99	9,99
<b>Promedio</b>	10,01	10,01	10,01	10,02
<b>Desvest</b>	0,02	0,01	0,02	0,03
<b>CV</b>	0,17%	0,14%	0,19%	0,27%

Dada la imposibilidad de adquirir todos los posibles compuestos que conforman la matriz vegetal, ya que no se tiene conocimiento completo de su composición, se llevó a cabo un proceso de estrés con la finalidad de generar compuestos potencialmente interferentes, tanto de la matriz como de la rutina. Como se observa en la figura 5-7, la molécula de rutina sufre degradación en diferentes niveles para cada caso, siendo la hidrólisis alcalina la que genera un cambio más drástico en la molécula. Como se observó anteriormente, la molécula de rutina presenta una aglicona tipo quercetina, por lo que probablemente los procesos de degradación de la rutina son similares a los que presenta la quercetina [150].

**Figura 5- 7.** Cromatogramas obtenidos a partir de una solución de extracto etanólico de cálices de *Physalis peruviana*. A: Extracto sin degradar, B: Degradación del extracto con HCl 0,1 N, C: Degradación del extracto con NaOH 0,1 N, D: Degradación del extracto con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%



*Fase estacionaria: Columna Phenomenex® 10µm C-18 (150 x 3,9 mm) a una temperatura de 35°C. Fase móvil: Gradiente combinando Solvente A (MeOH con 0,5% de ác. acético) y Solvente B (H<sub>2</sub>O con 0,5% de ác. acético) de la siguiente manera: 10 – 50% A (0 – 5 min), 50% A (5 – 10 min), 50 – 80% A (10 – 15 min) y 80% A (15 – 25 min). Volumen de inyección 10 µL y flujo de 1,0mL/min. El cromatograma se registró a 350 nm*

En los cromatogramas es posible distinguir una disminución en el área del pico de rutina, además según análisis por pureza de pico se determinó que no existen interferencias en el tiempo de retención de la rutina.

**5.2.2.2.2 Linealidad**

Para determinar la linealidad de rutina en el sistema y en cada una de las matrices estudiadas, se realizaron análisis por triplicado, a 6 niveles de concentración obteniendo los resultados reportados en las Tablas 5-2 a 5-17 y en las Gráficas 5-3 a 5-6.

**Sistema: Metanol****Tabla 5- 2.** Evaluación de linealidad en el sistema

Concentración Rutina ( $\mu\text{g/mL}$ )	Promedio Área (mAU)	Desviación Estándar	Coefficiente de variación (%)
40	694036,00	10861,72	1,57
20	357728,00	4199,93	1,17
10	179854,00	2413,49	1,34
2,5	45926,33	602,30	1,31
0,3125	6088,33	41,68	0,68
0,15625	3483,33	7,51	0,22

Sistema: Metanol. Concentración utilizada en  $\mu\text{g/mL}$ . Respuesta obtenida en el cromatógrafo: Área en mAU para 350nm

**Tabla 5- 3.** Parámetros estadísticos "t" student para la evaluación de la linealidad de rutina en el sistema

Parámetro	Valor	Hipótesis nula	$t_{\text{exp}}$	$t_{\text{tab}} (16; 0,05)$
Intercepto (a)	3223,30	$H_0: \alpha = 0$	1,78	2,12
Pendiente (b)	17374,23	$H_0: \beta = 0$	179,57	2,12
Correlación (r)	0,9997	$H_0: r = 0$	8063,53	2,12

**Tabla 5- 4.** Parámetros estadísticos ANOVA para la evaluación linealidad de rutina en el sistema

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	$F_{\text{exp}}$	$F_{\text{tab}}$
Regresión	1	$1,1039 \times 10^{12}$	$1,1039 \times 10^{12}$	32246,11	4,49 (1; 16; 0,05)
Error	16	547730185	34233136,6		
Desvío de linealidad	4	264118465	66029616,3	2,79	3,26 (4; 12; 0,05)
Error puro	12	283611720	23634310		

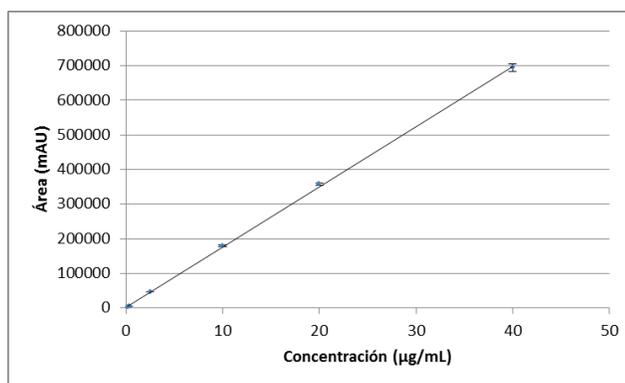
**Tabla 5- 5.** Test de Cochran para la evaluación de la linealidad de rutina en el sistema

Concentración (µg/mL)	Factor respuesta (x/y)	Promedio	Desv. Estándar	Varianza (S <sup>2</sup> )
40	17039,025	17350,900	271,543	73735,613
	17478,800			
	17534,875			
20	17742,350	17886,400	209,996	44098,457
	18127,350			
	17789,500			
10	17766,300	17985,400	241,349	58249,330
	18244,100			
	17945,800			
2,5	18575,600	18370,533	240,921	58043,093
	18430,800			
	18105,200			
0,3125	19337,600	19482,667	133,380	17790,293
	19510,400			
	19600,000			
0,15625	22265,600	22293,333	48,036	2307,413
	22265,600			
	22348,800			

<b>G<sub>exp</sub></b>	0,22
<b>G<sub>tab</sub></b>	0,61 (6; 2; 0,05)

**Gráfica 5- 3.** Curva de calibración para rutina en el sistema (metanol)

Ecuación de la recta:  $y = 17374,23X + 3223,30$  ( $r^2 = 0,9995$ )



Datos expresados como el promedio  $\pm$  desviación estándar

**Método 1: Extracto de cálices de *P. peruviana*****Tabla 5- 6.** Evaluación de linealidad en el método 1: Extracto de cálices de *Physalis peruviana*

Concentración Rutina ( $\mu\text{g/mL}$ )	Promedio Área (mAU)	Desviación Estándar	Coefficiente de variación (%)
40	848590,00	3642,60	0,43
20	498972,67	3327,91	0,67
10	326737,33	1611,55	0,49
2,5	197192,33	1882,49	0,95
0,3125	155711,67	269,87	0,17

Concentración utilizada en  $\mu\text{g/mL}$ . Respuesta obtenida en el cromatógrafo: Área en mAU para 350nm.

**Tabla 5- 7.** Parámetros estadísticos "t" student para la evaluación de la linealidad de rutina en el método 1: Extracto de cálices de *Physalis peruviana*

Parámetro	Valor	Hipótesis nula	$t_{\text{exp}}$	$t_{\text{tab}} (13; 0,05)$
Intercepto (a)	152459,04	$H_0: \alpha = 0$	193,01	2,16
Pendiente (b)	17323,29	$H_0: \beta = 0$	450,14	2,16
Correlación (r)	0,9999	$H_0: r = 0$	56198,98	2,16

**Tabla 5- 8.** Parámetros estadísticos ANOVA para la evaluación de la linealidad de rutina en el método 1: Extracto de cálices de *Physalis peruviana*

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	$F_{\text{exp}}$	$F_{\text{tab}}$
Regresión	1	$9,4172 \times 10^{11}$	$9,4172 \times 10^{11}$	202621,79	4,67 (1; 13; 0,05)
Error	13	60419508,1	4647654,471		
Desvío de linealidad	3	23770067,5	7923355,82	2,16	3,26 (4; 12; 0,05)
Error puro	10	36649440,7	3664944,067		

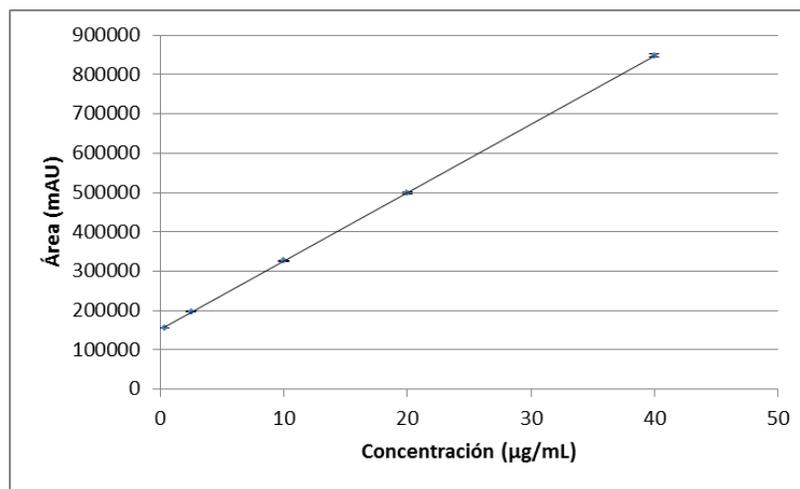
**Tabla 5- 9.** Test de Cochran para la evaluación de la linealidad de rutina en el método 1: Extracto de cálices de *Physalis peruviana*

Concentración (µg/mL)	Factor respuesta (x/y)	Promedio	Desv. Estándar	Varianza (S <sup>2</sup> )
40	21126,475	21125,825	25,306	640,407
	21100,200			
	21150,800			
20	24850,150	24948,633	166,396	27687,491
	25140,750			
	24855,000			
10	32525,700	32673,733	161,155	25970,923
	32845,400			
	32650,100			
2,5	78966,400	78876,933	752,997	567004,213
	78083,200			
	79581,200			
0,3125	499283,200	498277,333	928,575	862252,373
	497452,800			
	498096,000			

<b>G<sub>exp</sub></b>	0,58
<b>G<sub>tab</sub></b>	0,68 (5; 2; 0,05)

**Gráfica 5- 4.** Curva de calibración para rutina en el método 1: Extracto de cálices de *Physalis peruviana*

Ecuación de la recta:  $y = 17323,29X + 152459,04$  ( $r^2 = 0,9999$ )



Datos expresados como el promedio ± desviación estándar

**Método 2: Micropartículas con Eudragit® E PO.****Tabla 5- 10.** Evaluación de linealidad en el método 2: Micropartículas con Eudragit® E PO

Concentración Rutina ( $\mu\text{g/mL}$ )	Promedio Área (mAU)	Desviación Estándar	Coefficiente de variación (%)
40	693399,67	10899,52	1,57
20	357019,33	2027,05	0,57
10	179383,33	512,32	0,29
2,5	46114,00	204,12	0,44
0,3125	6104,33	11,93	0,20
0,15625	3471,00	26,46	0,76

Concentración utilizada en  $\mu\text{g/mL}$ . Respuesta obtenida en el cromatógrafo: Área en mAU para 350nm

**Tabla 5- 11.** Parámetros estadísticos "t" student para la evaluación de la linealidad de rutina en el método 2: Micropartículas con Eudragit® E PO

Parámetro	Valor	Hipótesis nula	$t_{\text{exp}}$	$t_{\text{tab}} (16; 0,05)$
Intercepto (a)	3193,09	$H_0: \alpha = 0$	1,86	2,12
Pendiente (b)	17354,46	$H_0: \beta = 0$	189,98	2,12
Correlación (r)	0,9998	$H_0: r = 0$	9024,78	2,12

**Tabla 5- 12.** Parámetros estadísticos ANOVA para la evaluación de la linealidad de rutina en el método 2: Micropartículas con Eudragit® E PO

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	$F_{\text{exp}}$	$F_{\text{tab}}$
Regresión	1	$1,1014 \times 10^{12}$	$1,1014 \times 10^{12}$	36091,12	4,49 (1; 16; 0,05)
Error	16	488263708	30516481,7		
Desvío de linealidad	4	241836889	60459222,3	2,94	3,26 (4; 12; 0,05)
Error puro	12	246426819	20535568,2		

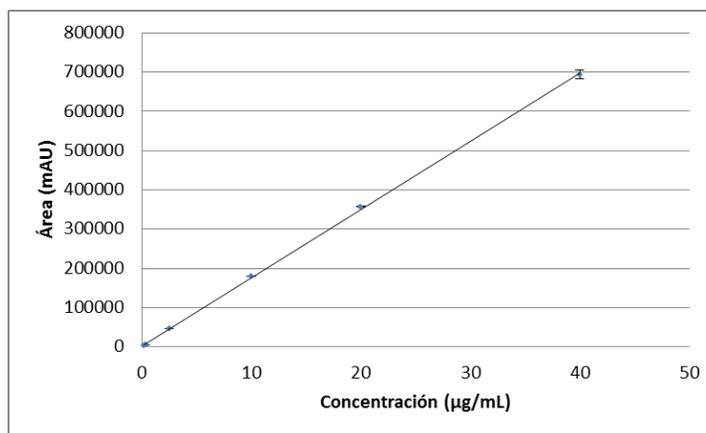
**Tabla 5- 13.** Test de Cochran para la evaluación de la linealidad de rutina en el método 2: Micropartículas con Eudragit® E PO

Concentración (µg/mL)	Factor respuesta (x/y)	Promedio	Desv. Estándar	Varianza (S <sup>2</sup> )
40	17370,73	17334,99	272,49	74249,68
	17587,85			
	17046,40			
20	17828,25	17850,97	101,35	10272,37
	17762,90			
	17961,75			
10	17896,30	17938,33	51,23	2624,70
	17923,30			
	17995,40			
2,5	18506,40	18445,60	81,65	6666,24
	18352,80			
	18477,60			
0,3125	19577,60	19533,87	38,18	1457,49
	19507,20			
	19516,80			
0,15625	22342,40	22214,40	169,33	28672,00
	22022,40			
	22278,40			

<b>G<sub>exp</sub></b>	0,60
<b>G<sub>tab</sub></b>	0,62 (6; 2; 0,05)

**Gráfica 5- 5.** Curva de calibración para rutina en el método 2: Micropartículas con Eudragit® E PO

Ecuación de la recta:  $y = 17354,46X + 3193,09$  ( $r^2 = 0,9995$ )



Datos expresados como el promedio  $\pm$  desviación estándar

**Método 3: Micropartículas con Eudragit® RS 100.****Tabla 5- 14.** Evaluación de linealidad en el método 3: Micropartículas con Eudragit® RS 100

Concentración Rutina ( $\mu\text{g/mL}$ )	Promedio Área (mAU)	Desviación Estándar	Coefficiente de variación (%)
40	691957,33	15123,68	2,19
20	360690,67	2765,81	0,77
10	178466,33	546,15	0,31
2,5	45554,33	318,55	0,70
0,3125	5054,00	63,65	1,26
0,15625	2546,67	90,51	3,55

Concentración utilizada en  $\mu\text{g/mL}$ . Respuesta obtenida en el cromatógrafo: Área en mAU para 350nm

**Tabla 5- 15.** Parámetros estadísticos “t” student para la evaluación de la linealidad de rutina en el método 3: Micropartículas con Eudragit® RS 100

Parámetro	Valor	Hipótesis nula	$t_{\text{exp}}$	$t_{\text{tab}} (16; 0,05)$
Intercepto (a)	2794,26	$H_0: \alpha = 0$	1,15	2,12
Pendiente (b)	17370,50	$H_0: \beta = 0$	134,99	2,12
Correlación (r)	0,9996	$H_0: r = 0$	4557,57	2,12

**Tabla 5- 16.** Parámetros estadísticos ANOVA para la evaluación de la linealidad de rutina en el método 3: Micropartículas con Eudragit® RS 100

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	$F_{\text{exp}}$	$F_{\text{tab}}$
Regresión	1	$1,1034 \times 10^{12}$	$1,1034 \times 10^{12}$	18222,29	4,49 (1; 16; 0,05)
Error	16	968845449	60552840,6		
Desvío de linealidad	4	495270704	123817676	3,14	3,26 (4; 12; 0,05)
Error puro	12	473574745	39464562,1		

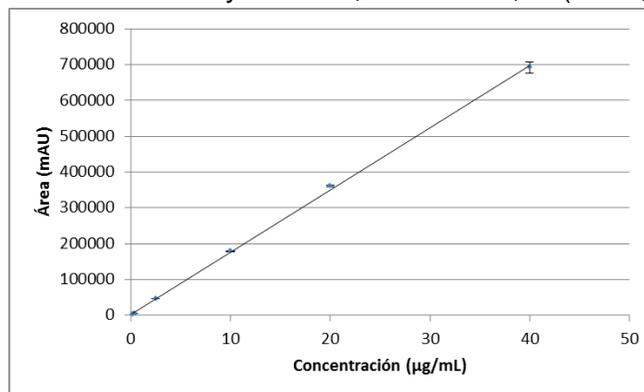
**Tabla 5- 17.** Test de Cochran para la evaluación de la linealidad de rutina en el método 3:  
Micropartículas con Eudragit® RS 100

Concentración (µg/mL)	Factor respuesta (x/y)	Promedio	Desv. Estándar	Varianza (S <sup>2</sup> )
40	17734,80	17298,93	378,09	142953,54
	17102,65			
	17059,35			
20	18193,75	18034,53	138,29	19124,29
	17944,35			
	17965,50			
10	17909,10	17846,63	54,62	2982,81
	17822,90			
	17807,90			
2,5	18326,80	18221,73	127,42	16235,89
	18258,40			
	18080,00			
0,3125	16156,80	16172,80	203,67	41482,24
	15977,60			
	16384,00			
0,15625	16883,20	16298,67	579,27	335557,97
	15724,80			
	16288,00			

<b>G<sub>exp</sub></b>	0,60
<b>G<sub>tab</sub></b>	0,62 (6; 2; 0,05)

**Gráfica 5- 6.** Curva de calibración para rutina en el método 3: Micropartículas con Eudragit® RS 100

Ecuación de la recta:  $y = 17370,50X + 2794,26$  ( $r^2 = 0,9991$ )



La linealidad es la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido. El estudio de la linealidad no sólo implica una representación gráfica sino que es necesario realizar una comprobación estadística [149].

El coeficiente de correlación nos indica el grado de relación entre la variable “X” (concentración), y la variable “Y” (área bajo la curva). La información obtenida mediante el cálculo de “r” es limitada y no justifica por sí sola la linealidad, siendo el coeficiente de determinación “r<sup>2</sup>” el que aporta una mayor significación estadística [149]. Como se observa en los resultados expuestos anteriormente, el coeficiente de determinación en todos los casos fue mayor a 0,9991 confirmando que existe una correlación entre la concentración y la respuesta del equipo cromatográfico dentro del rango estudiado.

Para determinar la homogeneidad de las varianzas se realizó un test de Cochran, con la finalidad de verificar si el factor concentración tiene alguna influencia en la variabilidad de los resultados, encontrando para cada uno de los casos un valor de  $G_{exp}$  menor al  $G_{tab}$ , lo cual indica que las varianzas no son estadísticamente diferentes entre sí, es decir, las varianzas de las concentraciones son homogéneas indicando que el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

Posteriormente, se determinó el estadístico “t” de Student para el coeficiente de correlación (r), la pendiente (b) y el intercepto (a) con el fin de verificar la linealidad. Para el sistema, el método 2 y 3, el t experimental para el intercepto fue menor que el t tabulado por lo que no fue posible rechazar la hipótesis nula, afirmando que la recta presenta un intercepto con el eje Y que no es significativamente diferente de cero, existiendo una convergencia al origen; sin embargo, en el caso del método 1, que hace referencia al extracto, el t calculado fue mayor al tabulado, ya que el extracto posee una concentración significativa de rutina, por lo que la curva de calibración en este caso no converge al origen. Para (r) y (b) en todos los casos se obtuvo que el t experimental fue mayor al t tabulado por lo que se rechaza la hipótesis nula afirmando que si son estadísticamente diferentes de cero y existe una correlación significativa entre las dos

variables, concentración (X) y área bajo la curva (Y) con un nivel de confiabilidad del 95%. Por otro lado, mediante un análisis de varianza se encontró en todos los casos para la regresión que  $F_1$  experimental fue mayor al F tabulado lo que indica que sí existe una regresión significativa y, el  $F_2$  experimental fue menor al F tabulado lo que indica que no un desvío significativo de la linealidad.

En resumen, el rango de la presente metodología se establece entre 0,15625 a 40  $\mu\text{g/mL}$ , valores de concentración de las muestras entre los cuales se ha demostrado que existe linealidad en el sistema, el método 2 y el método 3. Para el caso del método 1 el rango se establece entre 0,3125 a 40  $\mu\text{g/mL}$ .

#### **5.2.2.2.3** Precisión

La precisión hace referencia a la concordancia entre los distintos resultados obtenidos cuando el procedimiento se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra homogénea, pero sin tener en cuenta su proximidad al valor real. Se evaluó por medio del coeficiente de variación (CV%), a dos niveles intradía (Repetibilidad) e interdía (Precisión Intermedia), siendo el valor de aceptación para cada nivel de  $CV \leq 5\%$ .

La precisión intradía se evaluó en muestras preparadas dentro del mismo día (a tres niveles de concentración). Por su lado, la precisión interdía se evaluó en muestras preparadas en tres días diferentes (a un nivel de concentración). En la tabla 5-18 y 5-19 se presentan los resultados obtenidos.

**Tabla 5- 18.** Precisión intradía (Repetibilidad) evaluada en el sistema y en cada una de las matrices

Ensayo	Sistema (área mAU)	Rutina + Extracto (área mAU)	Rutina + Eudragit® E PO (área mAU)	Rutina + Eudragit® RS 100 (área mAU)
<b>40 µg/mL</b>				
1	681561	845059	694829	709392
2	699152	844008	703514	684106
3	701395	846032	681856	682374
<b>Promedio</b>	694036,00	845033,00	693399,67	691957,33
<b>Desvest</b>	10861,72	1012,25	10899,52	15123,68
<b>CV (%)</b>	<b>1,57</b>	<b>0,12</b>	<b>1,57</b>	<b>2,19</b>
<b>2,5 µg/mL</b>				
1	46439	197416	46266	45817
2	46077	195208	45882	45646
3	45263	198953	46194	45200
<b>Promedio</b>	45926,3333	197192,33	46114,00	45554,33
<b>Desvest</b>	602,303	1882,49	204,12	318,55
<b>CV (%)</b>	<b>1,311</b>	<b>0,95</b>	<b>0,44</b>	<b>0,70</b>
<b>0,15625 µg/mL</b>				
1	3479	156026	3491	2638
2	3479	155454	3441	2457
3	3492	155655	3481	2545
<b>Promedio</b>	3483,33	155711,67*	3471,00	2546,67
<b>Desvest</b>	7,51	290,18	26,46	90,51
<b>CV (%)</b>	<b>0,22</b>	<b>0,19</b>	<b>0,76</b>	<b>3,55</b>

\*Promedio de área correspondiente a una concentración de 0,3125 µg/mL

**Tabla 5- 19.** Precisión interdía (precisión intermedia) evaluada en el sistema y en cada una de las matrices a una concentración de 2,5 µg/mL

Día	Sistema (área mAU)	Rutina + Extracto (área mAU)	Rutina + Eudragit® E PO (área mAU)	Rutina + Eudragit® RS 100 (área mAU)
1	46439	197416	46266	45817
	46077	195208	45882	45646
	45263	198953	46194	45200
2	48342	197781	50266	42817
	48426	198964	49682	42646
	47743	201433	49194	42200

3	46308	197325	47687	43533
	46126	197191	47508	43315
	45151	196146	48179	42928
<b>Promedio</b>	46652,78	197824,11	47873,11	43789,11
<b>Desvest</b>	1314,64	1366,94	1595,74	1385,63
<b>CV (%)</b>	<b>2,82</b>	<b>0,69</b>	<b>3,33</b>	<b>3,16</b>

De acuerdo a los resultados obtenidos y mostrados previamente, para repetibilidad y precisión intermedia el CV% fue inferior al 4% en todos los casos. Es así como los valores encontrados fueron apropiados para la validación del método en las matrices de acuerdo al criterio de aceptación planteado, en el que se acepta un CV% <5%, por lo que fue posible concluir que cada uno de los métodos evaluados se consideran precisos en las condiciones trabajadas.

#### 5.2.2.2.4 Exactitud

La exactitud de un procedimiento analítico expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como valor verdadero o un valor referencia y el valor experimental encontrado [149]. Para determinar la exactitud de la medida en cada matriz de estudio se realizaron medidas por triplicado a un nivel de concentración a través de un ensayo de adición de estándar, como se describe en la metodología. Los resultados expresados en términos de porcentaje de recuperación se exponen en la tabla 5-20.

**Tabla 5- 20.** Exactitud evaluada en cada una de las matrices, expresada como %recuperación

<b>Matriz</b>	<b>Estándar + Diluyente (área mAU)</b>	<b>Matriz + Diluyente (área mAU)</b>	<b>Estándar + Matriz (área mAU)</b>	<b>% Recuperación</b>
<b>Extracto</b>	27793	70557	100321	102,00
	27643	70468	100201	102,13
	26580	69741	98842	102,62
	Promedio 27338,67	70255,33	99788	102,25
	Desvest 661,29	447,64	821,45	0,32
	CV (%) 2,42	0,637	0,82	0,32
<b>Eudragit® E PO</b>	19640	0	19407	98,81
	19581	0	19195	98,03

Promedio Desvest CV (%)	19721	0	19145	97,08
	19647,33	0	19249	97,97
	70,29	0,00	139,10	0,87
	0,36	-----	0,72	0,89
<b>Eudragit® RS 100</b>  Promedio Desvest CV (%)	20627	0	20514	99,45
	21067	0	19992	94,90
	20552	0	20502	99,76
	20748,67	0	20336	98,04
	278,22	0,00	297,97	2,72
	1,34	-----	1,47	2,78

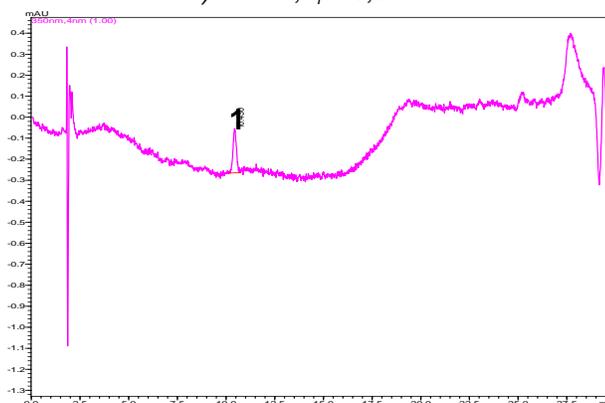
Concentración del estándar de Rutina 2,5 µg/mL. Concentración de cada matriz 1 mg/mL.  
Diluyente: Metanol. Cada ensayo fue preparado a una proporción 1:1 de cada componente

De acuerdo a los resultados obtenidos y mostrados previamente, para la exactitud el CV% fue inferior al 3% en todos los casos, además cada matriz presentó un %Recuperación entre 95% a 105%, criterio de aceptación aplicado para este parámetro. Aunque es deseable alcanzar valores de recuperación cercanos al 100%, en matrices complejas como los productos naturales sólo se obtienen valores del 50, 80 o 90% [149]; sin embargo, para el extracto de *P. peruviana* se alcanzó un porcentaje de recuperación de 102,25%.

#### 5.2.2.2.5 Límite de cuantificación y límite de detección

El límite de cuantificación representa la más baja concentración de la sustancia en análisis que puede ser cuantitativamente determinada con adecuada precisión, siendo para este caso el nivel bajo de la curva, determinado experimentalmente; además, como se puede observar en la figura 5-8, la relación señal – ruido es aproximadamente de 10:1.

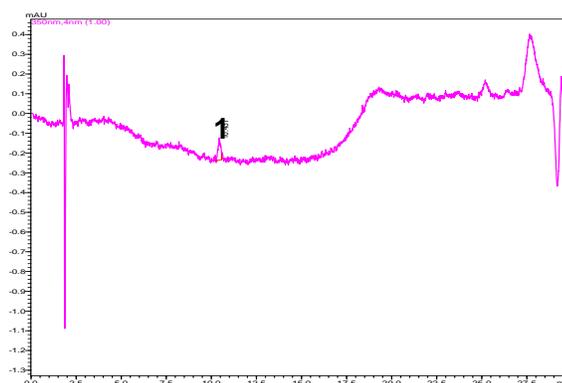
**Figura 5- 8.** Cromatograma obtenido a partir de una solución de rutina estándar a 0,15625  $\mu\text{g/mL}$ .  
1) Rutina,  $t_r$ : 10,0 min



Fase estacionaria: Columna Phenomenex® 10 $\mu\text{m}$  C-18 (150 x 3,9 mm) a una temperatura de 35°C. Fase móvil: Gradiente combinando Solvente A (MeOH con 0,5% de ác. acético) y Solvente B (H<sub>2</sub>O con 0,5% de ác. acético) de la siguiente manera: 10 – 50% A (0 – 5 min), 50% A (5 – 10 min), 50 – 80% A (10 – 15 min) y 80% A (15 – 25 min). Volumen de inyección 10  $\mu\text{L}$  y flujo de 1,0mL/min. El cromatograma se registró a 350 nm

El límite de detección representa la más baja concentración de la sustancia en análisis que el método analítico puede diferenciar, pero no cuantificar bajo las condiciones del ensayo. Este parámetro se determinó experimentalmente teniendo en cuenta que la relación señal – ruido debe ser 3:1 (Figura 5-9).

**Figura 5- 9.** Cromatograma obtenido a partir de una solución de rutina estándar a 0,0078125  $\mu\text{g/mL}$ . 1) Rutina,  $t_r$ : 10,0 min



Fase estacionaria: Columna Phenomenex® 10 $\mu\text{m}$  C-18 (150 x 3,9 mm) a una temperatura de 35°C. Fase móvil: Gradiente combinando Solvente A (MeOH con 0,5% de ác. acético) y Solvente B (H<sub>2</sub>O con 0,5% de ác. acético) de la siguiente manera: 10 – 50% A (0 – 5 min), 50% A (5 – 10 min), 50 – 80% A (10 – 15 min) y 80% A (15 – 25 min). Volumen de inyección 10  $\mu\text{L}$  y flujo de 1,0mL/min. El cromatograma se registró a 350 nm

En resumen, se desarrolló y validó un método cromatográfico que permitió una adecuada separación de la rutina de los demás componentes del extracto de cálices de *P. peruviana*, en términos de idoneidad, lo cual implica un tiempo de retención corto y valores aceptables de factor de capacidad, selectividad y resolución. Además, se determinó que este método posee tanto selectividad como especificidad, ya que proporciona una señal de rutina con una pureza de pico satisfactoria en función del espectro UV de esta, así como evita la interferencia de componentes de las diferentes matrices (extracto vegetal, Eudragit® E PO y Eudragit® RS 100). Por otro lado, la curva de calibración construida con la rutina estándar presentó una adecuada linealidad en el rango de trabajo, demostrada para el sistema y las matrices de Eudragit® E PO y Eudragit® RS 100, según análisis estadístico. Sin embargo, es importante señalar que la linealidad estudiada en la matriz del extracto etanólico a pesar de tener la capacidad de suministrar resultados que son directamente proporcionales a la concentración de la rutina, no es una curva de calibración que pueda ser empleada en el trabajo rutinario, ya que por tener una considerable concentración intrínseca de rutina (0,8397 µg Rutina/mg Extracto, según cuantificación empleando la curva de calibración del sistema) se genera un sesgo en los resultados. Por lo tanto, se recomienda para la cuantificación de rutina en extractos etanólicos el uso de la curva de calibración construida para verificar la linealidad en el sistema, teniendo en cuenta que la presencia de esta matriz no genera variaciones en la respuesta de la señal respecto a la concentración y por ello no genera variaciones significativas en cuanto a la pendiente de la recta. Por último, se comprobó una adecuada precisión y exactitud del método. Por todo lo anterior, se puede concluir que el método cromatográfico desarrollado para la cuantificación de rutina en extractos de cálices de *P. peruviana* y en matrices de micropartículas es apto para ser empleado.

## 6. Ensayos preliminares de microencapsulación

### 6.1 Metodología

#### 6.1.1 Reactivos

Rutina [quercetina-3-O-rutinosido] adquirida de Sigma. Ácido acético (Grado reactivo analítico) de Merck. Metanol (Grado HPLC) de JT Baker. Agua de calidad HPLC obtenida a través del sistema Milli-Q de Millipore Co®. Diclorometano y Acetona (Merck). Eudragit® E PO y Eudragit® RS 100 (Evonik Industries, Alemania). Polivinil alcohol (PVA) Mw 31000 –50000 daltons, 87 - 89% hidrolizado (Sigma – Aldrich).

#### 6.1.2 Elaboración de las micropartículas

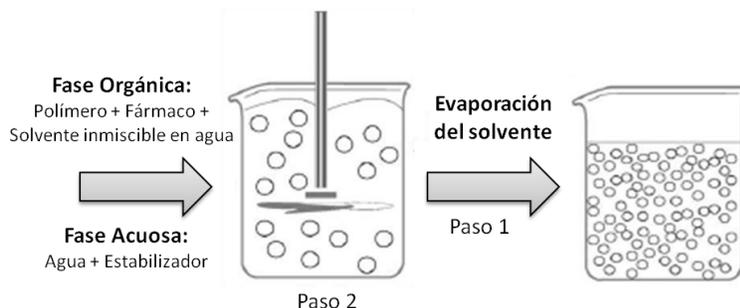
Para confirmar el uso de la metodología de cuantificación por HPLC-DAD de rutina, en la caracterización de micropartículas a partir de extracto etanólico de *P. peruviana*, se realizaron estudios de microencapsulación del mismo.

Las micropartículas utilizadas en este estudio fueron obtenidas a través de dos métodos, secado por aspersión y emulsificación – evaporación del solvente, utilizando diferentes polímeros, Eudragit® E PO y Eudragit® RS 100, respectivamente.

En el método de secado por aspersión el polímero y el extracto etanólico fueron disueltos en un solvente orgánico volátil (acetona). Esta solución fue atomizada en una corriente de aire caliente. La atomización conduce a la formación de pequeñas gotas o fina niebla de la que el disolvente se evapora instantáneamente, conduciendo a la formación de las microesferas. Las micropartículas se separan del aire caliente por medio del separador ciclónico mientras que las trazas de disolvente se eliminan por secado al vacío (Figura 6-1).

**Figura 6- 1.** Equipo de *spray-drying*

En el caso del método de emulsificación – evaporación del solvente, el polímero y el extracto etanólico se disolvieron en diclorometano. A continuación la fase orgánica se emulsificó con la fase acuosa que contenía alcohol polivinílico como agente estabilizante. Se llevó a cabo por un proceso de homogenización usando ultraturrax® T-10. Una vez formada la emulsión se mantuvo bajo agitación constante durante 4 horas con el fin de eliminar el solvente orgánico por evaporación e inducir la formación de las micropartículas. Posteriormente, fueron separadas por centrifugación, lavadas con agua destilada y liofilizadas (Figura 6-2).

**Figura 6- 2.** Esquema de preparación de micropartículas por emulsificación – evaporación del solvente

Para cada uno de los métodos se elaboró un diseño estadístico experimental (Tabla 6-1 y 6-2), con la finalidad de generar información preliminar acerca de la microencapsulación del extracto etanólico de cálices de *P. peruviana*.

**Tabla 6- 1.** Diseño experimental factorial reducido para la elaboración de micropartículas por secado por aspersion (Statgraphics®)

Ensayo	A	B	C	D	E
1	+	-	+	+	+
2	-	+	+	-	-
3	-	+	-	+	+
4	+	-	+	-	-
5	+	+	+	+	-
6	-	+	+	+	+
7	+	+	-	-	+
8	-	+	-	-	-
9	-	-	-	-	+
10	+	-	-	+	+
11	-	-	+	+	-
12	+	-	-	-	-

Parámetro		+	-
<b>A</b>	Temperatura de entrada (°C)	60	40
<b>B</b>	Velocidad de aspersion (mL/min)	15	5
<b>C</b>	Flujo del aspirador (rpm)	100	80
<b>D</b>	Proporción Polímero – Extracto	2:1	3:1
<b>E</b>	Volumen a asperjar (mL)	50	30

**Tabla 6- 2.** Diseño experimental factorial reducido para la elaboración de micropartículas por emulsificación – evaporación del solvente (Statgraphics®)

Ensayo	A	B	C	D	E	F	G
1	-	-	+	-	+	+	-
2	-	+	-	-	+	-	+
3	-	+	+	+	-	+	+
4	+	-	-	-	-	+	+
5	+	-	+	+	+	-	+
6	+	+	-	+	+	+	-
7	-	-	+	+	-	-	-
8	+	+	-	-	-	-	-

	<b>Parámetro</b>	<b>+</b>	<b>-</b>
<b>A</b>	Polímero (mg/mL)	4	2
<b>B</b>	PVA (%)	4	2
<b>C</b>	Proporción Polímero – Extracto	2:1	1:1
<b>D</b>	Temperatura agitación (°C)	35	25
<b>E</b>	Fase acuosa (mL)	50	100
<b>F</b>	Intensidad de agitación (rpm)	11000	24000
<b>G</b>	Tiempo agitación (min)	5	2

### 6.1.3 Caracterización de las micropartículas

#### 6.1.3.1 Rendimiento del proceso

El rendimiento del proceso fue evaluado como la cantidad de micropartículas obtenidas con respecto a la cantidad total de material que se emplea para realizar el proceso, expresado en porcentaje.

Las micropartículas obtenidas se pesaron y se determinó el rendimiento del proceso mediante la siguiente ecuación 6-1.

**Ecuación 6- 1.** Rendimiento de las micropartículas

$$\text{Rendimiento Micropartículas (\%)} = \frac{\text{Peso micropartículas}}{(\text{Peso polímero} + \text{Peso extracto})} \times 100$$

#### 6.1.3.2 Contenido de extracto en las micropartículas

El contenido de extracto en las micropartículas se evaluó mediante HPLC-DAD a través de la metodología de cuantificación validada en el presente trabajo. Una cantidad conocida de micropartículas (10 mg) se disolvió en 1 mL de una solución de rutina que se cuantificó previamente. A continuación, la solución resultante se midió por HPLC-DAD a 350 nm.

La carga del extracto se define como el proceso de incorporación del extracto en un sistema transportador. En la literatura, se emplean los términos carga de extracto (o contenido de extracto), eficacia de encapsulación y rendimiento de encapsulación, los cuales se definen como [151, 152]:

**Ecuación 6- 2.** Carga en las micropartículas

$$Carga = \frac{Cantidad\ extracto\ encapsulado}{Cantidad\ de\ micropartículas\ obtenidas} \times 100$$

**Ecuación 6- 3.** Eficiencia de encapsulación

$$Eficiencia\ encapsulación = \frac{Carga\ experimental}{Carga\ teórica} \times 100$$

**Ecuación 6- 4.** Rendimiento de encapsulación

$$Rendimiento\ de\ encapsulación = \frac{Extracto\ en\ la\ micropartículas}{Extracto\ empleado\ para\ la\ microencapsulación} \times 100$$

### 6.1.3.3 Tamaño de partícula

El tamaño de las partículas es un parámetro fundamental, ya que puede influir en el perfil de liberación y en otros parámetros. Con la finalidad de determinar esta característica en los sistemas microparticulados se empleó microscopía óptica, realizando cien mediciones de tamaño de partícula por lote.

## 6.2 Resultados y discusión

Con la finalidad de verificar la utilidad de la rutina como marcador analítico para el seguimiento de procesos de microencapsulación que incluya un extracto etanólico de cálices de *P. peruviana*, se llevaron a cabo dos metodologías de microencapsulación, por *spray – drying* y emulsificación – evaporación del solvente, caracterizando el extracto en

las micropartículas en función de la rutina, a través de las metodologías de cuantificación validada previamente.

El *spray-drying* es una técnica ampliamente utilizada, debido a que es económica, flexible, continua, y fácilmente escalable, por lo que es uno de los procesos de microencapsulación más ampliamente utilizado en la industria. En ésta metodología, el material que se desea encapsular se homogeniza con el material polimérico. Dicha mezcla se alimenta en el equipo de *spray – drying* donde es atomizada con una boquilla. El solvente se evapora por acción del aire caliente que entra en contacto con el material atomizado, generando partículas que pueden ser recolectadas al final del proceso. La forma típica de estas partículas es esférica, con un intervalo de tamaño medio de 10 – 100  $\mu\text{m}$  [153]. Como se puede apreciar en la tabla 6-3, el intervalo de tamaños de micropartículas obtenidos para el presente estudio se encuentra cercano al mínimo tamaño esperado para este proceso.

**Tabla 6- 3.** Tamaños de partícula de las micropartículas elaboradas

<b>Micropartículas por el método de emulsificación – evaporación del solvente</b>												
<b>Ensayo</b>	1	2	3	4	5	6	7	8				
<b>dvs (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	7,82	10,85	6,73	7,36	11,79	7,66	6,09	5,41				
<b>Micropartículas por el método de <i>spray – drying</i></b>												
<b>Ensayo</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>dvs (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	11,56	10,02	7,63	11,89	10,95	9,83	7,72	8,47	11,81	9,80	6,38	7,34

Durante el proceso de microencapsulación por *spray – drying* se observó que existen pérdidas significativas de material microparticulado en cada ensayo, dado que se pierde material microparticulado porque se adhiere a las paredes del equipo, es por este motivo, que como observamos en la tabla 6-4, el rendimiento es relativamente bajo. Sin embargo, se encuentra dentro del rango esperado para este tipo de procedimientos a escala laboratorio (< 50%) [107].

**Tabla 6- 4.** Rendimiento de la microencapsulación por el método de *spray - drying*

Ensayo	Peso Extracto (mg)	Peso Polímero (mg)	Peso Micropartículas (mg)	Rendimiento (%)
1	509,1	992,5	439,7	29,28
2	497,5	1582,5	447,6	21,52
3	499,3	999,1	622,6	41,55
4	505,3	1500,2	464,3	23,15
5	507,8	1059,4	434,4	27,72
6	509,8	990,5	495,8	33,05
7	493,2	1496,6	520,2	26,14
8	496,4	1501,5	284,6	14,24
9	503,7	1502,5	727,4	36,26
10	506,6	996,8	484,9	32,25
11	508,6	1039,1	200,7	12,97
12	507,3	1509,1	644,2	31,95

Previo a la caracterización de las micropartículas respecto a su contenido de extracto de cálices de *P. peruviana*, fue necesario determinar la cantidad de rutina presente en el extracto a través de la metodología de cuantificación por HPLC validada previamente, obteniendo una concentración de 0,8397  $\mu\text{g}$  Rutina/mg Extracto, lo que indica que gran parte del extracto se encuentra conformado por este flavonoide. Este hecho también se puede evidenciar en los cromatogramas de perfil del extracto (Figura 5-3). Por lo anterior, se podría concluir que los cálices de *P. peruviana* son una fuente importante de rutina, compuesto que es ampliamente empleado en diferentes industrias.

Para la comparación de diferentes lotes de material microparticulado, se debe considerarla carga de fármaco y la eficiencia de encapsulación. La eficiencia de encapsulación describe la capacidad del método de preparación para incorporar fármaco en el sistema portador. Idealmente, el proceso debe conllevar a una alta carga experimental de extracto respecto a la carga teórica de este, porque en esta medida se mejora la eficiencia de la encapsulación. Tanto la carga del extracto como la eficiencia de encapsulación dependen de las propiedades fisicoquímicas y las interacciones entre el extracto, la matriz polimérica y el medio circundante [151].

Los resultados de carga, eficiencia y rendimiento de encapsulación se presentan en la tabla 6-5.

**Tabla 6- 5.** Carga, rendimiento y eficiencia de encapsulación del extracto de *Physalis peruviana* en la elaboración de micropartículas por el método de *spray – drying*

Ensayo	Carga (%)	Rendimiento encapsulación (%)	Eficiencia encapsulación (%)
1	16,8 ± 0,9	14,5 ± 0,7	50,4 ± 2,7
2	16,4 ± 2,5	14,7 ± 2,3	65,4 ± 10,1
3	28,6 ± 0,4	35,6 ± 0,5	85,7 ± 1,2
4	12,3 ± 0,6	11,3 ± 0,5	49,0 ± 2,3
5	32,6 ± 3,5	27,9 ± 3,0	97,9 ± 10,4
6	36,0 ± 3,5	35,0 ± 3,4	107,9 ± 10,6
7	24,9 ± 0,8	26,3 ± 0,8	99,6 ± 3,0
8	0,8 ± 0,4	0,5 ± 0,3	3,2 ± 1,8
9	22,9 ± 1,6	33,0 ± 2,4	91,5 ± 6,6
10	32,2 ± 2,9	30,8 ± 2,8	96,5 ± 8,7
11	0,3 ± 0,3	0,1 ± 0,1	0,9 ± 0,9
12	18,7 ± 2,9	23,7 ± 3,7	74,7 ± 11,7

Los datos se presentan como la media de las observaciones ± desviación estándar

Por otro lado, se obtuvieron micropartículas a través del proceso de emulsificación – evaporación del solvente. Este es un método sencillo y económico que implica dos etapas principales: la formación de una emulsión estable que contiene al polímero y al extracto en la fase orgánica, y la posterior eliminación del solvente, lo que implica la solidificación del polímero y atrapamiento del extracto. Los tamaños de partícula que se lograron obtener a través de este método se presentan en la tabla 6-3, los cuales no difieren en gran medida a los obtenidos por el método de *spray – drying*, al igual que los rendimientos (tabla 6-5).

**Tabla 6- 6.** Rendimiento de la microencapsulación por el método de emulsificación – evaporación del solvente

Ensayo	Peso Extracto (mg)	Peso Polímero (mg)	Peso Micropartículas (mg)	Rendimiento (%)
1	100,7	200,6	157,7	52,3
2	200,3	205,6	207,1	51,0
3	100,1	201,5	141,4	46,0

4	400,0	400,6	456,3	57,0
5	100,0	202,6	138,9	45,9
6	200,4	206,0	195,2	48,0
7	200,5	199,7	166,1	41,5
8	200,3	395,4	264,1	44,3

Los datos se presentan como la media de las observaciones  $\pm$  desviación estándar

Los resultados de eficiencia y carga por el método de emulsificación – evaporación del solvente se presentan en la tabla 6-7.

**Tabla 6- 7.** Carga, rendimiento y eficiencia de encapsulación del extracto de *Physalis peruviana* en la elaboración de micropartículas por el método de emulsificación – evaporación del solvente

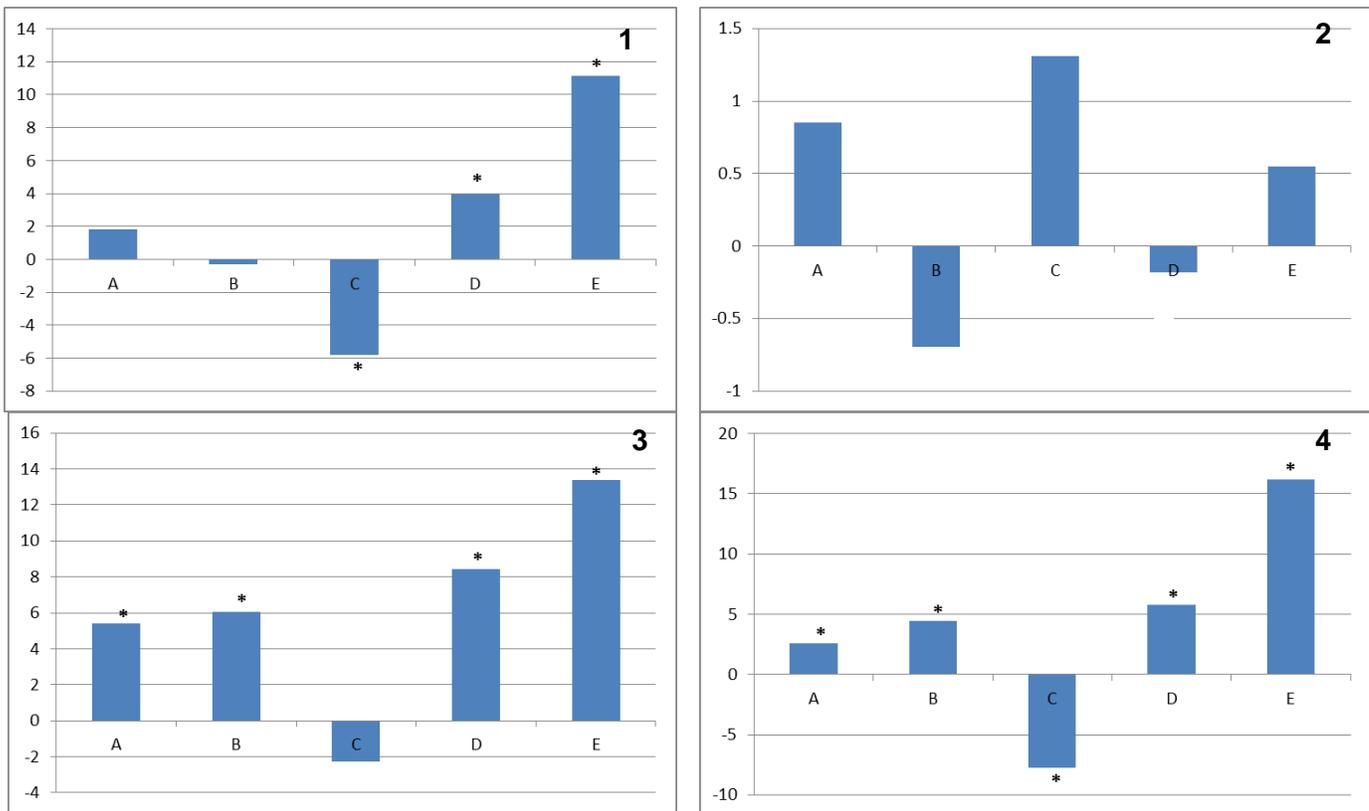
Ensayo	Carga (%)	Rendimiento encapsulación (%)	Eficiencia encapsulación (%)
1	12,3 $\pm$ 0,6	19,3 $\pm$ 0,9	37,0 $\pm$ 1,8
2	8,9 $\pm$ 0,9	9,2 $\pm$ 1,0	17,8 $\pm$ 1,9
3	10,5 $\pm$ 1,0	14,9 $\pm$ 1,4	31,6 $\pm$ 3,0
4	22,0 $\pm$ 1,3	25,1 $\pm$ 1,5	44,0 $\pm$ 2,6
5	17,6 $\pm$ 1,7	24,5 $\pm$ 2,3	52,9 $\pm$ 5,0
6	17,5 $\pm$ 1,3	17,0 $\pm$ 1,3	34,9 $\pm$ 2,6
7	22,3 $\pm$ 0,5	18,5 $\pm$ 0,4	66,8 $\pm$ 1,4
8	20,6 $\pm$ 0,5	27,2 $\pm$ 0,7	41,2 $\pm$ 1,0

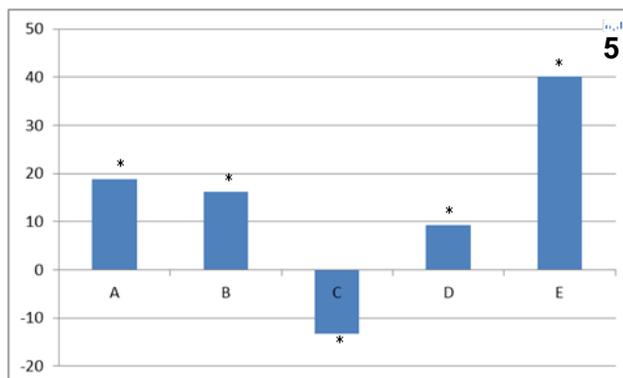
Dado que uno de los objetivos en la preparación de las micropartículas era proporcionar información preliminar acerca de la microencapsulación del extracto de *P. peruviana*, se desarrollaron dos diseños estadísticos experimentales, con la finalidad de observar el comportamiento en la variación de parámetros críticos en cada una de las metodologías. En el caso del método por *spray – drying* se evaluó la temperatura de entrada, velocidad de aspersión, flujo del aspirador, proporción polímero – extracto y el volumen a asperjar. Por su parte, en el método de emulsificación – evaporación del solvente se evaluó la concentración del polímero, concentración de PVA, proporción polímero – extracto, temperatura de agitación, cantidad de fase acuosa, intensidad de agitación y tiempo de agitación. Los resultados de los diseños experimentales se exponen en las figuras 6-3 y 6-4.

Con el fin de identificar algunas variables críticas en el proceso de microencapsulación del extracto de cálices de *P. peruviana* por el método de *spray – drying*, se empleó un

diseño experimental fraccionado con el software estadístico Statgraphics®, el cual permite evaluar el efecto de las variables a dos niveles, mediante la realización de pocos ensayos experimentales. En la figura 6-3 se muestra el efecto de cada variable de elaboración sobre cada una de las variables respuesta.

**Figura 6-3.** Efecto de las variables en estudio sobre 1) Rendimiento de las micropartículas, 2) Tamaño de partícula, 3) Carga del extracto, 4) Rendimiento de encapsulación y 5) Eficiencia de encapsulación





*"t" de Student, \*p < 0,05. A: Temperatura de entrada, B: Velocidad de aspersion, C: Flujo del aspirador, D: Proporción Polímero – Extracto, E: Volumen a asperjar*

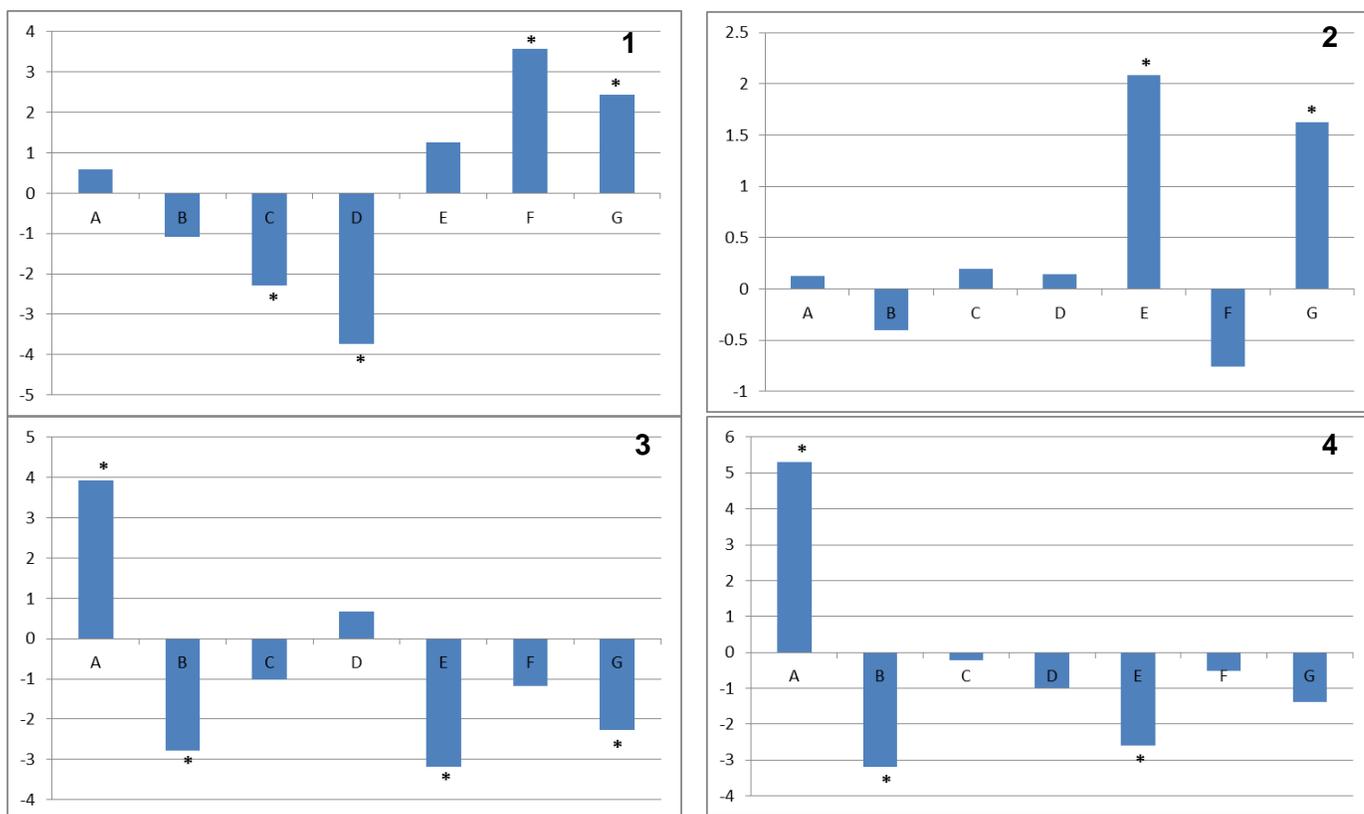
Los asteriscos ubicados en cada una de las gráficas revelan el efecto significativo que cada variable ejerce sobre un parámetro evaluado, modificándolo. Por otro lado, las barras con valores positivos sugieren que la presencia de dicha variable en el nivel superior, de los dos evaluados, aumentan la magnitud de la respuesta evaluada y los valores negativos, que dichas variables en el nivel mayor disminuyen la magnitud de la respuesta evaluada.

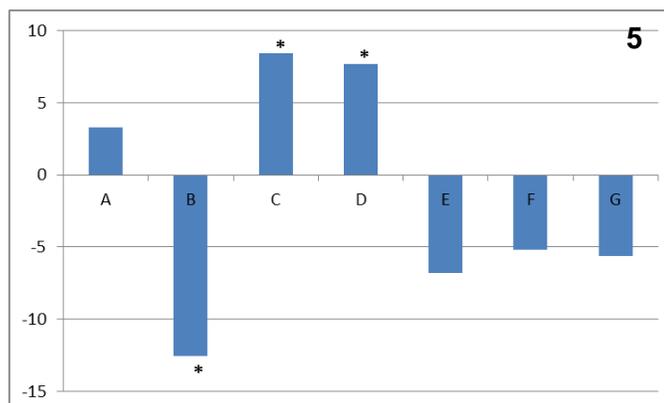
Se observa que el rendimiento de las micropartículas es afectado significativamente por las variables C, D y E, la primera variable afectando negativamente y las dos últimas de manera positiva. En cuanto al tamaño de las micropartículas, ninguna de las variables lo afecta significativamente. Por otra parte, la carga del extracto en las micropartículas es afectada significativamente por las variables A, B, D y E, en su nivel superior, de manera positiva. Para el rendimiento y eficiencia de encapsulación, las variables A, B, D y E, presentan un efecto positivo, por su parte la variable C tiene un efecto negativo.

De acuerdo con los resultados se seleccionaron las condiciones experimentales que producen un aumento del rendimiento de las micropartículas y de encapsulación, la carga, y la eficiencia de encapsulación. Estas variables son: Temperatura de entrada a 60°C, velocidad de aspersion 15 mL/min, flujo del aspirador 80 rpm, proporción Polímero – Extracto 2:1 y volumen a asperjar 50 mL.

Por otro lado, con el fin de identificar algunas variables críticas en el proceso de microencapsulación del extracto de cálices de *P. peruviana* por el método de emulsificación – evaporación del solvente, se empleó un diseño experimental de tipo Plakett-Burman, el cual permite evaluar el efecto de las variables a dos niveles, mediante la realización de pocos ensayos experimentales (n+1). En la figura 6-4 se muestra el efecto de cada variable de elaboración sobre cada una de las variables respuesta.

**Figura 6- 4.** Efecto de las variables en estudio sobre 1) Rendimiento de las micropartículas, 2) Tamaño de partícula, 3) Carga del extracto, 4) Rendimiento de encapsulación y 5) Eficiencia de encapsulación





"t" de Student, \* $p < 0,05$ . A: Concentración del polímero, B: Concentración del PVA, C: Proporción polímero - Extracto, D: Temperatura de agitación, E: Cantidad de fase acuosa, F: Intensidad de agitación, G: Tiempo de agitación

Los asteriscos ubicados en cada una de las gráficas revelan el efecto significativo que cada variable ejerce sobre un parámetro evaluado, modificándolo. Por otro lado, las barras con valores positivos sugieren que la presencia de dicha variable en el nivel superior, de los dos evaluados, aumentan la magnitud de la respuesta evaluada y los valores negativos, que dichas variables en el nivel mayor disminuyen la magnitud de la respuesta evaluada.

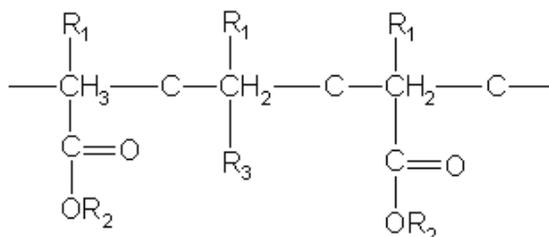
Se observa que la variable A (concentración del polímero) afecta significativamente la carga del extracto y el rendimiento de encapsulación, la primera variable afectada positivamente y la segunda de manera negativa. En cuanto a la variable B (concentración de PVA) en su nivel superior mostró un efecto negativo sobre la carga del extracto, el rendimiento de encapsulación y la eficiencia de encapsulación. Por otra parte, la variable C (proporción polímero - extracto), en su nivel superior presentó efecto significativo sobre la eficiencia de encapsulación (positivamente) y el rendimiento de las micropartículas (negativamente). Para la variable D, es decir la temperatura de agitación, se observa que en su nivel superior tiene un efecto negativo sobre el rendimiento de las micropartículas y un efecto positivo en la eficiencia de encapsulación. En la variable E (cantidad de fase acuosa), se observa que en su nivel superior tiene un efecto negativo sobre la carga del extracto y el rendimiento de encapsulación. La intensidad de agitación (F), solamente mostró un efecto significativo y deseable sobre el rendimiento de las micropartículas, sobre las demás respuestas mostro un efecto no deseado pero no significativo.

Finalmente, el tiempo de agitación (variable G) mostró un efecto significativo sobre el tamaño de partícula y la respuesta de rendimiento de las micropartículas, además de un efecto negativo sobre la carga del extracto.

De acuerdo con los resultados se seleccionaron las condiciones experimentales que producen un aumento del rendimiento de las micropartículas y de encapsulación, la carga, y la eficiencia de encapsulación, así como una disminución del tamaño de partícula. Estas variables son: Eudragit® RS 100 al 4%, PVA al 2%, proporción polímero – extracto 2:1, temperatura de agitación 35°C, 100 mL de fase acuosa, una intensidad de agitación de 11000 rpm y un tiempo de agitación de 2 minutos.

Según reportes de la literatura, los compuestos fenólicos pueden interactuar por puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas con los materiales poliméricos empleados para formar las micropartículas [102]. Los polímeros EUDRAGIT® son copolímeros derivados de ésteres de ácido acrílico y metacrílico cuyas propiedades fisicoquímicas son determinadas por sus grupos funcionales. Como se observa en la figura 6-5, el Eudragit es un polímero con grupos disponibles para formar puentes de hidrógeno, por lo que es de esperarse que los compuestos fenólicos, como la rutina, presentes en el extracto de cálices de *P. peruviana* interactúen con el polímero durante el proceso de microencapsulación y de esta manera poder formar la micropartícula. Con lo anterior, es posible prevenir la oxidación/degradación en el tracto gastrointestinal de los compuestos fenólicos encapsulados, teniendo en cuenta además que el Eudragit® E PO sólo permiten una liberación de los compuestos en forma dependiente del pH, por lo que ofrece resistencia gástrica para liberación controlada de los compuestos en todas las porciones del intestino; por su parte, el Eudragit® RS es insoluble a valores de pH fisiológicos, por lo que ha sido empleado como polímero para la preparación de formas farmacéuticas de liberación sostenida independiente del pH [154].

**Figura 6- 5.** Estructura del Eudragit® E PO y el Eudragit® RS 100



- $\text{R}_1$ : CH<sub>3</sub>, H  
 $\text{R}_2$ : CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>  
 $\text{R}_3$ : COOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (Eudragit® E PO)  
       COOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> Cl<sup>-</sup> (Eudragit® RS 100)

Harris *et al.* (2011), reportó que el contenido total de polifenoles en microesferas de hidrocloreto de quitosano después de 3 meses de almacenamiento se mantuvo estable, además la microencapsulación no afecta la actividad antioxidante de estos [10], siendo ésta metodología adecuada para la protección de polifenoles al ambiente. Por su parte, es importante señalar que, Kosaraju *et al.* (2006) observó que la encapsulación de extracto de hoja de olivo por el proceso de *spray-drying* no genera inactivación de compuestos polifenólicos [86], por lo que el desarrollo de esta técnica no implica una pérdida de este tipo de compuestos.

Kosaraju *et al.* (2006) reportó que el porcentaje de carga de compuestos polifenólicos a partir de hoja de olivo fue de 27% por *spray - drying* [86]. Por otro lado, Calvo *et. al* (2010), reporta eficiencias alrededor de 53% al emplear gelatina, goma árabiga o maltodextrinas, durante la microencapsulación de un aceite de oliva virgen extra [155]. De igual manera, Georgetti *et al.* (2008), reportó una eficiencia de encapsulación de 85% de fenoles de semillas de uva, mejorando la estabilidad de estos [156]. Por lo anterior, se observa que no se tiene un rango estrecho de eficiencia de encapsulación para procesos de microencapsulación por *spray - drying*, así como se observó en los resultados de eficiencia para el extracto de cálices de *P. peruviana*, los cuales varían entre 0,9 a 99,6%.

La eficiencia de encapsulación resultante de la microencapsulación por el método de emulsificación – evaporación del solvente no es muy alto, dado que durante el proceso de formación de las partículas tiene lugar un fenómeno de migración de los componentes activos de la fase interna a la fase externa de la emulsión, el cual se facilita a menores tamaños de partícula, promoviendo la salida de compuestos activos de las gotículas aún en fase de endurecimiento, lo que conduce a la disminución del porcentaje de extracto encapsulado afectando así la eficiencia de encapsulación [157]. Por otro lado, la concentración del emulsificante influye en la eficiencia de encapsulación. Según reportes para microencapsulación de aceite de lavanda, a mayor concentración de emulsificantes mayor es la eficiencia de encapsulación dado que estos contribuye a la estabilización de la emulsión [158]. Sin embargo, para este caso la concentración del alcohol polivinílico no debe ser muy alta, ya que éste material aumenta la viscosidad del sistema lo que dificulta la formación de las gotículas.

El tamaño de partícula es un parámetro importante ya que este y el área superficial de las partículas están relacionados con propiedades físico – químicas de los sistemas de administración. Los tamaños de partícula medios para micropartículas a partir de materiales vegetales es de aproximadamente 350  $\mu\text{m}$ . El método de preparación influye en el tamaño de las partículas. Es así como, las técnicas de gelificación iónica y extrusión iónicas producen tamaños de partícula entre 1000  $\mu\text{m}$  a 2500  $\mu\text{m}$ , los cuales contrastan con tamaños de aproximadamente 200  $\mu\text{m}$  obtenidos cuando las partículas se preparan por coacervación, emulsificación – evaporación del solvente o *spray - drying*. Por otro lado, se conoce que existen factores adicionales que influyen en el tamaño de las partículas, tales como la cantidad y naturaleza del solvente orgánico, tiempos de agitación, intensidad de agitación e incluso las temperaturas de procesamiento [85]. Es por ello, que según las variables moduladas en cada técnica se pueden variar los tamaños de partícula.

Dado que el presente estudio se realizó con la finalidad de verificar la utilidad de la rutina como marcador analítico para el seguimiento de procesos de microencapsulación que incluyan el extracto de cálices de *P. peruviana*, la caracterización de las micropartículas

se centró en el estudio de parámetros relacionados a la cantidad de extracto en las micropartículas. Sin embargo, es importante recomendar que para estudios futuros se profundice en la caracterización de las micropartículas y se busqué el procedimiento que genere las micropartículas con mejores características, según sea su uso final.

## 7. Conclusiones y recomendaciones

### 7.1 Conclusiones

A partir de los resultados presentados es posible concluir:

1. Se demostró la actividad antioxidante en el extracto crudo y fracciones obtenidas de los cálices de *Physalis peruviana*, en modelos con radicales sintéticos como, DPPH, ABTS, ORAC y FRAP, así como en modelos con radicales libres de relevancia biológica tales como los radicales superóxido y óxido nítrico.
2. Se demostró la actividad antiinflamatoria tópica en el extracto total y en fracciones obtenidas de los cálices de *P. peruviana*.
3. Se aislaron e identificaron dos flavonoides glicosidados, la nicotoflorina y la rutina, este último con una concentración en el extracto crudo de 0,8397 µg Rutina/mg Extracto.
4. Se demostró la actividad antioxidante y antiinflamatoria de la nicotoflorina y la rutina, esta última siendo probablemente un marcador activo del extracto etanólico de cálices de *P. peruviana*.
5. Se seleccionó la rutina como marcador analítico del extracto etanólico de los cálices de *P. peruviana* ya que presenta una importante actividad biológica y se encuentra en una elevada concentración en el extracto.
6. Se implementaron y validaron tres métodos analíticos por HPLC para la cuantificación de rutina en extracto de *P. peruviana*, y para caracterización de micropartículas elaboradas con Eudragit® E PO y Eudragit® RS 100, cargadas con rutina, mediante detección UV a 350 nm en una columna C – 18 en fase reversa.

7. Se obtuvo información preliminar que contribuye al desarrollo de micropartículas a partir de un extracto crudo con actividad antioxidante de cálices de *P. peruviana*.

## 7.2 Recomendaciones

1. Determinar el IC<sub>50</sub> y la DE<sub>50</sub> para la actividad antioxidante y anti-inflamatoria, respectivamente, del extracto crudo de cálices de *Physalis peruviana*.
2. Ampliar el estudio enfocado a la microencapsulación de extracto crudo con actividad antioxidante de cálices de *P. peruviana*.
3. Evaluar la estabilidad del extracto de *P. peruviana* y comparar con micropartículas cargadas con el extracto.
4. Estudiar la permeabilidad del extracto de *P. peruviana* respecto a la rutina y comparar con micropartículas cargadas con el extracto.

## Anexo A: Metodologías de actividad antioxidante *in vitro*

### FRAP (Ferric Reducing/Antioxidant Power):

Para el desarrollo del ensayo se prepararon las siguientes soluciones:

- Solución A: Buffer Acetato a pH a 3.6
- Solución B: HCl 1% en Metanol
- Solución C:HCl 40mM
- Solución D: TPTZ (2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine) en HCl 40mM
- Solución E: FeCl<sub>3</sub> 20mM
- Solución de trabajo: Mezclar 25 mL de Buffer acetato (pH 3.6), 2.5mL de solución TPTZ y 2.5 mL de solución FeCl<sub>3</sub>.
- Curva de calibración: Solución de trolox en concentraciones de 10 a 300 ug/mL

Preparación de la muestra:

Pesar 100±2 mg de muestra
Mezclar con 2 mL de solución B
Homogenizar en agitador (en condiciones de oscuridad durante toda la noche)
Centrifugar a 13000 rpm por 15 min

Lectura:

Incubar la solución de trabajo a 37°C
Tomar 29 µL de la solución de trabajo
Adicionar 50 µL de la muestra o el estándar
Hacer mediciones cada minuto durante 30 min a 593 nm

Los resultados son expresados en µmol Trolox/g muestra.

## ABTS (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico):

Para el desarrollo del ensayo se prepararon las siguientes soluciones:

- Solución A: HCl 1% en metanol
- Solución B: ABTS 7 mM
- Solución Persulfato de potasio 2.45 mM
- Solución C: FeCl<sub>3</sub> 20 mM
- Solución de trabajo ABTS: Se mezclan en volúmenes iguales la solución de ABTS y persulfato de potasio, se deja estabilizando la reacción toda la noche (16 h aproximadamente) a 4°C en oscuridad. Ajustar la absorbancia de la solución a 0,7 antes de su uso.
- Curva de calibración de Trolox 5 a 100 µg/mL

Preparación de la muestra:

Pesar 100 ± 2 mg de muestra
Mezclar con 2 mL de solución A
Homogenizar en agitador (en condiciones de oscuridad durante toda la noche)
Centrifugar a 13000 rpm por 15 min

Lectura:

Tomar 290 µL de la solución de trabajo ABTS
Adicionar 50 µL de la muestra o el estándar
Hacer mediciones cada minuto durante 1 h a 734 nm

Los resultados son expresados en µmol Trolox/g muestra.

## DPPH (radical 2,2difeníl-1-picrilhidrazil):

Para el desarrollo del ensayo se prepararon las siguientes soluciones:

- Solución A: HCl 1% en metanol
- Solución B: DPPH 20 mg/L
- Curva de calibración de Trolox 10 a 100  $\mu\text{g/mL}$

Preparación de la muestra:

Pesar $100 \pm 2$ mg de muestra
Mezclar con 2 mL de solución A
Homogenizar en agitador (en condiciones de oscuridad durante toda la noche)
Centrifugar a 13000 rpm por 15 min

Lectura:

Tomar 280 $\mu\text{L}$ de la solución de trabajo DPPH
Adicionar 50 $\mu\text{L}$ de la muestra o el estándar
Hacer mediciones cada minuto durante 1 h a 515 nm

Los resultados son expresados en  $\mu\text{mol Trolox/g}$  muestra.

## ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity):

Para el desarrollo del ensayo se prepararon las siguientes soluciones:

- Solución A: HCl 1% en metanol
- Solución B: Buffer fosfato Salino (PBS) 7.5 mM pH 7.4
- Solución C: Solución de Fluoresceína 55nM
- Solución D: AAPH 153 nM

- Curva de calibración de Trolox 5 a 40  $\mu\text{M}$

Preparación de la muestra:

Pesar 10-20 mg de muestra
Mezclar con 35 mL de solución A
Homogenizar en agitador (en condiciones de oscuridad durante toda la noche)
Centrifugar a 4000 rpm por 15 min

Lectura:

Tomar 250 $\mu\text{L}$ de la solución C
Adicionar 25 $\mu\text{L}$ de la muestra o el estándar
Incubar por 30 min a 37°C
Adicionar 25 $\mu\text{L}$ de solución D
Hacer mediciones cada minuto durante 1 h a una longitud de onda de excitación 485 nm y emisión 520 nm

Los resultados son expresados en  $\mu\text{mol}$  Trolox/g muestra.

## Captación del anión superóxido generado por el sistema Hipoxantina/Xantina Oxidasa:

Protocolo para determinar la actividad captadora del radical superóxido en el sistema xantina/xantina oxidasa

Reactivos	Concentración Final	Blanco Control ( $\mu\text{L}$ )	Control ( $\mu\text{L}$ )	Blanco Patrón ( $\mu\text{L}$ )	Patrón ( $\mu\text{L}$ )	Blanco Muestra ( $\mu\text{L}$ )	Muestra ( $\mu\text{L}$ )
n-propilgalato	100 $\mu\text{M}$	-----	-----	10	10	-----	-----
Muestra	10 mg/MI	-----	-----	-----	-----	10	10
Vehículo	-----	10	10	-----	-----	-----	-----
EDTA•Na <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	1 Mm	100	100	100	100	100	100
Hipoxantina	100 $\mu\text{M}$	10	10	10	10	10	10
NBT	100 $\mu\text{M}$	100	100	100	100	100	100
Buffer fosfato	-----	800	700	800	700	800	700
Mezclar con agitación suave							
Xantina Oxidasa	0.066 U/mL	-----	100	-----	100	-----	100
Medir absorbancia cada 20 segundos durante 2 min a 560 nm							

Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición de la reducción del NBT.

Ecuación: Porcentaje de inhibición de la reducción del NBT.

$$\%Inhibición = \frac{[(\Delta A)_C - (\Delta A)_{B_C}] - [(\Delta A)_M - (\Delta A)_{B_M}]}{[(\Delta A)_C - (\Delta A)_{B_C}]} \times 100$$

$\Delta A$ : Variación de la absorbancia en el tiempo

$B_C$ : Blanco del control

C: control

$B_M$ : Blanco de la muestra

M: Muestra

## Medida de la captación de óxido nítrico (NO•):

Para el desarrollo del ensayo se prepararon las siguientes soluciones:

- Solución A: Buffer fosfato Salino (PBS) 7.5 mM pH 7.4
- Solución B: Nitroprusiato de sodio (NaNP) 5 mM en tampón PBS
- Solución C: Reactivo de Griess recién preparado
- Curva de calibración de  $\text{NaNO}_2$  con valores de 200, 100, 50, 25, 10, 5 y 2.5  $\mu\text{M}$  en PBS

Preparación de la muestra:

Pesar $10 \pm 2$ mg de muestra
Mezclar con 1 mL de EtOH
Incubar durante 120 minutos a $25^\circ\text{C}$ , 1 mL Solución B y 10 $\mu\text{L}$ de la muestra en EtOH

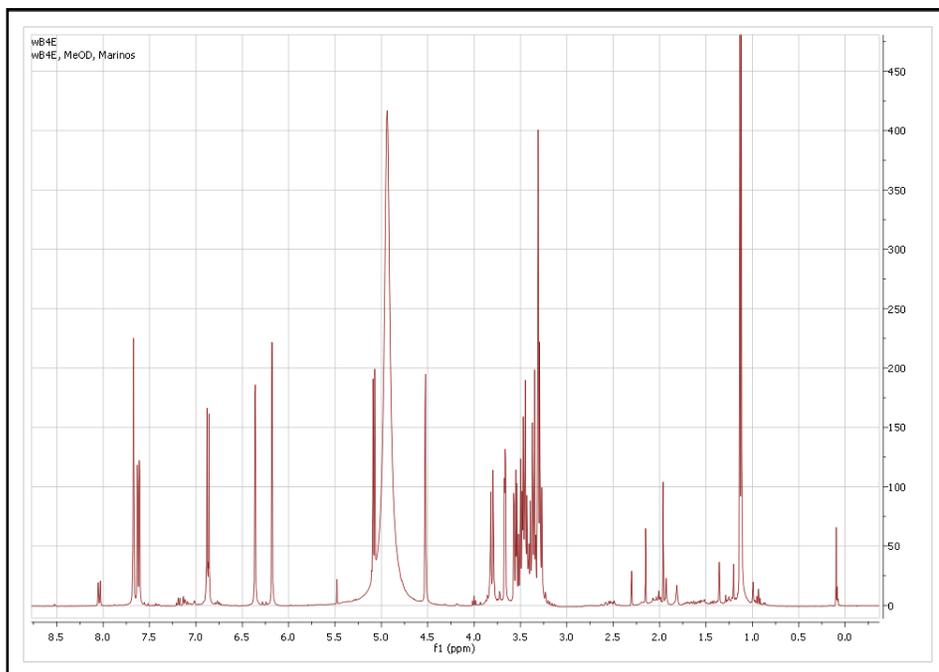
Lectura:

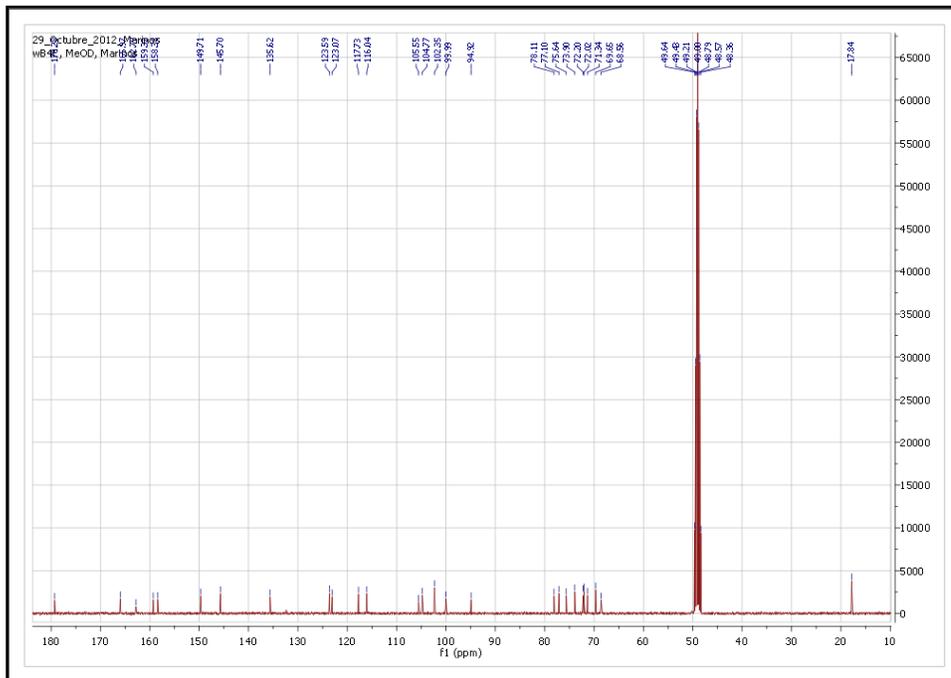
Tomar 100 $\mu$ L de la muestra
Adicionar 100 $\mu$ L del reactivo de Griess
Agitar durante 5 min
Medir la absorbancia a 550 nm

Se debe incluir un blanco de PBS, un control de máxima liberación de NO consistente de 1 mL de NaNP y un control del vehículo utilizado para disolver las muestras, en este caso etanol.

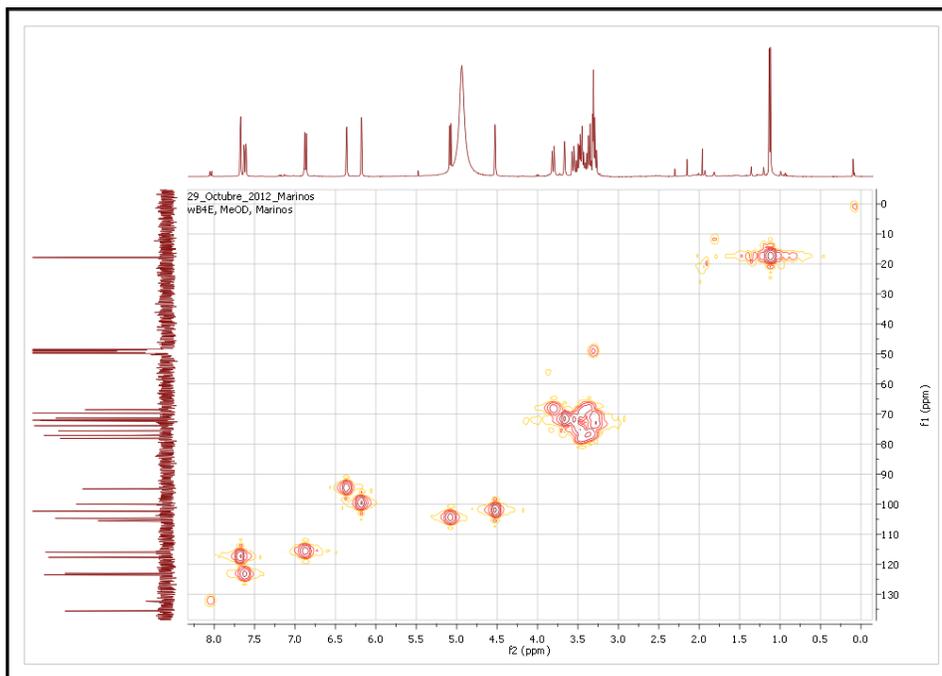
## Anexo B: Espectros obtenidos para el compuesto PP0503 (Rutina).

Espectro de RMN- $H^1$  en MeOD del compuesto PP0503

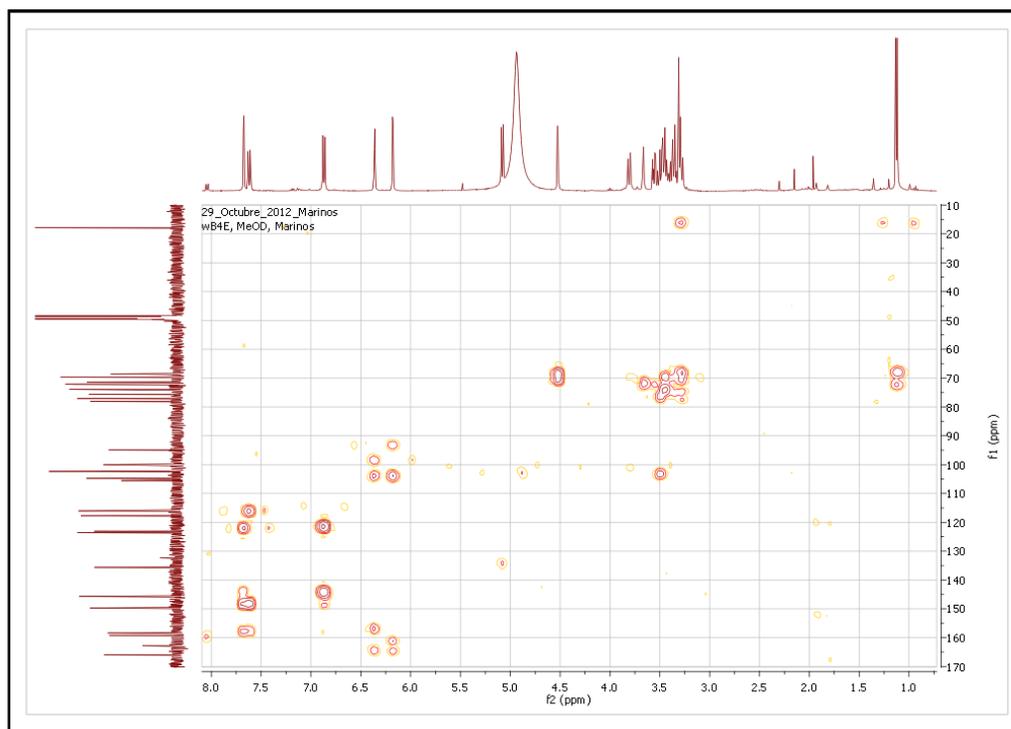


Espectro de RMN-C<sup>13</sup> en MeOD del compuesto PP0503

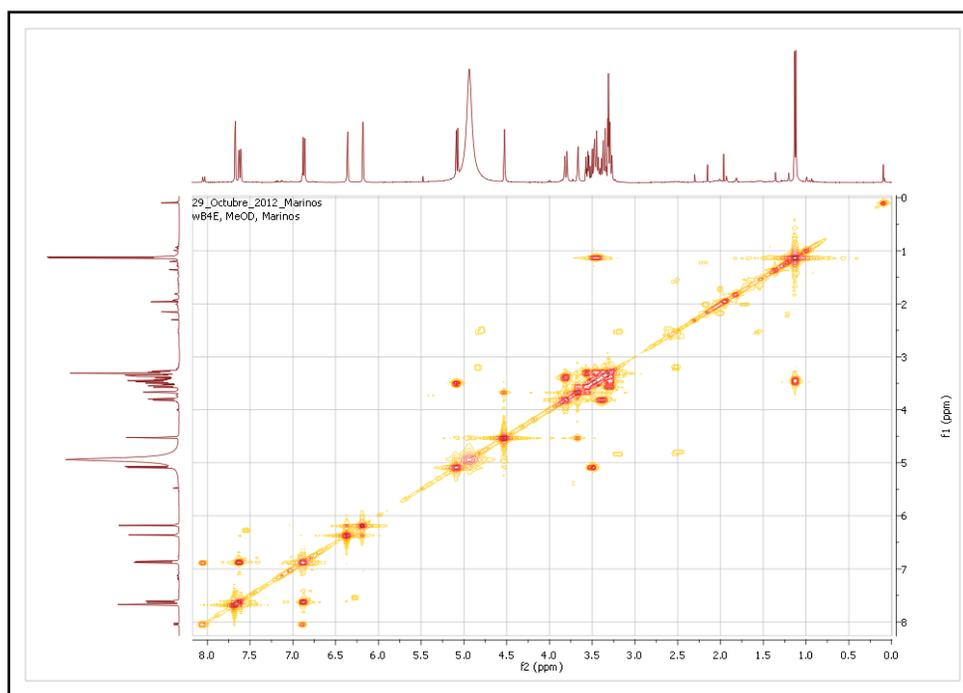
Espectro de 2D-HMQC en MeOD del compuesto PP0503



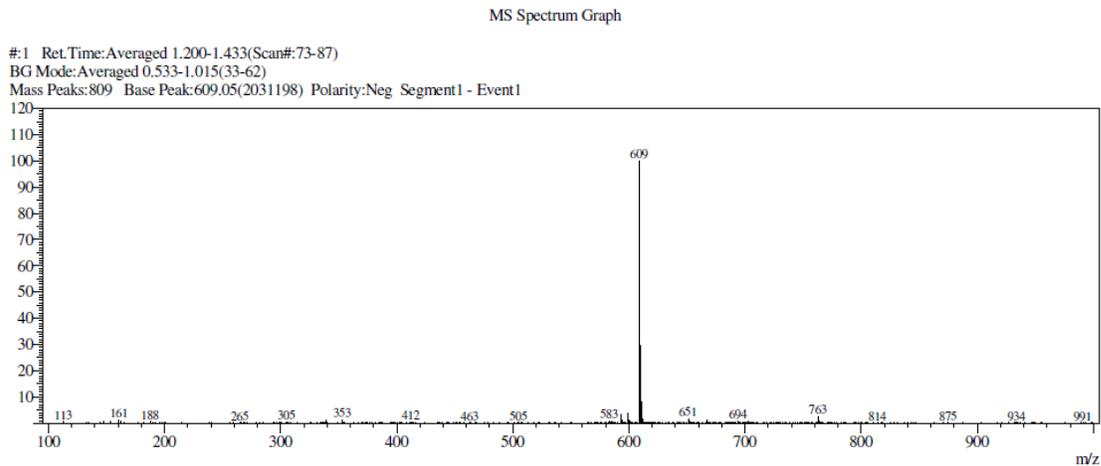
Espectro de 2D-HMBC en MeOD del compuesto PP0503



Espectro de 2D-COSY en MeOD del compuesto PP0503

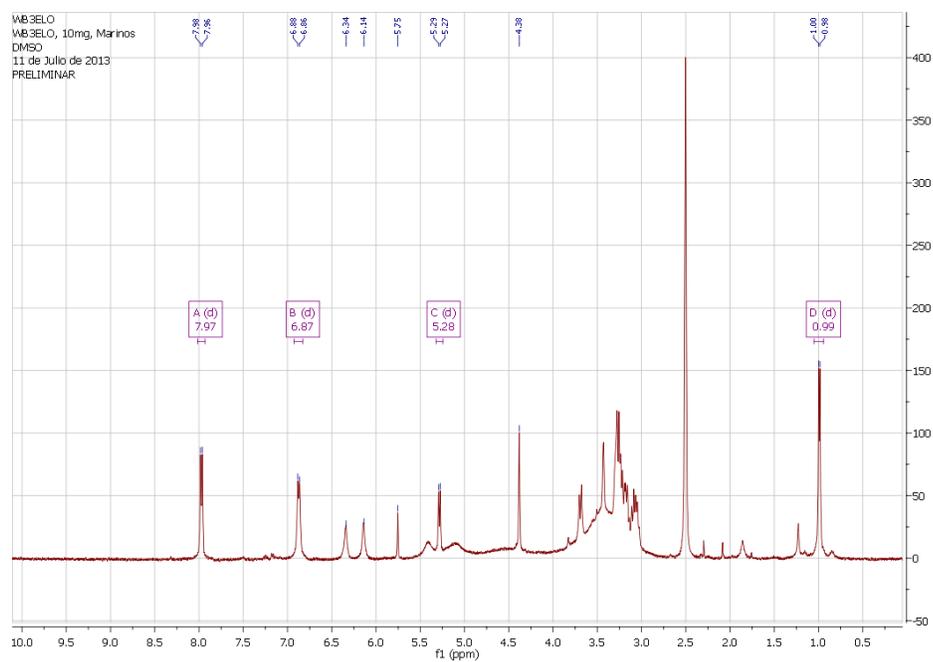


## Espectro de masas en modo negativo del compuesto PP0503



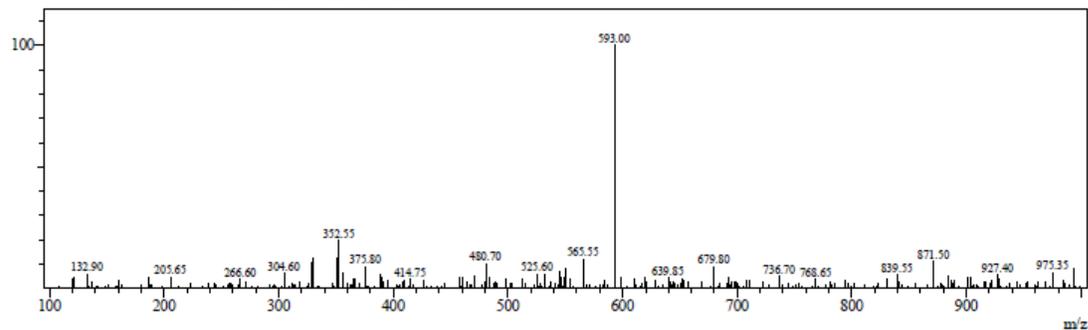
## Anexo C: Espectros obtenidos para el compuesto PP0405 (Nicotoflorina).

Espectro de RMN- $H^1$  en MeOD del compuesto PP0405



## Espectro de masas en modo negativo del compuesto PP0405

#3 Ret. Time: Single 9.350 (Scan#: 562)  
BG Mode: Averaged 8.883-9.275 (534-557)  
Mass Peaks: 330 Base Peak: 593.00 (48364) Polarity: Neg Segment1 - Event1



## 8. Bibliografía

1. Cedeño, M.M., Montenegro, D.M., *Plan exportador, logístico y de comercialización de uchuva al mercado de Estados Unidos para Frutexpo S.C.I. Ltda.* 2004, Pontificia Universidad Javeriana: Bogotá. p. 133.
2. Zapata, J.L., Saldarriaga, A., Londoño, M., Díaz, C., *Manejo del cultivo de la uchuva en Colombia*, in *Boletín técnico de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria*. 2002, CORPOICA: Rionegro.
3. Wu, S.J., Ng, L.T., S.N., Lin, D.L., Wang, S.S., Huang, S.N., *Antioxidant activities of Physalis peruviana*. *Biol Pharm Bull*, 2005. **28**(6): p. 963-6.
4. Wu, S.J., Tsai, J.Y., Chang, S.P., Ng, L.T., Huang, Y.M., Lin, D.L., Wang, S.S., Huang, S.N., Lin, C.C., *Supercritical carbon dioxide extract exhibits enhanced antioxidant and anti-inflammatory activities of Physalis peruviana*. *J Ethnopharmacol*, 2006. **108**(3): p. 407-13.
5. Fischer, G., Ebert, G., Lüdders, P., *Provitamin A carotenoids, organic acids and ascorbic acid content of cape gooseberry (Physalis peruviana L.) ecotypes grown at two tropical altitudes*. *Acta Horticulturae*, 2000. **531**: p. 263 - 267.
6. Hassanien, M.F.R., Moersel, J.T., *Das physalisbeerenoel: Eine neuentdeckte quelle an essentiellen fettsaeuren, phytosterolen und antioxidativen vitaminen*. *Fluessiges Obst.*, 2003. **7**: p. 398 - 402.
7. Bulkley, G.B., *The role of oxygen free radicals in human disease processes*. *Surgery*, 1983. **94**(3): p. 433 - 438.
8. Cheng, H.Y., Lin, T.C., Yu, K.H., Yang, C.M., Lin, C.C., *Antioxidant and free radical scavenging activities of Terminalia chebula*. *Biol Pharm Bull*, 2003. **26**: p. 1331 - 1335.
9. Dormandy, T.L., *An approach to free radicals*. *Lancet*, 1983. **11**: p. 1010 - 1014.
10. Harris, R., Lecumberri, E., Mateos-Aparicio, I., Mengíbar, M., Heras, A., *Chitosan nanoparticles and microspheres for the encapsulation of natural antioxidants extracted from Ilex paraguariensis*. *Carbohydrate Polymers*, 2011. **84**: p. 803 - 806.
11. Escobar, H.C., Upegui, P.A., *Determinación de la madurez fisiológica de semillas de uvilla (Physalis peruviana L.)*. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 2005. **12**.

12. Mahecha, J.C., *Determinación de los parámetros para la simulación matemática del proceso de deshidratación de la uchuva (Physalis peruviana L.)*. 2011, Universidad Nacional de Colombia: Bogotá. p. 150.
13. Center, N.P.D. *Plants profile. Physalis peruviana L.* 2000 [cited 2012 06/05/2012]; <http://www.nrcs.usda.gov>.
14. Gamboa, J., *Ensayo clínico patogenésico sobre los cálices de Physalis peruviana L.* 2010, Universidad Nacional de Colombia: Bogotá. p. 118.
15. Fischer, G., *Aspectos fisiológicos del desarrollo de la uchuva Physalis peruviana L.*, in *IV Seminario Nacional Recursos Vegetales Promisorios*. 1989: Tunja. p. 9 - 19.
16. Tapia, M., Fries, A., *Guía de campo de los cultivos andinos*. 2007, FAO, ANPE: Lima.
17. Corporación Colombia Internacional (CCI), U.d.I.A., Departamento de Planeación Nacional, *Análisis internacional del sector hortofrutícola para Colombia*, in *El Diseño*. 1994: Bogotá.
18. Perry, L., *Medicinal plants of East and Southeast Asia: attributed properties and uses*. 1980, Cambridge, Massachusetts, London: The MIT Press.
19. Kishore, K.K., Sasidharan, N., *A case study from the shola forests of Kerala, India*, in *Recent Progress in Medicinal Plants*, J.N. Govil, Singh, V.K., Editor. 2002, Sci Tech Publishing lic: Texas. p. 201 - 214.
20. Rodríguez, S., Rodríguez, E., *Efecto de la ingesta de Physalis peruviana (aguaymanto) sobre la glicemia postprandial en adultos jóvenes*. *Revista Médica Vallejana*, 2007. **4**(1): p. 43 - 52.
21. Ospina, L.F., Pinzon, R., *Plantas usadas como antidiabéticas en la medicina popular colombiana*. *Rev. Col. Cienc. Quím. Farm.*, 1995. **23**: p. 81 - 94.
22. Bernal, H.Y., Correa, J.E., *Physalis peruviana*, in *Especies vegetales promisorias de los países del convenio Andrés Bello*, T.e. Guadalupe, Editor. 1998: Bogotá. p. 441 - 463.
23. García, M.C., Lozano, A., *Contribución al Estudio Fitoquímico Farmacológico de los Cálices de Physalis peruviana L.* 2002, Universidad Nacional de Colombia: Bogotá. p. 5 - 13.
24. Arun, M., Asha, V. V., *Preliminary studies on antihepatotoxic effect of Physalis peruviana Linn. (Solanaceae) against carbon tetrachloride induced acute liver injury in rats*. *J Ethnopharmacol*, 2007. **111**(1): p. 110-4.

25. Toro, R.M., Aragón, D.M., Ospina, L.F., *Hepatoprotective effect of calyces extract of Physalis peruviana on hepatotoxicity induced by CCl4 in Wistar rats*. VITAE, 2013. **20**(2): p. 125 - 132.
26. Garcia, A.T., Sua, S., *Evaluación de algunas fracciones obtenidas de frutos de Physalis peruviana L.* 1999, Universidad Nacional de Colombia: Bogotá. p. 11 - 13.
27. Franco, L.A., Matiz, G.E., Calle, J., Pinzon, R., Ospina, L.F., *Actividad antiinflamatoria de extractos y fracciones obtenidas de cálices de Physalis peruviana L.* Biomedica, 2007. **27**: p. 110 - 115.
28. Pardo, J.M., *Determinación de la actividad farmacológica de los frutos de la Physalis peruviana L.* 2005, Universidad Nacional de Colombia: Bogotá. p. 12 - 16.
29. Wu, S.J., Ng, L.T., S.N., Chen, C.H., Lin, D.L., Lin, C.C., *Antihepatoma activity of Physalis angulata and P. peruviana extracts and their effects on apoptosis in human Hep G2 cells*. Life Sci, 2004. **74**(16): p. 2061-73.
30. Muñoz, C.E., Vergel, N.E., Aragon, D.M., Ospina, L.F., *Efecto antinociceptivo de Critonella acuminata, Physalis peruviana y Salvia rubescens*. Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm., 2009. **38**(1): p. 31 - 41.
31. Zavala, D., Quispe, A., Posso, M., Rojas, J., Vaisberg, A., *Efecto citotóxico de Physalis peruviana (capulí) en cáncer de colon y leucemia mieloide crónica*. Anales de la Facultad de Medicina, 2006. **67**(4): p. 283 - 289.
32. Mora, A.C., Aragon, D.M., Ospina, L.F., *Effects of Physalis peruviana Fruit Extract on Stress Oxidative Parameters In Streptozotocin-Diabetic Rats*. Latin American Journal of Pharmacy, 2010. **29**(7): p. 1132 - 1136.
33. Dinan, L.N., Sarker, S.D., Sik, V., *28-Hydrowithanolide E from Physalis peruviana*. Phytochemistry, 1997. **44**(3): p. 509 - 512.
34. Lan, Y.H., Chang, F. R., Pan, M.J., Wu, C.C., Wu, S.J., Chen, S.L., Wang, S.S., Wu, M.J., Wu, Y.G., *New cytotoxic withanolides from Physalis peruviana*. Food Chemistry, 2009. **116**: p. 462 - 469.
35. Fang, S.T., Liu, J.K., Li, B., *Ten new withanolides from Physalis peruviana*. Steroids, 2012. **77**: p. 36 - 44.
36. Franco, L.A., *Estudio de la actividad antiinflamatoria de los principios activos de los cálices de Physalis peruviana*. 2006, Universidad Nacional de Colombia: Bogotá. p. 256.

37. Breithaupt, D.E., Bamedi, A., *Carotenoid esters in vegetables and fruits: A screening with emphasis on  $\beta$ -cryptoxanthin esters*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001. **49**: p. 2064 - 2070.
38. De Rosso, V.V., Mercadante, A.Z., *Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007. **55**: p. 5062 - 5072.
39. Tulukey, E., *Determination of yield and yield components of gooseberry (Physalis peruviana) grown in dry conditions*. International Journal of Agronomy and Agricultural Research, 2012. **2**(2): p. 22 - 29.
40. Basey, K., McGaw, B., Wolley, J., *Phygrine an alkaloid from Physalis species*. Phytochemistry, 1992. **31**(12): p. 4173 - 4176.
41. Kubwabo, C., Rollmann, B., *Analysis of alkaloids from Physalis peruviana by capillary GC, capillary GC-MS, and GC-FTIR*. Planta Médica, 1993. **59**(2): p. 161 - 163.
42. Wu, S.J., Ng, L.T., Lin, D.L., Huang, S.N., Wang, S.S., Lin, C.C., *Physalis peruviana extract induces apoptosis in human Hep G2 cells through CD95/CD95L system and the mitochondrial signaling transduction pathway*. Cancer Letters, 2004. **215**: p. 199 - 208.
43. Ismail, N., Alam, N., *A Novel Citotoxic Flavonoid Glycoside From Physalis angulata*. Fitoterapia, 2001. **72**: p. 676 - 679.
44. Wu, S.J., Chang, S.P., Lin, D.L., Wang, S.S., Hou, F.F., Ng, L.T., *Supercritical carbon dioxide extract of Physalis peruviana induced cell cycle arrest and apoptosis in human lung cancer H661 cells*. Food Chem. Toxicol., 2009. **47**(6): p. 1132.
45. Fang, S.T., Liu, J.K., Li, B., *A novel 1,10-seco withanolide from Physalis peruviana*. J. Asian. Nat. Prod. Res., 2010. **12**(7): p. 618.
46. Kirson, I., Gottlieb, H.E., Glotter, E., Ray, A.B., Sahai, M., Ali, A., *Physalolactone B 3- $\beta$ -D-Glucopyranoside, the first glycoside in the Withanolide series*. Journal of Chemical Research, 1983. **5**: p. 120.
47. Frolow, F., Ray, A.B., Sahai, M., Glotter, E., Gottlieb, H.E., Kirson, I., *Withaperuvin and 4-deoxyphysalolactone, two new ergostane-type steroids from Physalis peruviana (Solanaceae)*. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions, 1981. **1**: p. 1029.
48. Ali, A., Sahai, M., Ray, A.B., Slatkin, D.J., *Physalolactone C, a New Withanolide from Physalis peruviana*. Journal of Natural Products, 1984. **47**(4): p. 648.

49. Gottlieb, H.E., Kirson, I., Glotter, E., Ray, A.B., Sahai, M., Ali, A., *Perulactone, a new ergostane-type steroid from Physalis peruviana (Solanaceae)*. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions, 1980. **1**: p. 2700.
50. Mayorga, H., Knapp, H., Winterhalter, P., Duque, C., *Glycosidically bound flavor compounds of cape gooseberry (Physalis peruviana L.)*. J Agric. Food. Chem., 2001. **49**(4): p. 1904.
51. Mayorga, H., Duque, C., Knapp, H., Winterhalter, P., *Hydroxyester disaccharides from fruits of cape gooseberry (Physalis peruviana)*. Phytochemistry, 2002. **59**(4): p. 439.
52. Ramadan, M.F., Morsel, J.T., *Oil goldenberry (Physalis peruviana L.)*. J. Agric. Food. Chem., 2003. **51**(4): p. 969.
53. Baumann, T.W., Meier, C.M., *Chemical defence by withanolides during fruit development in Physalis peruviana*. Phytochemistry, 1993. **33**(2): p. 317.
54. Asano, N., Kato, A., Matsui, K., Watson, A.A., Nash, R.J., Molyneux, R.J., *The effects of calystegines isolated from edible fruits and vegetables on mammalian liver glycosidases*. Glycobiology, 1997. **7**(8): p. 1085.
55. Latza, S., Ganber, D., Berger, R.G., *Carbohydrate esters of cinnamic acid from fruits of Physalis peruviana, Psidium guajava and Vaccinium vitis-idaea*. Phytochemistry, 1996. **43**(2): p. 481.
56. Sahai, M., Ray, A.B., *Secotropane alkaloids of Physalis peruviana*. The Journal of Organic Chemistry, 1980. **45**(16): p. 3265.
57. Sahai, M., Meogi, P., Ray, A.B., Oshima, Y., Hikino, H., *Structure of Withaperuvina B and C, Withanolides of Physalis peruviana roots*. Heterocycles, 1982. **43**: p. 481.
58. Neogi, P., Sahai, M., Ray, A.B., *Withaperuvins F and G, two withanolides of Physalis peruviana roots*. Phytochemistry, 1986. **26**(1): p. 243.
59. Oshima, Y., Hikino, H., Sahai, M., Ray, A.B., *Withaperuvin H, a withanolide of Physalis peruviana roots*. Journal of the Chemical Society, Chemical Communications, 1989. **10**: p. 628.
60. Bagchi, A., Neogi, P., Sahai, M., Ray, A.B., Oshima, Y., Hikino, H., *Withaperuvin E and nicandrin B, withanolides from Physalis peruviana and Nicandra physaloides*. Phytochemistry, 1984. **23**(4): p. 853.
61. Ahmad, S., Malik, A., Yasmin, R., Ullah, N., Gul, W., Khan, P.M., *Withanolides from Physalis peruviana*. Phytochemistry, 1999. **50**(4): p. 647 - 651.

- 
62. Ahmad, S., Malik, A., Afza, N., Yasmin, R., *A New Withanolide Glycoside from Physalis peruviana*. Journal of Natural Products, 1999. **62**(3): p. 493.
  63. Zaed, A.M., Swift, M.D., Sutherland, A., *A stereoselective synthesis of (+)-physoperuvine using a tandem aza-Claisen rearrangement and ring closing metathesis reaction*. Org. Biomol. Chem., 2009. **7**(13): p. 2678.
  64. Pinder, A.R., *Structure of physoperuvine*. The Journal of Organic Chemistry, 1982. **47**(19): p. 3607.
  65. Bernal, C.A., *Contribución al estudio farmacotécnico del extracto estandarizado de frutos de Physalis peruviana L. con miras a la obtención de un producto fitoterapéutico*. 2012, Universidad Nacional de Colombia: Bogotá. p. 174.
  66. EMEA, *Reflection paper on markers used for quantitative and qualitative analysis of herbal medicinal*. 2008, European Medicines Agency. Committee on herbal medicinal products: London. p. 6.
  67. Busse, W., *The significance of quality for efficacy and safety of herbal medicinal products*. Drug Information Journal, 2000. **34**: p. 15 - 23.
  68. Sinko, P., *Martin's Physical Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2006, Baltimore: Ed. Lippincott Williams & Wilkins.
  69. Couvreur, P., Puisieux, F., *Nano and microparticles for the delivery of polypeptides and proteins*. Adv. Drug. Delivery. Rev., 1993. **10**: p. 141 - 162.
  70. Puisieux, F., Poly, P.A., *Problemes technologiques poses par l'utilisation des liposomes comme vecteurs de substances medicamenteuses, encapsulation, sterilisation, conservation*, in *Les liposomes, applications thérapeutiques*, F. Puisieux, Delattre, J., Editor. 1985, Technique & Documentation: Paris. p. 73 - 113.
  71. Murillo, M., Espuelas, S., Prior, S., Vitas, A.I., Renedo, M.J., Goñi, M.M., Irache, J.M., Gamazo, C., *Liberación controlada de principios activos mediante el empleo de formulaciones galénicas*. Rev Med Univ Navarra, 2001. **45**(4): p. 19 - 34.
  72. Pitaksuteepong, T., Davies, N.M., Tucker, I.G., Rades, T., *Factors influencing the entrapment of hydrophilic compounds in nanocapsules prepared by interfacial polymerisation of water-in-oil microemulsions*. Eur J Pharm Biopharm, 2002. **53**(3): p. 335-42.

- 
73. Aboubakar, M., Puisieux, F., Couvreur, P., Vauthier, C., *Physico-chemical characterization of insulin-loaded poly(isobutylcyanoacrylate) nanocapsules obtained by interfacial polymerization*. Int J Pharm, 1999. **183**(1): p. 63-6.
  74. Arnedo, S., Espuelas, M.S., Irache, J.M., *Albumin nanoparticles as carriers for a phosphodiester oligonucleotide*. Inter. J. Pharma., 2002. **244**: p. 59 - 72.
  75. Merodio, M., Arnedo A., Renedo, M.J., Irache, J.M., *Ganciclovir-loaded albumin nanoparticles: characterization and in vitro release properties*. Eur J Pharm Sci, 2001. **12**(3): p. 251-9.
  76. Aslani, P., Kennedy, R.A., *Studies on diffusion in alginate gels. I. Effect of crosslinking with calcium or zinc ions on diffusion of acetaminophen*. J. Controll. Rel., 1996. **42**: p. 75 - 82.
  77. Hirech, K., Payan, S., Carnelle, G., Brujes, L., Legrand, J., *Microencapsulation of an insecticide by interfacial polymerisation*. Powder Tech., 2003. **130**: p. 324 - 330.
  78. Lozano, M., *Obtención de microencapsulados funcionales de zumo de Opuntia stricta mediante secado por atomización*. 2009, Universidad Politécnica de Cartagena, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Industrial: Cartagena.
  79. Benita, S., *Microencapsulation: Methods and Industrial Applications. Drugs and the pharmaceutical sciences*, ed. S. Edition. Vol. 158. 2006: Taylor & Francis Group.
  80. Bansode, S.S., Banarjee, S.K., Gaikwad, D.D., Jadhav, S.L., Thorat, R.M., *Microencapsulation: a review*. Int J Pharm Sci Rev Res, 2010. **1**: p. 38 - 43.
  81. Lopez, G., *Diseño de formas farmacéuticas líquidas de liberación modificada para el tratamiento del dolor*. 2008, Universidad de Granada: Granada. p. 284.
  82. Pinto, C., Neufeld, R.J., Ribeiro, A.J., Veiga, F., *Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles*. Nanomed.: Nanotechn., Biol., Med., 2006. **2**: p. 8 - 21.
  83. Quintanar, D., Allemann, E., Fessi, H., Doelker, E., *Preparation techniques and mechanism of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers*. Drug Dev. Ind. Pharma., 1998. **24**: p. 1113 - 1128.
  84. Benoit, J.P., Marchais, H., Rolland, H., Velde, V.V., *Biodegradable microspheres: advances in production technology*, in *Microencapsulation methods and industrial applications*, S. Benita, Editor. 1996, Marcel Dekker: New York.
  85. Baena, C.M., Mora, C.E., *Micro, Nano and Molecular Novel Delivery Systems as Carriers for Herbal Materials*. Journal of Colloid Science and Biotechnology, 2014. **2**: p. 1 - 35.

- 
86. Kosaraju, S., D'ath, L., Lawrence, A., *Preparation and characterisation of chitosan microspheres for antioxidant delivery*. Carbohydr. Polym., 2006. **64**: p. 163 - 167.
  87. Panda, V.S., Naik, S. R., *Cardioprotective activity of Ginkgo biloba Phytosomes in isoproterenol-induced myocardial necrosis in rats: a biochemical and histoarchitectural evaluation*. Exp Toxicol Pathol, 2008. **60**(4 - 5): p. 397 - 404.
  88. Yen, F.L., Wu, T. H., Lin, L. T., Cham, T. M., Lin, C. C., *Nanoparticles formulation of Cuscuta chinensis prevents acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats*. Food Chem Toxicol, 2008. **46**(5): p. 1771 - 1777.
  89. Li, W., Yi, S., Wang, Z., Chen, S., Xin, S., Xie, J., Zhao, C., *Self-nanoemulsifying drug delivery system of persimmon leaf extract: Optimization and bioavailability studies*. Int J Pharm, 2011. **420**(1): p. 161 - 171.
  90. You, J., Cui, F. D., Han, X., Wang, Y. S., Yang, L., Yu, Y. W., Li, Q. P., *Study of the preparation of sustained-release microspheres containing zedoary turmeric oil by the emulsion-solvent-diffusion method and evaluation of the self-emulsification and bioavailability of the oil*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2006. **48**(1): p. 35 - 41.
  91. Sinico, C., De Logu, A., Lai, F., Valenti, D., Manconi, M., Loy, G., Bonsignore, L., Fadda, A. M., *Liposomal incorporation of Artemisia arborescens L. essential oil and in vitro antiviral activity*. Eur J Pharm Biopharm, 2005. **59**(1): p. 161 - 168.
  92. Lertsutthiwong, P., Noomun, K., Jongaroonngamsang, N., Rojsitthisak, P. & Nimmannit, U., *Preparation of alginate nanocapsules containing turmeric oil*. Carbohydr. Polym., 2008. **74**(2): p. 209 - 214.
  93. Zhao, Y., Wang, C., Chow, A. H., Ren, K., Gong, T., Zhang, Z., Zheng, Y., *Self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) for oral delivery of Zedoary essential oil: formulation and bioavailability studies*. Int J Pharm, 2009. **383**(1 - 2): p. 170 - 177.
  94. Waleczek, K.J., Marques, H. M., Hempel, B., Schmidt, P. C., *Phase solubility studies of pure (-)-alpha-bisabolol and camomile essential oil with beta-cyclodextrin*. Eur J Pharm Biopharm, 2003. **55**(2): p. 247 - 251.
  95. Arana-Sanchez, A., Estarron-Espinosa, M., Obledo-Vazquez, E. N., Padilla-Camberos, E., Silva-Vazquez, R., Lugo-Cervantes, E., *Antimicrobial and antioxidant activities of Mexican oregano essential oils (Lippia graveolens H. B. K.) with different composition*

- when microencapsulated in beta-cyclodextrin. *Lett Appl Microbiol*, 2010. **50**(6): p. 585 - 590.
96. Aziz, H.A., Peh, K. K., Tan, Y. T., *Extraction and microencapsulation of khat: effects on sexual motivation and estradiol level in female rats*. *J Sex Med*, 2009. **6**(3): p. 682 - 695.
97. Zhou, Y., Wei, Y., Liu, H., Zhang, G., Wu, X., *Preparation and in vitro evaluation of ethosomal total alkaloids of Sophora alopecuroides loaded by a transmembrane pH-gradient method*. *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, 2010. **11**: p. 1350 - 1358.
98. Aziz, H.A., Peh, K. K., Tan, Y. T., *Herbal delivery system for treatment of obesity administration of encapsulated khat-extracts on body weight of rats*. *Obes Res Clin Pract*, 2011. **5**(4): p. e267-360.
99. Borodina, T.N., Rumsh, L. D., Kunizhev, S. M., Sukhorukov, G. B., Vorozhtsov, G. N., Feldman, B. M., Rusanova, A. V., Vasil'eva, T. V., Strukova, S. M., Markvicheva, E. A., *Entrapment of herbal extracts into biodegradable microcapsules*. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, 2008. **2**(2): p. 176 - 182.
100. Gortzi, O., Lala, S., Chinou, I., Tsaknis, J., *Evaluation of the antimicrobial and antioxidant activities of Origanum dictamnus extracts before and after encapsulation in liposomes*. *Molecules*, 2007. **12**(5): p. 932 - 945.
101. Munin, A., Lévy, F.E., *Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds; a Review*. *Pharmaceutics*, 2011. **3**: p. 793 - 829.
102. Li, Z., Jiang, H., Xu, C., Gu, L., *A review: Using nanoparticles to enhance absorption and bioavailability of phenolic phytochemicals*. *Food Hydrocolloids*, 2014. **Article in press**: p. 1 - 12.
103. Kshirsagar, A.C., Yenge, V. B., Sarkar, A., Singhal, R. S. , *Efficacy of pullulan in emulsification of turmeric oleoresin and its subsequent microencapsulation*. *Food Chemistry*, 2009. **113**(4): p. 1139 - 1145.
104. Belscak-Cvitanovic, A., Stojanovic, R., Manojlovic, V., Komes, D., Cindric, I.J., Nedovic, V., Bugarski, B. , *Encapsulation of polyphenolic antioxidants from medicinal plant extracts in alginate-chitosan system enhanced with ascorbic acid by electrostatic extrusion*. *Food Research International*, 2011. **44**(4): p. 1094 - 1101.
105. Deladino, L., Navarro, A. S., Martino, M. N., *Carrier systems for yerba mate extract (Ilex paraguariensis) to enrich instant soups. Release mechanisms under different pH conditions*. *LWT - Food Science and Technology*, 2013. **53**(1): p. 163 - 169.

- 
106. López, A., Deladino, L., Martino, M., *Effect of starch filler on calcium-alginate hydrogels loaded with yerba mate antioxidants*. Carbohydr. Polym., 2013. **95**: p. 315 - 323.
  107. Martins, R.M., Pereira, S. V., Siqueira, S., Salomão, W. F., Freitas, L. A., *Curcuminoid content and antioxidant activity in spray dried microparticles containing turmeric extract*. Food Res. Int., 2013. **50**(2): p. 657 - 663.
  108. Garg, R., Gupta, G.D., *Gastroretentive Floating Microspheres of Silymarin: Preparation and In Vitro Evaluation*. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2010. **9**(1): p. 58 - 66.
  109. Onoue, S., Ochi, M., Yamada, S., *Development of (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG)-loaded enteric microparticles with intestinal mucoadhesive property*. International Journal of Pharmaceutics, 2011. **410**: p. 111 - 113.
  110. Caddeo, C., Nácher, A., Díez-Sales, O., Merino-Sanjuán, M., Fadda, A.M., Manconi, M., *Chitosan-xanthan gum microparticle-based oral tablet for colon-targeted and sustained delivery of quercetin*. Journal of Microencapsulation, 2014. **Article in press**: p. 1 - 6.
  111. Jenita, J.L., Yathish, M., Wilson, B., Premakumari, K., *Formulation and evaluation of microparticles containing curcumin for colorectal cancer*. Journal of Drug Delivery & Therapeutics, 2012. **2**(3): p. 125 - 128.
  112. Rocha-Guzmán, N.E., Gallegos-Infante, J.A., González-Laredo, R.F., Harte, F., Medina-Torres, L., Ochoa-Martínez, L.A., Soto-García, M., *Effect of high-pressure homogenization on the physical and antioxidant properties of quercus resinosa infusions encapsulated by spray-drying*. J. Food Sci., 2010. **75**: p. 57 - 61.
  113. Sosa, M.V., Rodríguez-Rojo, S., Mattea, F., Cismondi, M., Cocero, M.J., *Green tea encapsulation by means of high pressure antisolvent coprecipitation*. J. Supercrit. Fluids, 2011. **56**: p. 304 - 311.
  114. Xiong, S., Melton, L.D., Easteal, A.J., Siew, D., *Stability and antioxidant activity of black currant anthocyanins in solution and encapsulated in glucan gel*. J. Agric. Food Chem., 2006. **54**: p. 6201 - 6208.
  115. Lauro, M.R., Maggi, L., Conte, U., De Simone, F., Aquino, R., *Rutin and Quercetin gastro-resistant microparticles obtained by spray-drying technique*. J. Drug Del. Sci. Tech., 2005. **15**: p. 363 - 369.

116. Morris, C.J., Earl, J.R., Trenam, C.W., Blake, D.R., *Reactive Oxygen Species and Iron-a Dangerous Partnership in Inflammation*. Int. J. Biochem. Cell. Biol., 1995. **27**(2): p. 109 - 122.
117. Valko, M., Leibfritz, D., Moncola, J., Cronin, M.T.D., Mazura, M., Telser, J., *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2007. **39**: p. 44 - 84.
118. Halliwell, B., Gutteridge, J., *Free Radical in Biology and Medicine*. Fourth edition ed, ed. O.U. Press. 2007, Gran Bretaña. 851.
119. Conner, E.M., Grisham, M.B., *Inflammation, Free Radicals, and Antioxidants*. Nutrition, 1996. **12**(4): p. 274 - 277.
120. Saez, V., Hernández, J.R., Peniche, C., *Las microesferas como sistemas de liberación controlada de péptidos y proteínas*. Biotecnología Aplicada, 2007. **24**: p. 98 - 107.
121. Kupchan, S.M., Britton, R.W., Lacadie, J.A., Ziegler, M.F., Sigel, C.W., *The Isolation and structural elucidation of bruceantin and bruceantanol, new potent antileukemic quassinoids from Brucea antidysenterica*. J Org Chem, 1975. **40**(5): p. 648 - 654.
122. Mora, A., *Evaluación del efecto de los frutos de physalis peruviana sobre el estrés oxidativo en un modelo de diabetes experimental*. 2009, Universidad Nacional de Colombia: Bogotá.
123. Benzie, I.F.F., Strain, J.J., *Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay*. Anal Biochem, 1996. **239**: p. 70 - 76.
124. Pulido, R., Bravo, L., Saura-Calixto, F., *Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/ antioxidant power assay*. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2000. **48**: p. 3396 - 3402.
125. Miller, N.J., Diplock, A.T., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gopinathan, V., Milner, A., *A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates*. Clinical Science, 1993. **84**: p. 407 - 412.
126. Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., *Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity*. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie, 1995. **28**: p. 25 - 30.
127. Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Prior, R.L., *Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001. **49**: p. 4619 - 4626.
128. Vergel, N.E., *Estudio de la actividad anticonvulsivante de metabolitos secundarios tipo cumarina*. 2011, Universidad Nacional de Colombia: Bogotá. p. 323.

129. Encina, C.R., Ureña, M.O., Carrasco, P.R.R., *Determinación de compuestos bioactivos del aguaymanto (Physalis peruviana, Linnaeus, 1753) y de su conserva en almíbar maximizando la retención de ácido ascórbico*. ECIPERU, 2004. **1**(1): p. 6 - 10.
130. Ramadan, M.F., Moersel, J.T., *Impact of enzymatic treatment on chemical composition, physicochemical properties and radical scavenging activity of goldenberry (Physalis peruviana L.) juice*. J. Sci. Food Agr., 2007. **87**: p. 452 - 460.
131. Demir, T., Özen, M.Ö., Hames-Kocabas, E.E., *Antioxidant and Cytotoxic Activity of Physalis peruviana*. Medicinal Plant Research, 2014. **4**(3): p. 30 - 34.
132. Vasco, C., Ruales, J., Kamal - Eldin, A., *Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador*. Food Chem., 2008. **111**: p. 816 - 823.
133. Coleman, J.W., *Nitric oxide in immunity and inflammation*. Int. Immunopharmacol, 2001. **1**: p. 1397 - 1406.
134. Chua, L.S., *A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities*. J. Ethnopharmacol, 2013. **150**: p. 805 - 817.
135. Demirezer, L.Ö., Gürbüz, F., Güvenalp, Z., Ströch, K., Zeeck, A., *Iridoids, Flavonoids and Monoterpene Glycosides from Galium verum subsp. Verum*. Turk. J. Chem., 2006. **30**: p. 525 - 534.
136. Güvenalp, Z., Kiliç, N., Kazaz, C., Kaya, Y., Demirezer, L.Ö., *Chemical Constituents of Galium tortumense*. Turk. J. Chem., 2006. **30**: p. 515 - 523.
137. Song, N., Xu, W., Guan, H., Liu, X., Wang, Y., Nie, X., *Several flavonoids from Capsella bursa-pastoris (L.) Medic.* Asian. J. Tradit. Med., 2007. **2**(5): p. 218 - 222.
138. Takemura, T., Takatsu, Y., Kasumi, M., Marubashi, W., Iwashina, T., *Flavonoids and their distribution patterns in the flowers of Gladiolus cultivars*. Acta Hort. , 2005. **673**: p. 487 - 493.
139. Nassar, M., Aboutbl, E.A., Makled, Y.A., El-Khrisy, E.A., Osman, A.F., *Secondary metabolites and pharmacology of Foeniculum vulgare Mill. Subsp. Piperitum*. Rev. Latinoamer. Quím., 2010. **38**(2): p. 103 - 112.
140. El-Kader, A.M.A., El-Mawla, A.M.A.A., Mohamed, M.H., Ibraheim, Z.Z., *Phytochemical and biological studies of Emex spinosa (L.) campd. growing in Egypt*. Bull. Pharm. Sci., Assiut University, 2006. **29**(2): p. 328 - 347.

141. Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J., *Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships*. Journal of Nutritional Biochemistry, 2002. **13**: p. 572 - 584.
142. Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., Cross, C. E., *Free radicals, antioxidants and human disease: Where are we now?* J. Lab. Clin. Med. , 1992. **119**: p. 598 - 620.
143. Ortiz, H.F., Sánchez, W.F., Méndez, J., Murillo, E., *Potencial antioxidante de hojas y corteza de Bauhinia kalbreyeri harms: Contribución de sus flavonoides en esta actividad*. Rev. Acad. Colomb. Cienc., 2009. **33**(127): p. 183 - 191.
144. Wu, H., Chenc, M., Fand, Y., Elsebaeia, F., Zhua, Y., *Determination of rutin and quercetin in Chinese herbal medicine by ionic liquid-based pressurized liquid extraction–liquid chromatography–chemiluminescence detection*. Talanta, 2012. **88**: p. 222 - 229.
145. Zhao, Z., Dong, L., Wu, Y., Lin, F., *Preliminary separation and purification of rutin and quercetin from Euonymus alatus (Thunb.) Siebold extracts by macroporous resins*. Food and Bioproducts Processing, 2011. **89**: p. 266 - 272.
146. Khan, R.A., *Evaluation of flavonoids and diverse antioxidant activities of Sonchus arvensis*. Chemistry Central Journal, 2012. **6**: p. 126 - 137.
147. ICH, *Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology*. International Conference on Harmonization, 1996: p. 12.
148. Ravichandran, V., Shalini, S., Sundram, K., Harish, R., *Validation of analytical methods – strategies & importance*. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2010. **2**: p. 18 - 22.
149. Flach, C., *Avaliação da estabilidade de extratos, frações e flavonoides C-glicosídeos presentes em Cecropia glaziovii*. 2013, Universidade Federal de Santa Catarina: Florianópolis. p. 113.
150. UNODC, *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*. Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito. 2010, New York: Naciones Unidas. 67.
151. Nigrinis, L.S., *El método de análisis para los estudios de estabilidad y de biodisponibilidad de medicamentos. Parte II*. Revista Colombiana de Ciencias Químico - Farmacéuticas, 1995. **23**: p. 95 - 101.
152. AEFI, *Validación de métodos analíticos*, ed. A.E.d.F.d.I. Industria. 2001, Barcelona. 331.

153. Moreno, C.A., Plazas, C.E., *Validación de una metodología analítica para la cuantificación por HPLC de quercetina en una matriz vegetal*. Rev. Col. Cienc. Quím. Farm., 2005. **34**(1): p. 58 - 68.
154. Judefeind, A., Villiers, M., *Drug Loading into and In Vitro Release from Nanosized Drug Delivery Systems*, in *Nanotechnology in Drug Delivery*, P. Aramwit, Kwon, G., Editor. 2009, American Association of Pharmaceutical Scientists: New York. p. 129 - 162.
155. Bilati, U., Allémann, E., Doelker, E., *Poly(D,L-lactide-co-glycolide) protein-loaded nanoparticles prepared by the double emulsion method—processing and formulation issues for enhanced entrapment efficiency*. Journal of Microencapsulation, 2005. **22**(2): p. 205 - 214.
156. Fang, Z., Bhandari, B., *Encapsulation of polyphenols - a review*. Trends in Food Science & Technology, 2010. **21**: p. 510 - 523.
157. Loveymi, B.D., Jelvehgari, M., Zakeri-Milani, P., Valizadeh, H., *Design of vancomycin RS-100 nanoparticles in order to increase the intestinal permeability*. Advanced Pharmaceutical Bulletin, 2012. **2**(1): p. 43 - 56.
158. Calvo, P., Hernández, T., Lozano, M., González-Gómez, D., *Microencapsulation of extra-virgin olive oil by spray-drying: Influence of wall material and olive quality*. Eur. J. Lipid Sci. Technol., 2010. **112**: p. 852 - 858.
159. Georgetti, S.R., Casagrande, R., Souza, C.R.F., Oliveira, W.P., Fonseca, M.J.V., *Spray drying of the soybean extract: Effects on chemical properties and antioxidant activity*. LWT-Food Sci. Technol., 2008. **41**: p. 1521 - 1527.
160. Gonzales, N., Fernández, D., Gómez, M., Núñez, L., Lafita, O., *Efecto del Eudragit y la Etilcelulosa como Agentes Retardantes de la Liberación sobre las Características Físico-Químicas y la Liberación In Vitro de Microesferas Cargadas con Zidovudina*. Acta Farm. Bonaerense, 2005. **24**(3): p. 350 - 355.
161. Wang, J.M., Zheng, W., Song, Q. W., Zhu, H., Zhou, Y. , *Preparation and Characterization of Natural Fragrant Microcapsules*. Journal of Fiber Bioengineering and Informatics, 2009. **1**(4): p. 293 - 300.